

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NANOENCAPSULADAS CON  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y LIBERACIÓN CONTROLADA FRENTE A  
*Staphylococcus aureus* y *Candida albicans***

**DAISSY JULIETH PAREDES GUERRERO, Qca.**

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2015**

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NANOENCAPSULADAS CON  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y LIBERACIÓN CONTROLADA FRENTE A  
*Staphylococcus aureus* y *Candida albicans***

**Autor:  
DAISSY JULIETH PAREDES GUERRERO  
Química**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar a título de:  
MAGISTER EN QUÍMICA**

**Director:  
RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ, PhD Bioquímica**

**Codirectora:  
CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ, PhD Microbiología**

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2015**

## DEDICATORIA

*A todos mis seres queridos que siempre han estado allí para recordarme que aunque van a existir tiempos difíciles, la constancia es la clave para salir adelante.*

*“La más poderosa fuerza bajo cuya presión estamos a veces obligados a trabajar, es nuestra propia consciencia”*

*Lucian Blaga*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por permitirme obtener este logro. A mi familia por su apoyo absoluto y voz de aliento, por respaldarme al tomar mis decisiones, por sus constantes enseñanzas de vida y por motivarme para ser cada día mejor.

A mis directores, el Dr. Rodrigo Torres Sáez y la Dra. Claudia Ortiz López por su dirección, orientación, contribuciones y gran paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

A los calificadores la Dra. Niradiz Reyes y la Dra. Yajaira Combariza por la dedicación de su tiempo a la lectura y calificación de este trabajo.

A mis compañeros del Grupo de Investigación de Bioquímica y Microbiología por su apoyo y porque de una u otra manera aportaron sugerencias que ayudaron a la solución de inconvenientes en la realización de esta investigación. Especialmente a Jhon Jhamilton Artunduaga.

A todas esas nuevas amistades que coseché mientras estuve realizando la parte experimenta de la tesis. Especialmente a Alba López, Yuly Prada, Keyla Maydee, Zayda Fonseca, Nazzoly Rueda, Jenifer Ruiz, gracias por hacer de los días más complicados mucho más amenos.

A esas personas que se mantienen al lado de uno a pesar del tiempo, la adversidad y los cambios constantes de la vida, con quienes se puede confiar y contar siempre que uno las necesite.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	21
<b>1 MARCO DE REFERENCIA Y ANTECEDENTES</b> .....	23
1.1 NANOTECNOLOGÍA.....	23
1.2 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	24
1.2.1 Síntesis de nanopartículas de plata.....	25
1.2.2 Síntesis de nanopartículas de ZnO.....	29
1.2.3 Propiedades de las nanopartículas metálicas .....	32
1.2.4 Propiedades antimicrobianas de las nanopartículas metálicas.....	34
1.3 ENCAPSULACIÓN DE AGENTES ACTIVOS EMPLEANDO BIOPOLÍMEROS .....	38
1.3.1 Polímeros empleados como agentes encapsulantes .....	39
1.3.2 Métodos de síntesis de nanopartículas poliméricas .....	43
1.4 MICROORGANISMOS PATÓGENOS.....	49
1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM) .....	50
1.4.2 <i>Candida albicans</i> .....	51
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	53
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	53
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	54
3.1 MATERIALES Y REACTIVOS.....	55
3.2 ADQUISICIÓN Y MANTENIMIENTO DE CEPAS.....	55
3.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS.....	55
3.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata.....	56
3.3.2 Síntesis de nanopartículas de ZnO.....	56
3.4 ENCAPSULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS .....	57
3.4.1 Nanoencapsulación de nanopartículas utilizando PLGA .....	57
3.4.2 Nanoencapsulación de nanopartículas utilizando PLA.....	58

3.4.3	Nanoencapsulación de nanopartículas utilizando Quitosano .....	58
3.5	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y ENCAPSULADOS.....	59
3.5.1	Dispersión de luz en modo dinámico (DLS) .....	59
3.5.2	Potencial Zeta.....	60
3.5.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	60
3.5.4	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	60
3.5.5	Espectroscopia Infrarrojo .....	61
3.5.6	Espectrofotometría UV-VIS .....	61
3.6	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ENCAPSULACIÓN .....	62
3.7	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS Y NANOENCAPSULADOS .....	62
3.7.1	Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) frente a SARM .....	62
3.7.2	Determinación de CMI y CMF frente a <i>C. albicans</i> .....	63
3.8	CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS Y NANOCOMPUESTOS FRENTE A DOS LÍNEAS CELULARES.....	64
3.9	PERFIL DE LIBERACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DE LOS NANOCOMPUESTOS .....	65
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>66</b>
4.1	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS.....	66
4.1.1	Nanopartículas de plata.....	66
4.1.2	Caracterización de nanopartículas de plata .....	67
4.1.3	Nanopartículas de óxido de zinc.....	74
4.1.4	Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc .....	75
4.2	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS...	83
4.2.1	Determinación de CMI y CMB frente a <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina (SARM) .....	83
4.2.2	Determinación de CMI y CMF frente a <i>Candida albicans</i> .....	90
4.3	ENCAPSULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....	92
4.3.1	Nanoencapsulación de nanopartículas utilizando PLGA y PLA.....	93
4.3.2	Nanoencapsulación de nanopartículas utilizando Quitosano .....	95
4.4	CARACTERIZACIÓN DE ENCAPSULADOS .....	96

4.4.1	Dispersión de luz en modo dinámico (DLS) .....	97
4.4.2	Potencial Zeta .....	99
4.4.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	101
4.4.4	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	103
4.4.5	Espectroscopía Infrarrojo .....	104
4.4.6	Determinación del porcentaje de encapsulación .....	109
4.5	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ENCAPSULADOS DE NANOPARTÍCULAS .....	111
4.5.1	Determinación de CMI y CMB frente a <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina (SARM) .....	111
4.5.2	Determinación de CMI y CMF frente a <i>Candida albicans</i> .....	115
4.6	CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS Y NANOENCAPSULADOS FRENTE A CÉLULAS MAMÍFERAS .....	116
4.7	PERFIL DE LIBERACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DE LOS NANOENCAPSULADOS .....	119
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>127</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>128</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>146</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Escala de dimensiones.....	<b>24</b>
<b>Figura 2</b> Esquema del mecanismo de acción de las Nanopartículas (Moritz & Geszke-moritz, 2013).....	<b>38</b>
<b>Figura 3</b> Estructuras de polímeros empleados para encapsulación de principios activos. A) Ácido poliláctico (PLA). B) Ácido poliláctico-coglicólico (PLGA) C) Quitosano.....	<b>40</b>
<b>Figura 4</b> Esquema del proceso de los principales tipos de síntesis de nanopartículas poliméricas (Adaptado de Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2010). .....	<b>45</b>
<b>Figura 5</b> Metodología general para la tesis de investigación.....	<b>54</b>
<b>Figura 6</b> Espectros ultravioleta de las AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores y diferentes relaciones molares. A) Agente reductor glucosa y relación molar 4:1 (glu4). B) Agente reductor glucosa y relación molar 8:1 (glu8). C) Agente reductor maltosa y relación molar 4:1 (mal4). D) Agente reductor maltosa y relación molar 8:1 (mal8). .....	<b>69</b>
<b>Figura 7</b> Distribución de tamaño promedio de las AgNPs obtenidos por DLS A) Agente reductor glucosa y relación molar 4:1 (glu4) B) Agente reductor glucosa y relación molar 8:1 (glu8) C) Agente reductor maltosa y relación molar 4:1 (mal4) D) Agente reductor maltosa y relación molar 8:1 (mal8).....	<b>71</b>
<b>Figura 8</b> Carga superficial obtenida mediante la medición del potencial zeta de las AgNPs empleando dos diferentes agentes reductores y dos relaciones molares. A) Agente reductor glucosa y relación molar 4:1 (glu4) B) Agente reductor glucosa y relación molar 8:1 (glu8) C) Agente reductor maltosa y relación molar 4:1 (mal4) D) Agente reductor maltosa y relación molar 8:1 (mal8). .....	<b>72</b>
<b>Figura 9</b> Microscopias de transmisión electrónica de las nanopartículas AgNPs sintetizadas empleando maltosa como agente reductor. A) Con una relación molar 4:1 B) Con una relación molar 8:1.....	<b>74</b>

<b>Figura 10</b> Espectros de ultravioleta UV-VIS de las ZnONPs sintetizadas empleando dos diferentes solventes, utilizando una dilución 1/10 en agua desionizada. ....	<b>76</b>
<b>Figura 11</b> Espectro de Infrarrojo obtenido para la muestra de ZnONPs sintetizada empleando dos diferentes solventes, DEG y PEG. ....	<b>77</b>
<b>Figura 12</b> Difractograma obtenido para la muestra de ZnONPs sintetizada empleando DEG. ....	<b>78</b>
<b>Figura 13</b> Distribución de tamaño promedio de las ZnONPs sintetizadas empleando dos diferentes solventes A) DEG B) PEG. ....	<b>79</b>
<b>Figura 14</b> Estructuras químicas de los dos solventes utilizados en la síntesis de ZnONPs A) Dietilenglicol (DEG) B) Polietilglicol (PEG). ....	<b>80</b>
<b>Figura 15</b> Carga superficial obtenida mediante la medición del potencial zeta las ZnONPs sintetizadas empleando dos diferentes solventes A) DEG B) PEG. ....	<b>80</b>
<b>Figura 16</b> Microscopias de transmisión electrónica (TEM) de las nanopartículas de ZnO sintetizadas en presencia de DEG. ....	<b>82</b>
<b>Figura 17</b> Cinéticas de crecimiento de SARM en presencia de diferentes concentraciones de AgNPs A) sintetizadas con glucosa (glu4) B) sintetizadas con glucosa (glu8) C) sintetizadas con maltosa (mal4) D) sintetizadas con maltosa (mal8). Las cinéticas se realizaron durante 8h a 37°C con una agitación de 200 rpm. ....	<b>84</b>
<b>Figura 18</b> Cinéticas de crecimiento de SARM en presencia de diferentes concentraciones de ZnONPs A) DEG B) PEG Las cinéticas se realizaron durante 8h a 37°C con una agitación de 200 rpm. ....	<b>87</b>
<b>Figura 19</b> Distribución de tamaño promedio obtenido por DLS de los nanocompuestos sintetizados A) PLGA@Ag B) PLGA@ZnO C) PLA@Ag D) PLA@ZnO E) QTS@Ag F) QTS@ZnO. ....	<b>98</b>

**Figura 20** Distribución de carga superficial determinados mediante la medición del potencial zeta de los nanocompuestos sintetizados A) PLGA@Ag B) PLGA@ZnO C) PLA@Ag D) PLA@ZnO E) QTS@Ag F) QTS@ZnO. .... **99**

**Figura 21** Microscopias electrónica de barrido (SEM) de los nanocompuestos de PLGA@Ag en dos diferentes zonas. .... **101**

**Figura 22** Microscopias electrónica de barrido (SEM) de los nanocompuestos de PLA@Ag en dos diferentes zonas. .... **102**

**Figura 23** Microscopias electrónica de barrido (SEM) de los nanocompuestos sintetizados A) PLGA@ZnO B) PLA@ZnO. .... **103**

**Figura 24** Microscopias de transmisión electrónica (TEM) de los nanocompuestos sintetizados con quitosano A) QTS@Ag B) Acercamiento de QTS@Ag C) Acercamiento de QTS@Ag D) QTS@ZnO. .... **104**

**Figura 25** Espectro de infrarrojo del polímero PLGA libre y en presencia de cada tipo de nanopartículas metálicas tras la síntesis de los nanocompuestos. Los espectros IR fueron tomados con un ancho espectral entre 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ . .... **105**

**Figura 26** Espectro de infrarrojo del polímero PLA libre y en presencia de cada tipo de nanopartículas metálicas tras la síntesis de los nanocompuestos. Los espectros IR fueron tomados con un ancho espectral entre 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ . .... **106**

**Figura 27** Espectro de infrarrojo del polímero Quitosano libre y en presencia de cada tipo de nanopartículas metálicas tras la síntesis de los nanocompuestos. Los espectros IR fueron tomados con un ancho espectral entre 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ . .... **108**

**Figura 28** Cinéticas de crecimiento de SARM en presencia de nanopartículas libres y encapsuladas en las tres matrices poliméricas a la misma concentración. A) 0.1  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs libre y encapsulada. B) 1.0  $\mu\text{g/mL}$  de ZnONPs libre y encapsulada. .... **112**

**Figura 29** Perfil de liberación de las nanopartículas metálicas bajo las mismas condiciones de incubación a 37°C, pH 7.4 y 100 rpm de agitación A) Liberación de AgNPs desde nanocompuesto de PLGA@Ag B) Liberación de AgNPs desde

nanocompuesto de PLA@Ag C) Liberación de AgNPs desde nanocompuesto de QTS@Ag D) Liberación de ZnONPs desde nanocompuesto de QTS@ZnO. .... **121**

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Compilación de trabajos recientes sobre la actividad antimicrobiana de nanopartículas metálicas.....	<b>35</b>
<b>Tabla 2</b> Encapsulación de agentes activos, incluidas nanopartículas en matrices poliméricas, en las últimas tres décadas.....	<b>44</b>
<b>Tabla 3</b> Propiedades físicas determinadas para las nanopartículas de plata sintetizadas. ....	<b>73</b>
<b>Tabla 4</b> Propiedades físicas determinadas para las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas en presencia de dos diferentes solventes. ....	<b>81</b>
<b>Tabla 5</b> Propiedades antibacterianas de las AgNPs y las ZnONPs frente a SARM. ....	<b>89</b>
<b>Tabla 6</b> Propiedades antifúngicas de las AgNPs y las ZnONPs frente a <i>Candida albicans</i> ATCC10231. ....	<b>90</b>
<b>Tabla 7</b> Condiciones de reacción determinadas para el proceso de encapsulación de nanopartículas empleando PLGA o PLA.....	<b>94</b>
<b>Tabla 8</b> Condiciones de reacción determinadas para el proceso de encapsulación de nanopartículas empleando quitosano.....	<b>96</b>
<b>Tabla 9</b> Propiedades físicas determinadas para las nanopartículas encapsuladas en tres diferentes polímeros empleando un equipo Zetasizer.....	<b>100</b>
<b>Tabla 10</b> Porcentaje de encapsulación determinado para cada uno de los nanocompuestos sintetizados. ....	<b>110</b>
<b>Tabla 11</b> Porcentajes de inhibición del crecimiento de SARM en presencia de nanopartículas de AgNPs libre y encapsulada a diferentes concentraciones. ....	<b>114</b>

**Tabla 12** Porcentajes de inhibición del crecimiento de SARM en presencia de nanopartículas de ZnONPs libre y encapsulada a diferentes concentraciones... **115**

**Tabla 13** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) y concentración mínima fungicida (CMF) de las nanopartículas libres y encapsuladas frente a *Candida albicans*..... **116**

**Tabla 14** Porcentaje de citotoxicidad sobre células de fibroblasto murino a diferentes concentraciones de nanopartículas libres..... **117**

**Tabla 15** Porcentaje de citotoxicidad sobre células de fibroblasto murino a diferentes concentraciones de nanopartículas encapsuladas. .... **118**

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b> Cálculo de porcentaje de inhibición bacteriana.....	<b>147</b>
<b>ANEXO B</b> Cálculo de porcentaje de encapsulación.....	<b>148</b>
<b>ANEXO C</b> Cálculo de porcentaje de carga .....	<b>149</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AgNPs</b>	Nanopartículas de Plata
<b>BHI</b>	Infusión de cerebro y corazón ( Brain Heart Infusion)
<b>CMB</b>	Concentración mínima Bactericida
<b>CMI</b>	Concentración mínima Inhibitoria
<b>CMF</b>	Concentración mínima fungicida
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DEG</b>	Dietilenglicol
<b>DLS</b>	Dispersión de luz Dinámica ( Dynamic Light scattering)
<b>DRX</b>	Difracción de rayos X
<b>DS</b>	Desviación Estándar
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FDA</b>	Food Drug Administration
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier
<b>MH</b>	Müller- Hinton
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>NNIS</b>	National Nosocomial Infectious Surveillance System
<b>%P/V</b>	Porcentaje Peso- volumen
<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PLA</b>	Ácido poli-láctico
<b>PLGA</b>	Ácido poli-láctico-co-glicólico
<b>PVA</b>	Polivinil alcohol
<b>Pz</b>	Potencial Zeta
<b>QTS</b>	Quitosano
<b>RPM</b>	Revoluciones por minutos
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
<b>SDA</b>	Agar dextrosa saboreaud
<b>SEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>STEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido En modo de Transmisión (Scanning Transmission Electronic Microscope)
<b>TEM</b>	Microscopía Electrónica de Transmisión
<b>TPP</b>	Tripolifosfato sódico
<b>UV-VIS</b>	Espectrofotometría ultravioleta visible
<b>W/O/W</b>	Emulsión <i>water/oil/wáter</i>
<b>ZnONPs</b>	Nanopartículas de óxido de Zinc

## RESUMEN

**TITULO:** SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS NANOENCAPSULADAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y LIBERACIÓN CONTROLADA FRENTE A *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*\*

**AUTOR:** PAREDES GUERRERO Daissy Julieth\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Nanopartículas metálicas, concentración mínima inhibitoria, encapsulación, actividad antimicrobiana, polímeros biodegradables.

### CONTENIDO

En este trabajo de investigación se realizó la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) por reducción química empleando como agente reductor un monosacárido y la obtención de nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) mediante síntesis asistida por polioles. Las nanopartículas metálicas se caracterizaron mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), dispersión de luz en modo dinámico (DLS), espectrofotometría UV-VIS y por medición de potencial zeta. Las nanopartículas metálicas sintetizadas fueron en general esféricas, con tamaños menores a 20 nm y con carga superficial positiva. A continuación las nanopartículas metálicas se encapsularon en tres polímeros biodegradables: ácido poli-láctico (PLA), ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) y quitosano mediante dos metodologías diferentes de acuerdo a la naturaleza química de cada polímero. Se obtuvieron nanocompuestos con un tamaño promedio entre 200 y 400 nm esféricas con carga superficial positiva superior a +10 mV.

Posteriormente, se determinó la actividad antimicrobiana de las nanopartículas metálicas libres y encapsuladas sobre *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM) y *Candida albicans* determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) o fungicida (CMF) de los nanocompuestos sintetizados. Las nanopartículas metálicas libres exhibieron efecto inhibitorio en el crecimiento de SARM y *Candida albicans*, alcanzando valores de CMI 0.50 y <0.10 µg/mL, respectivamente. Mientras que al estar encapsuladas, las nanopartículas metálicas presentan una actividad inhibitoria hasta diez veces mayor.

Adicionalmente, se evaluó el efecto citotóxico de las nanopartículas metálicas y los nanocompuestos frente a fibroblastos murino mediante la técnica colorimétrica del MTT. Los resultados indicaron que la concentración necesaria para inducir un efecto inhibitorio en el crecimiento del microorganismo no produce una disminución significativa en la viabilidad de células de fibroblasto murino.

Los resultados de este trabajo demuestran la potencial aplicación de nanopartículas metálicas nanoencapsuladas en biopolímeros como posibles agentes antimicrobianos alternativos para el control de enfermedades infecciosas causadas por patógenos multirresistentes a antibióticos.

\* Proyecto de grado

\*\* Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez. Facultad de Salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Codirectora: Claudia Ortiz López.

## ABSTRACT

**TITLE:** METAL NANOPARTICLES NANOENCAPSULATED SYNTHESIS WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND CONTROLLED RELEASE AGAINST *Staphylococcus aureus* AND *Candida albicans*\*

**AUTHOR:** PAREDES GUERRERO Daissy Julieth\*\*

**KEYWORDS:** Metal nanoparticles, minimal inhibitory concentration, encapsulation, antimicrobial activity, biodegradable polymers.

### DESCRIPTION

In this research the synthesis of silver nanoparticles (AGNPS) was performed by chemical reduction using as a reducing agent a monosaccharide and obtaining zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) assisted synthesis using polyols. Metal nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering mode (DLS), UV-VIS spectrophotometry and measurement of zeta potential. Metal nanoparticles were synthesized spherical generally with sizes less than 20 nm and positive surface charge. Then encapsulated metal nanoparticles in three biodegradable polymers: poly-lactic acid (PLA), poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) and chitosan using two different methodologies according to the chemical nature of each polymer. Nanocomposites were obtained with an average size between 200 and 400 nm with positive surface charge spherical than +10 mV.

Subsequently, the antimicrobial activity of metal nanoparticles and encapsulated was determined on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Candida albicans* by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal (MBC) or fungicide (CMF) of the synthesized nanocomposites. MIC of metal nanoparticles against MRSA and *Candida albicans* were 0.50 and <0.10 mg / mL, respectively. While being encapsulated, the metallic nanoparticles have an inhibitory activity up to ten times. Cytotoxic effect of metal nanoparticles and nanocomposite against murine fibroblasts by the MTT colorimetric method was evaluated. The results indicated that the concentration needed to induce an inhibitory effect on the growth of the microorganism does not produce a significant decrease in the viability of murine fibroblast cells.

The results of this work showed the potential application of metal nanoparticles nanoencapsulated in biopolymers as possible alternative antimicrobial agents for the control of infectious diseases caused by multidrug-resistant pathogens to antibiotics.

\* Project Grade

\*\* Universidad Industrial de Santander. Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Rodrigo Torres Sáez. Faculty of Health.School of Bacteriology and Clinical Laboratory. Codirectora: Claudia Ortiz López.

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la nanotecnología durante los últimos años abarca un amplio espectro de aplicaciones que va desde investigaciones básicas hasta procesos industriales [1]. Esto se debe a las propiedades excepcionales que presentan los nanocompuestos. Las principales aplicaciones de los nanomateriales se han evidenciado en el área de la salud, por ejemplo en el recubrimiento de materiales dentales, prótesis, catéteres, injertos vasculares y tratamiento tópico de quemaduras [2]. Los nanomateriales también han sido utilizados en sensores de medio ambiente, reacciones de catálisis, tratamiento de residuos y diferentes campos de la electrónica, óptica, fotónica, entre otros [3].

Entre los principales nanomateriales se encuentran los metálicos que exhiben propiedades fisicoquímicas importantes que incluyen mayor conductividad, actividad catalítica; propiedades ópticas inusuales y propiedades piromecánicas. Además presentan actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos [4]–[7]. En relación a la actividad biológica de las nanopartículas metálicas, se ha demostrado que las de plata (AgNPs) y óxido de zinc (ZnONPs) presentan un efecto inhibitorio en el crecimiento de cepas bacterianas y fúngicas, al ser usadas en concentraciones comparables con las empleadas en antibióticos utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas [8], [9].

Se ha establecido que las nanopartículas metálicas a pesar de presentar actividad antimicrobiana, podrían exhibir efectos citotóxicos sobre líneas celulares sanas y cancerígenas, dependiendo de la concentración empleada [10], [11]. Adicionalmente, se ha señalado que la estabilidad de las nanopartículas se ve comprometida en condiciones fisiológicas donde la presencia de compuestos biológicos como las enzimas, puede dificultar la acción efectiva de las nanopartículas en el sitio de infección.

Con el fin de resolver las dificultades que conlleva el uso de las nanopartículas como agentes antimicrobianos, se ha propuesto la encapsulación de nanopartículas metálicas como una estrategia que permitiría disminuir el posible efecto citotóxico, mejorar la estabilidad y aumentar la biodisponibilidad. De esta manera se evitaría la degradación, y por tanto aumentaría el tiempo de circulación permitiendo una liberación controlada del agente activo (en este caso, nanopartículas) y disminuir la concentración efectiva necesaria para exhibir un efecto antimicrobiano.

En el presente trabajo de investigación se obtuvieron nanopartículas de plata (AgNPs) mediante síntesis verde y nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) empleando síntesis asistida por polioles. Adicionalmente, las nanopartículas fueron encapsuladas empleando los polímeros biodegradables ácido poliláctico (PLA), poliláctico-co-glicólico (PLGA) y quitosano como agentes encapsulantes. Posteriormente se evaluó la liberación de los nanocompuestos encapsulados en función del tiempo, en condiciones controladas empleando condiciones fisiológicas. Finalmente, se evaluó y comparó la actividad antimicrobiana *in vitro* mediante el método de microdilución en caldo de los diferentes compuestos antimicrobianos tanto libres como nanoencapsulados, sobre las cepas patógenas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Candida albicans*.

# 1 MARCO DE REFERENCIA Y ANTECEDENTES

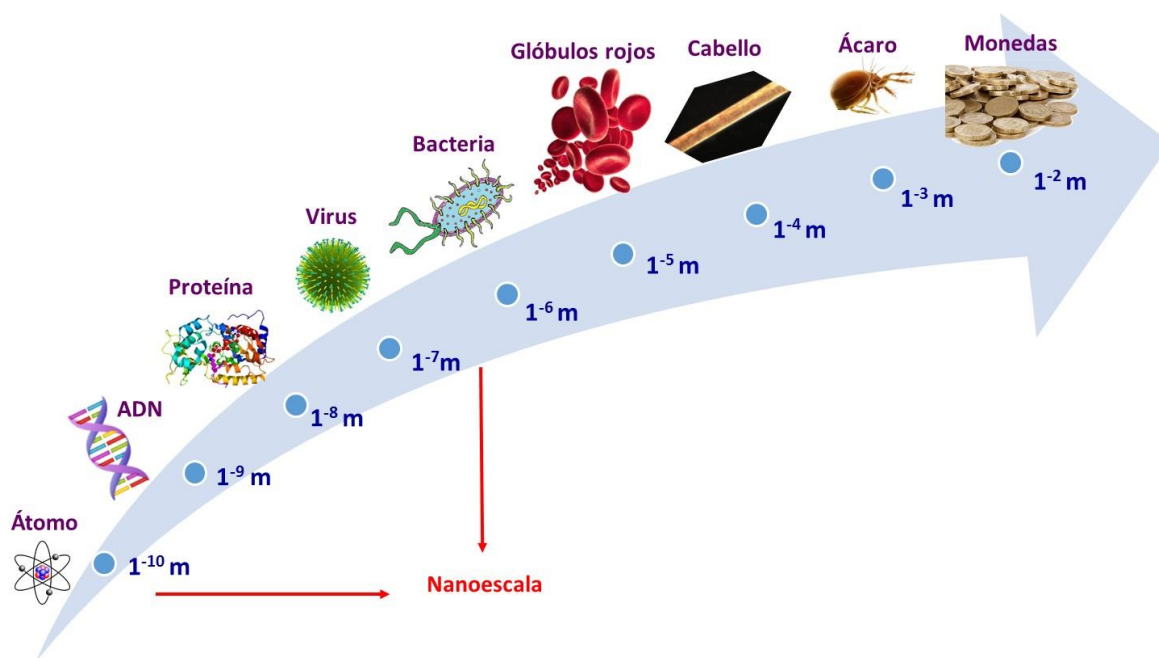
## 1.1 NANOTECNOLOGÍA

El término nanotecnología se refiere a la investigación y desarrollo de tecnología a la escala atómica y molecular que lleva a la manipulación controlada y el estudio de estructuras y dispositivos con al menos una de sus dimensiones en el rango de 1 a 100 nanómetros (ver figura 1) [12]. En general, las nanopartículas están definidas como partículas que se encuentran en un rango de 1-100 nm, formando ramificaciones entre 20 y 15000 átomos que presentan un comportamiento que se debate entre la física clásica y la cuántica [13], [14].

Las nanopartículas al estar únicamente un orden de magnitud por encima de las dimensiones típicas de los diámetros atómicos, presentan propiedades y funciones nuevas que difieren a aquellas observadas en una mayor escala. El aumento en la relación área-volumen de los nanomateriales puede convertir un compuesto inerte en escala micro en un compuesto catalíticamente activo en escala nano [15].

Las propiedades mejoradas de los nanomateriales conllevan a la incorporación de nanopartículas en productos de uso cotidiano como catalizadores, productos farmacéuticos, lubricantes, cosméticos, dispositivos electrónicos u otros aparatos domésticos [15]. La utilización de nanopartículas en medicina también se ha desarrollado rápidamente, como herramientas de imagen, agentes de fototerapia, portadores de genes, marcadores de biomoléculas, sistemas de entrega de fármacos, agentes antimicrobianos para el control de enfermedades, entre otros [16].

**Figura 1** Escala de dimensiones.



**Fuente:** Autor.

## 1.2 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Durante las últimas dos décadas se han venido desarrollando diferentes tipos de dispositivos a nanoescala capaces de alcanzar blancos antes inimaginables. Sin embargo, el diseño y síntesis de diversos tipos de nanocompuestos está determinado por la aplicación específica que se esté buscando. Entre los diferentes tipos de nanocompuestos ampliamente utilizados, se encuentran los materiales basados en metales y óxidos metálicos, que han sido ampliamente utilizados por sus excepcionales propiedades físicas, químicas y antimicrobianas.

Las nanopartículas debido a su tamaño y gran relación de superficie a volumen, presentan propiedades novedosas interesantes que incluyen comportamiento óptico no lineal, aumento de resistencia mecánica, aumento de la difusividad, alto calor específico, comportamiento magnético y resistividad eléctrica, entre otras. Adicionalmente, una interesante ventaja de las nanopartículas metálicas es la capacidad de modificar químicamente su superficie de manera que pueden

interactuar de forma específica con biomoléculas o sustratos de manera controlada. Las modificaciones superficiales de las nanopartículas metálicas también pueden afectar la aglomeración y agregación y su posterior estabilidad en función del tiempo y en función del entorno químico que las rodea [17].

Las principales nanopartículas metálicas que se han sintetizado han sido a partir de plata, oro, magnesio, paladio y óxidos de hierro, aluminio, silicio, titanio, zinc, estaño, cobre y cerio. Los nanomateriales metálicos pueden ser aplicados a una gran variedad de industrias dependiendo de la propiedad que se vea resaltada por cada material específico. Las nanopartículas de óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ), por ejemplo, al presentar “mejoramiento” de las propiedades ópticas y eléctricas han sido utilizadas en computación con el fin de reducir el tamaño y peso de las computadoras portátiles [12]. Las nanopartículas de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) catalizan procesos de descomposición de contaminantes orgánicos por lo que se utilizan para proteger películas delgadas de cristal en sensores ultrasensibles, pantallas flexibles de alto rendimiento, y dispositivos electromecánicos miniaturizados [18]. Las nanopartículas de óxido de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) adicionadas al hormigón pueden aumentar su fuerza y ofrecer una posibilidad de controlar los niveles de estrés a través de la medición de la sección de resistencia eléctrica.

### **1.2.1 Síntesis de nanopartículas de plata**

La nanotecnología y la química sintética moderna se han utilizado para desarrollar diferentes métodos para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs). Cada método tiene sus propias ventajas y limitaciones. Los parámetros que están influenciados directamente por el método de síntesis incluyen el diámetro promedio, la distribución de tamaño, la forma y la estabilidad, que a su vez también dependen de variables de reacción como la adición de agentes estabilizantes, concentración inicial de reactivos, temperatura, ausencia o presencia de luz, entre otros.

Mediante la manipulación de las condiciones experimentales (por ejemplo la temperatura, la concentración, la presencia de agentes estabilizantes), se puede controlar la cinética de la reacción de tal manera que los átomos de plata formen agrupaciones de dimensiones nanométricas [19]. Se ha publicado en la literatura una impresionante variedad de métodos muy novedosos e ingeniosos para la síntesis de AgNPs, aunque sólo unos pocos se han adaptado para la industria [20], [21]. La mayoría de estos métodos químicos y físicos para la síntesis de AgNPs requieren la adición de agentes estabilizantes para las nanopartículas en dispersión, o agentes protectores, de recubrimiento o ligandos. La estrategia más común es la protección de las nanopartículas con agentes protectores que pueden ser absorbidos o unirse a la superficie de las nanopartículas, para así evitar su aglomeración [22], [23].

### ***Reducción química***

La reducción química es el método más frecuentemente utilizado para la preparación de AgNPs en forma de dispersiones estables, coloidales en agua o disolventes orgánicos. Inicialmente, la reducción de los iones de  $\text{Ag}^+$  (provenientes de la sal de Ag) se da en presencia del agente reductor conduciendo a la formación de átomos de plata libres reducidos ( $\text{Ag}^0$ ), los cuales se asocian en grupos oligoméricos. Estos grupos pueden dar lugar a la formación de nanopartículas coloidales de plata [24]–[26]. El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones plata consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento. El proceso de nucleación requiere una energía de activación alta, mientras que el proceso de crecimiento requiere una baja energía de activación. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos, que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción, entre ellos: concentración, temperatura, pH, poder reductor, entre otras [27]–[29].

### ***Fotorreducción***

La fotorreducción iniciada por radiación ultravioleta (UV) es un método simple y efectivo para producir nanopartículas de plata y de oro en la presencia de citrato, y polivinilpirrolidona (PVP), poli ácido acrílico (PAA) y colágeno. La irradiación desintegra las AgNPs en tamaños más pequeños con un único modo de distribución homogénea estable y de tamaño uniforme. Al realizar este tipo de síntesis en presencia de iones citrato, la formación de nanopartículas de plata depende fuertemente de la longitud de onda de excitación que se aplique sobre la superficie de los electrones oscilantes de las partículas metálicas [30], [31].

### ***Microemulsión***

La síntesis de AgNPs en sistemas bifásicos acuosos-orgánicos se basa en la separación espacial inicial de los reactivos (precursor de metal y el agente reductor) en dos fases inmiscibles. La velocidad de interacción entre el precursor y el agente reductor es controlada por la interfase entre los dos líquidos. Las AgNPs formadas se estabilizan debido a que la superficie se recubre con moléculas estabilizantes en el medio acuoso no polar, y es transferido al medio orgánico por el transportador de la interfase, que generalmente consta de una sal cuaternaria de alquilamonio [32].

El método de microemulsión permite la preparación de nanopartículas de tamaño uniforme y controlable. Sin embargo, a menudo se emplean disolventes orgánicos altamente tóxicos. Así, grandes cantidades de surfactante y disolventes orgánicos que se añaden al sistema, se deben separar y eliminar del producto final. La ineficacia del método radica en los altos costos del proceso en las etapas de separación y purificación de las AgNPs [31].

### ***Método sonoquímico***

Es posible sintetizar nanopartículas de plata amorfas aproximadamente de unos 20 nm, por medio de una reducción sonoquímica en solución acuosa de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Un ultrasonido descompone el agua en iones hidrógeno e hidroxilo. Los iones hidrógeno reducen a los iones plata ( $\text{Ag}^+$ ), para después llevar a cabo la formación de cúmulos por medio de nucleación y así dar paso a la formación de las nanopartículas [33].

### ***Método electroquímico***

La disolución de un ánodo metálico en un solvente aprótico se ha utilizado para obtener nanopartículas de plata de 2 a 7 nanómetros. La aplicación de un campo eléctrico al sistema provoca la formación de iones en el ánodo los cuales viajan por la solución hasta el cátodo donde se reducen para después dar paso a la nucleación y con esto al crecimiento de la nanopartícula. En principio, cambiando la densidad de la corriente, es posible obtener diversos tamaños de nanopartículas de plata [17].

### ***Biosíntesis***

Recientemente, se han usado métodos de biosíntesis empleando métodos de química verde que usan agentes reductores biológicos naturales, tales como: polisacáridos, bacterias y extracto de hongos o plantas. Estas metodologías se han convertido en una alternativa simple y viable a los procedimientos de síntesis química más compleja para obtener AgNPs [31].

En estos métodos se añade a un sobrenadante microbiano la solución de nitrato de plata. Los agentes reductores presentes en el sobrenadante microbiano, tales como hidroquinonas, reducen la  $\text{Ag}^+$  a AgNPs en condiciones constantes (por ejemplo, temperatura). La desventaja de este método es la necesidad de purificar la muestra y

extraer las AgNPs del medio para que puedan ser implementadas en aplicaciones médicas [34].

### ***Síntesis verde***

Durante la última década, la mayor sensibilización hacia el cuidado del medio ambiente ha animado a los científicos a estudiar los métodos de síntesis de nanomateriales "más verdes". El uso de productos químicos no tóxicos, solventes más ecológicos y recursos renovables son aspectos importantes en la síntesis verde. Existe en la literatura una variedad de metodologías que utilizan agentes reductores ambientalmente benignos, tales como citrato de sodio, polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG), glucosa y en especial sacarosa [35]–[38]. Existen reportes de síntesis de AgNPs con sacarosa que describen procedimientos sencillos asistidos por microondas en tiempo continuo de irradiación mostrando un tamaño promedio de 2-15nm de AgNPs. Así mismo, otras metodologías muestran que variaciones en las temperatura, tiempo de calentamiento y concentración de NaOH, pueden influir en la síntesis de AgNPs empleando sacarosa como agente reductor obteniendo como resultado tamaños de partícula de 4-6 nm [39].

#### **1.2.2 Síntesis de nanopartículas de ZnO**

##### ***Ablación láser***

Mediante este método de síntesis se colocan láminas de Zinc en presencia de diferentes concentraciones de NaOH y a continuación se irradia verticalmente con un láser a 10Hz a una longitud de onda de 355nm con pulsos generalmente cada 7 segundos. Después de la ablación todas las soluciones se tornan turbias indicando la formación de las nanopartículas. Regularmente el haz de láser tiene 1,0 mm de diámetro y una intensidad de 100mJ/pulso para la ablación de una placa de Zinc durante 60 minutos [40].

### ***Deposición química de vapor***

En este tipo de síntesis se emplea un reactor asistido por metales nobles (generalmente el catalizador empleado es oro) en el cual se lleva a cabo la evaporación de zinc a altas temperaturas. La deposición química de vapor involucra la reacción química entre el zinc vaporizado y la fase gaseosa, que generalmente es oxígeno molecular. El producto de la reacción se condensa durante la formación de un material sólido (ZnO) dentro del recipiente de reacción donde se controlan la presión y el flujo de gas. Algunos parámetros tales como la temperatura de deposición, la presión parcial de oxígeno, el flujo de gas portador son factores importantes que influyen en el mecanismo de crecimiento que gobierna las características estructurales finales de nanoestructuras de ZnO [41].

### ***Método sol-gel***

Mediante la técnica de sol-gel se pueden obtener películas delgadas, nanocristales, nanocilindros de óxido de zinc. El precursor empleado en esta síntesis consiste en un metal rodeado de varios ligandos que reaccionen con él. Generalmente se emplean alcóxidos ya que reaccionan rápidamente en medios acuosos. Habitualmente se emplea acetato de zinc adicionando NaOH a 70°C mientras se observa la formación de una suspensión turbia. Posteriormente se agita alrededor de 5h antes de colocarlas en una mufla a 150°C durante 2h para eliminar el exceso de solvente. Esta reacción es dependiente del pH, la temperatura y el tiempo de reacción así como de la concentración de precursor y tiempo de secado, pues son variables que afectan directamente las propiedades particulares de las nanopartículas obtenidas [42].

### ***Descomposición térmica***

Inicialmente se mezclan acetato de Zinc con ácido acético dihidratado a temperatura ambiente, para después depositar la mezcla en una mufla a 450°C durante 30

minutos. Este es un método efectivo, de bajo costo sin embargo tiene como desventaja que requiere de altas temperaturas de calcinación [43].

### ***Pirólisis***

En este método a menudo se hacen reaccionar acetato de Zinc y carbonato de Hidrógeno a una determinada temperatura, de la cual depende el tamaño final de partícula. El subproducto de la reacción, de acetato de sodio, actúa como un material de recubrimiento para evitar un mayor crecimiento de las nanopartículas de ZnO. Una desventaja de este método es la presencia de impurezas restantes de precursores y productos de reacción que pueden actuar como donantes en la estructura cristalina de las nanopartículas de ZnO [44].

### ***Síntesis asistida mediante el uso de polioles***

El proceso de síntesis asistida por polioles consiste en la precipitación de partículas del óxido en presencia del poliol como solvente partiendo de una sal de Zinc. El rol del poliol en la reacción es crucial pues actúa simultáneamente como solvente, agente acomplejante y agente surfactante, de manera que se adsorbe en la superficie de los núcleos de óxido de zinc preformados para evitar la aglomeración de los mismos. La síntesis empleando polioles presenta como ventaja la obtención de ZnO con angosta distribución de tamaño, control de su morfología y alta pureza en la cristalinidad. Adicionalmente la mayoría de las rutas físicas para la síntesis de ZnO requieren altas temperaturas y equipos de alto costo, mientras que la técnica de síntesis asistida por polioles sólo necesita llegar a la temperatura de ebullición del poliol empleado. La morfología y tamaño de las nanopartículas de ZnO se ven fuertemente afectadas por parámetros como relación molar, la temperatura y la relación de hidrólisis, entre otras [45].

### 1.2.3 Propiedades de las nanopartículas metálicas

Entre las dimensiones en una escala atómica y las dimensiones milimétricas, la materia condensada exhibe algunas características específicas notables que pueden ser perceptiblemente diferentes de las características físicas de mismos materiales en dimensiones macroscópicas.

Cuando la materia se encuentra en escala nanométrica (entre  $10^{-9}\text{m}$  y  $10^{-6}\text{m}$ ) surge un comportamiento físico que no puede ser explicado con los conceptos de física clásica. La forma en que los nanomateriales interactúan entre sí y con su entorno se explica desde la mecánica cuántica, donde el confinamiento de la materia a regiones tan pequeñas permite la aparición de propiedades no observables en materiales macroscópicos.

Además del comportamiento cuántico, existen diversos factores que influyen en las propiedades de los nanomateriales, de los que se pueden nombrar el aumento en la fracción de átomos superficiales, gran energía superficial, e imperfecciones reducidas [17]. Entre los cambios en las propiedades físicas y químicas que más sobresalen cuando los materiales se encuentran en nanoescala, se encuentran:

- La fracción de átomos superficiales se incrementa, como consecuencia del aumento de la relación de área por volumen, lo que hace que los nanomateriales posean fuerzas no compensadas que derivan en una temperatura de fusión más baja que los materiales en macroescala. A modo de ejemplo, se puede citar el oro. El oro presenta una significativa reducción de la temperatura de fusión desde 10nm hasta 1 nm. Este efecto es inducido porque una partícula de 10 nm de diámetro tiene el 20% de átomos superficiales mientras que una partícula de 2 nm diámetro tiene el 80% de átomos superficiales [17].

- Las propiedades mecánicas de los materiales se ven mejoradas con la disminución de tamaño, incluso, son capaces de llegar a la resistencia teórica, gracias a la baja probabilidad de defectos a nanoescala.
- Las características ópticas de los nanomateriales pueden ser significativamente diferentes a las de los cristales. Por ejemplo, el máximo de la curva de absorción óptica de las nanopartículas semiconductoras cambia de lugar a una longitud de onda corta y el color de las nanopartículas metálicas cambia en función del tamaño de las mismas, debido a la resonancia de plasmones superficiales [17].
- Las nanopartículas metálicas presentan fuertes bandas de absorción en las regiones ultravioleta y visible (UV-VIS) del espectro electromagnético. Esta propiedad se debe a las oscilaciones colectivas de electrones de conducción del metal, cuando están excitados por un campo electromagnético incidente (CEI) de radiación. A esta propiedad se le denomina resonancia de plasmones superficiales (SPR). Entre los factores que en conjunto conducen a estas oscilaciones se encuentran: 1) aceleración de los electrones de conducción por el CEI, 2) fuerzas de restauración que resultan de la polarización inducida, y 3) confinamiento de los electrones a dimensiones más pequeñas que la longitud de onda de la luz. La longitud de onda exacta y la intensidad de la banda de absorción proporcionan importante información acerca del tamaño, forma, concentración y propiedades [17].
- La reducción del tamaño tiene consecuencias también en las propiedades ópticas y en particular en lo que se refiere al índice de refracción, que es una propiedad macroscópica que define justamente las propiedades ópticas de los materiales. Como las nanopartículas son más pequeñas que la longitud de onda de la luz visible, disminuye la dispersión de luz, obteniéndose una mayor claridad óptica.
- La conductividad eléctrica disminuye en una dimensión reducida debido a la dispersión de la superficie. Sin embargo, la conductividad eléctrica de los

nanomateriales puede también aumentar apreciablemente, debido al mejor ordenamiento de la estructura [17].

- Las características magnéticas de materiales nanoestructurados también son diferentes a las de los materiales a escala macroscópica. En algunos materiales el ferromagnetismo desaparece al pasar a la nanoescala, y el súper paramagnetismo aparece debido a la enorme energía superficial.
- La autopurificación es una característica termodinámica intrínseca de las nanoestructuras y de los nanomateriales. Cualquier tratamiento térmico aumenta la difusión de las impurezas, los defectos y las dislocaciones estructurales, desplazándolas fácilmente a la superficie más cercana, eliminándolas del nanomaterial.

Las características únicas de los materiales nanoestructurados y sus propiedades mejoradas están entonces determinadas por el tamaño, la estructura de la superficie y las interacciones entre partículas. Puede afirmarse que el papel que juega el tamaño en definir las propiedades finales de los materiales, es comparable al de la composición química [17].

#### **1.2.4 Propiedades antimicrobianas de las nanopartículas metálicas**

Se ha registrado ampliamente en la literatura que las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos exhiben efectos antimicrobianos frente a una gran variedad de microorganismos patógenos a diferentes concentraciones y que ésta actividad depende del tamaño promedio como se muestra en la recopilación bibliográfica de la tabla 1.

Se ha sugerido que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas está vinculada directamente con el tamaño promedio, forma y carga superficial de las mismas [3], [7], [46]. El tamaño de las partículas juega un papel importante en el estudio de la

actividad antimicrobiana de las nanopartículas. Se ha establecido que cuanto menor sea el tamaño de las nanopartículas, la actividad antimicrobiana se ve incrementada [47]. A pesar de que algunos resultados indican que tamaños por debajo de 50 nm, con carga superficial positiva y de forma esférica alcanzan el mayor efecto antimicrobiano, el mecanismo de acción de las nanopartículas no se encuentra completamente esclarecido [48].

**Tabla 1** Compilación de trabajos recientes sobre la actividad antimicrobiana de nanopartículas metálicas.

Microorganismo tratado	CMI (µg/ml)	Tipo de nanopartículas	Tamaño de partícula (nm)	Año	Referencias
<i>Escherichia coli</i>	75	AgNPs	10	2005	Morones <i>et al.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	75				
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.6	AgNPs	25-50	2006	Panacek <i>et al.</i>
SARM	6.7				
<i>Escherichia coli</i>	3.4				
<i>Escherichia coli</i>	120	AgNPs	4	2008	Ruparelia <i>et al.</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	40				
<i>Staphylococcus aureus</i>	120				
<i>Escherichia coli</i>	140	CuNPs	9	2009	Ayala-Nuñez <i>et al.</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	20				
<i>Staphylococcus aureus</i>	140				
<i>Staphylococcus aureus</i>	1350	CuNPs	---	2009	Lellouche <i>et al.</i>
SARM	1370				
<i>Escherichia coli</i>	1000	MgNPs	20-25	2009	Jin y He
<i>Staphylococcus aureus</i>	750				
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	>8	ZnONPs	20	2011	Jin y He
<i>Salmonella</i> Stanley	---				
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	3	MgONPs	20		

<i>Salmonella</i> Stanley	4				
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	34	AgNPs	3,5	2011	Rastogi <i>et al.</i>
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	34				
<i>Salmonella entérica</i>	42.5				
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	125	Ag-SiO <sub>2</sub> NPs	6,6	2011	Rastogi <i>et al.</i>
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	125				
<i>Salmonella entérica</i>	125				
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	250	ZnONPs	9-25	2011	Jha <i>et al.</i>
SARM	230				
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	45	ZnONPs	20-30	2011	Wahab <i>et al.</i>
SARM	45				
<i>Escherichia coli</i>	1000	ZnONPs	3-10	2012	Emami-Karvani <i>et al.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	500				
<i>Escherichia coli</i>	128	AuNPs	5-10	2013	Ahmad <i>et al.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	512				
<i>Escherichia coli</i>	8	AgNPs	25-30	2013	Kairyte <i>et al.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	32				
<i>Escherichia coli</i>	276.7	ZnONPs	200	2013	Kairyte <i>et al.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	81.4				
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	5.0	GO-AgNPs	8.5	2014	Fonseca de Farias <i>et al.</i>
<i>Escherichia coli</i> <i>multiresistente</i>	10	AgNPs	88.70	2014	Jeeva <i>et al.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>multiresistente</i>	10				

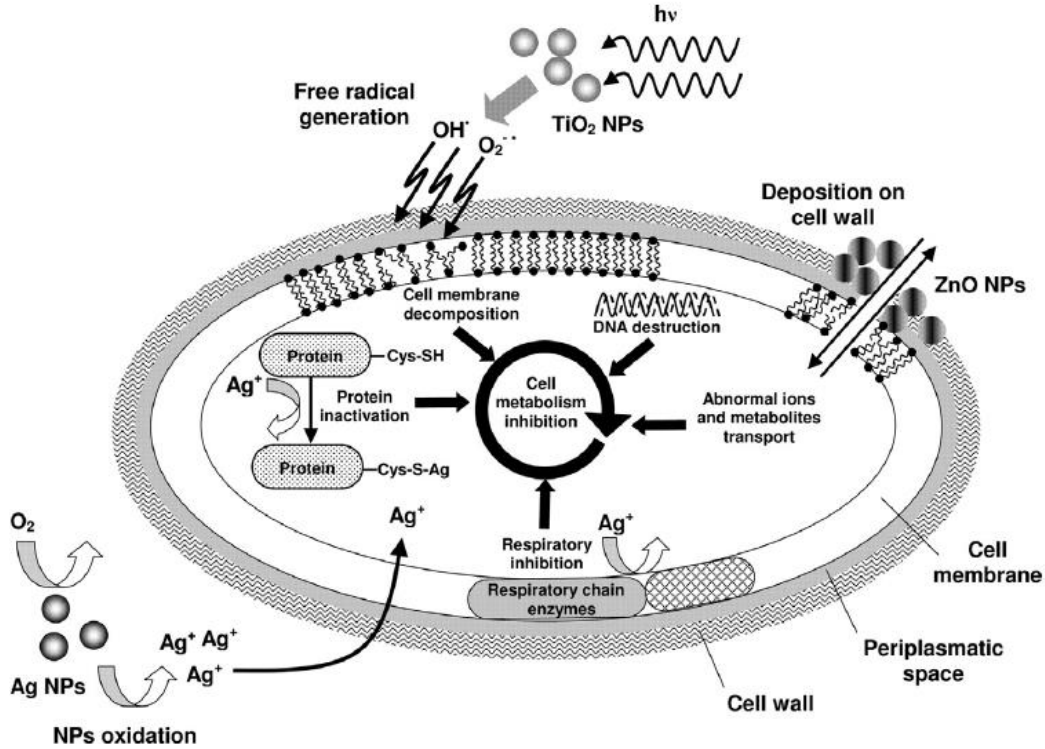
**Fuente:** Autor.

En general, se ha establecido que en la superficie de nanopartículas de óxidos metálicos como ZnO y TiO<sub>2</sub> se podría dar la formación de radicales libres que

interactuarían con la membrana bacteria conllevando al daño en los lípidos, que en consecuencia podrían conducir a la fuga de contenidos intracelulares y la ruptura celular [49], [50]. Las nanopartículas entran en la pared celular de los microorganismos a través de las proteínas transportadoras o canales de iones y se unen a diferentes orgánulos interfiriendo de este modo los procesos metabólicos como resultado de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) [51].

Con respecto a la nanopartículas metálicas, se ha evidenciado que la plata presenta mayor actividad antimicrobiana que otros metales [52]. Se han sugerido tres vías de interacción de las nanopartículas de plata con la bacteria. En primer lugar, se ha propuesto que las AgNPs interactúan con la pared celular de la bacteria, provocando la lisis de la misma. Este hecho conlleva a una mayor permeabilidad en la pared celular dejando a la célula bacteriana incapaz de la regulación del transporte a través de la membrana plasmática, lo que culmina con la muerte celular [52]–[54]. Otros estudios sugieren que las AgNPs no se unen selectivamente a algunas proteínas de membrana, sino a un amplio espectro de dianas que incluyen la membrana, proteínas citoplasmática y plásmidos de ADN bacteriano [55], [56]. Actualmente, el mecanismo más aceptado de acción de las AgNPs es que éste se da por un efecto combinado, en el que cada mecanismo propuesto (interacción con la pared celular, ADN citoplasmático y proteínas bacterianas) contribuye a proporcionar una mayor actividad bactericida [34] como lo muestra la figura 2.

**Figura 2** Esquema del mecanismo de acción de las Nanopartículas [57].



**Fuente:** Moritz *et al*, 2013.

### 1.3 ENCAPSULACIÓN DE AGENTES ACTIVOS EMPLEANDO BIOPOLÍMEROS

En nanotecnología, la búsqueda de polímeros para aplicaciones biomédicas ha experimentado un importante avance durante las últimas tres décadas, sobretodo en el estudio y desarrollo de polímeros sintéticos así como de componentes importantes de matrices utilizadas como vectores de moléculas terapéuticas. Entre los polímeros sintéticos se destacan los poliésteres, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad.

El poliéster más empleado es el ácido poliláctico (PLA) y su copolímero formado por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico (PLGA), ya que han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration* por sus siglas en inglés) para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral. Otros polímeros empleados para la obtención de nanopartículas son la poli- $\epsilon$ -caprolactona,

el poli- $\beta$ -hidroxibutirato y el ácido  $\beta$ -L-málico. Así mismo, se han evaluado polímeros de origen natural que también presenten propiedades como agentes encapsulantes y de éstos el más utilizado es el quitosano. Este polímero es polisacárido natural obtenido a partir de la concha de los crustáceos derivado de la quitina. En el presente trabajo se emplearon los tres biopolímeros anteriormente mencionados como agentes encapsulantes. Las estructuras se presentan en la figura 3.

### **1.3.1 Polímeros empleados como agentes encapsulantes**

El polímero empleado para encapsular las nanopartículas afecta de manera importante a las propiedades y estructura de las partículas y condiciona sus posibles aplicaciones, así como la vía de administración [58]. Se ha establecido que variables como la concentración del polímero juegan un papel muy importante en la forma y el porcentaje de encapsulación de los nanocompuestos sintetizados. El uso de copolímeros como el PLGA, como agente encapsulante permite modificar el peso molecular, su grado de hidrofilia y la proporción de cada uno de los monómeros lo que conlleva al control de la velocidad de degradación de los mismos, el grado de encapsulación y el de liberación del fármaco o principio activo [59].

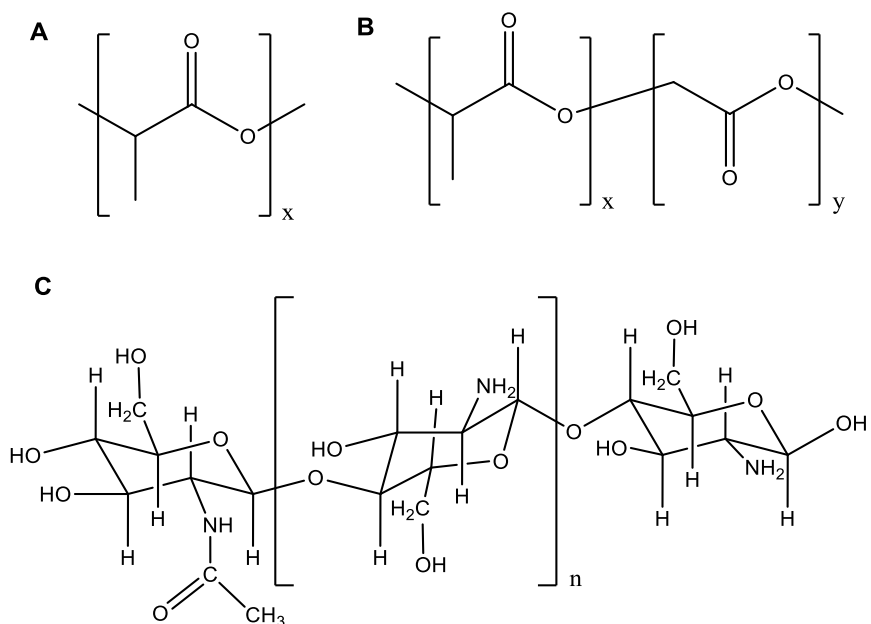
#### PLA

El ácido poliláctico (PLA) es un poliéster lineal alifático constituido por monómeros del ácido láctico. El PLA existe en dos isómeros ópticamente activos: ácido L(+)-láctico y ácido D(-)-láctico, los cuales son parcialmente cristalinos, mientras que su mezcla racémica es amorfa. Generalmente ha sido más empleado el ácido L(-)-láctico pues se puede degradar como ácido láctico endógeno en el cuerpo [60]. La solubilidad del PLA depende de la cristalinidad y del peso molecular del polímero. Los enantiómeros de PLA son insolubles en solventes miscibles con el agua como la acetona, pero solubles en solventes orgánicos como cloroformo y diclorometano. Sin embargo, PLA de bajo peso molecular es más hidrofílico y por tanto es ligeramente soluble en medios acuosos [61].

La producción de nanopartículas de PLA se ve condicionada por los diversos factores que afectan su degradación. La presencia de enlaces tipo éster hace que el PLA sea propenso a degradación hidrolítica en medios acuosos. El ácido láctico producto de la degradación del PLA es biocompatible y metabolizable en el cuerpo pues entra en el ciclo del ácido cítrico [60]. Entre los principales factores que afectan la degradación de nanopartículas de PLA se encuentran la cristalinidad, el peso molecular, la naturaleza del medio y la morfología de las partículas. El PLA enantiomérico se degrada lentamente, mientras que el PLA de bajo peso molecular se degrada rápidamente ([62]–[64]).

Además el pH del medio juega un papel muy importante. A pH neutro (en tampones de pH 7.4) en ausencia de enzimas, se ha encontrado que las nanopartículas y micropartículas de PLA pueden ser estables hasta por diez días. Por el contrario, la velocidad de degradación aumenta cuando las nanopartículas se introducen en fluidos intravenosos, gástricos e intestinales debido a la hidrólisis catalizada por enzimas [65]–[67].

**Figura 3** Estructuras de polímeros empleados para encapsulación de principios activos. **A)** Ácido poliláctico (PLA). **B)** Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) **C)** Quitosano (QTS).



**Fuente:** Autor.

## PLGA

El PLGA es un copolímero conformado por unidades de ácido poli-láctico y ácido poliglicólico que ha sido ampliamente utilizado para la síntesis de nano y micropartículas debido a su biocompatibilidad. El PLGA también es biodegradable por lo que al sufrir hidrólisis, sus correspondientes monómeros no presentan toxicidad sistémica y pueden pasar directamente a las rutas metabólicas del organismo [68].

El precursor ácido poliglicólico (PGA) no contiene grupos metilo laterales, por lo que presenta una estructura más cristalina que el PLA. Cuando el porcentaje de PLA es alto en el PLGA, el copolímero tendrá un alto contenido de cadenas saturadas y grupos metilos laterales, por lo que presentará baja solubilidad en solventes polares próticos, mientras que sí es soluble en solventes no próticos como tetrahidrofurano (THF), acetato de etilo, diclorometano (DCM), cloroformo, entre otros [69].

En medios acuosos el PLGA se biodegrada por hidrólisis en los enlaces tipo éster. Sin embargo, a mayor contenido de PLA el copolímero se degradará más lentamente debido a su naturaleza menos hidrofílica. La velocidad de degradación del PLGA influye directamente sobre las velocidades de liberación y de degradación de las moléculas bioactivas encapsuladas. Las propiedades físicas del PLGA dependerán de múltiples factores incluyendo el peso molecular inicial, la relación de ácido láctico a glicólico, el tamaño del nanomaterial diseñado, la exposición al agua y la temperatura de almacenamiento [70].

La resistencia mecánica, la capacidad de resistir la hidrólisis y, posteriormente, la velocidad de biodegradación del polímero están directamente influenciadas por el grado de cristalinidad del PLGA, que depende más del tipo y la relación molar de los componentes monoméricos individuales en la cadena de copolímero. El polímero cristalino PGA, cuando se copolimeriza con PLA, reduce el grado de cristalinidad de PLGA y como consecuencia aumenta la velocidad de hidratación e hidrólisis. Como regla general, un mayor contenido de PGA conduce a tasas más rápidas de la

degradación con una excepción de una proporción de 50:50 de PLA/PGA, que exhibe la degradación más rápida. Un mayor contenido de PGA conduce a un mayor intervalo de la degradación por debajo de 50%. El grado de cristalinidad y punto de fusión de los polímeros están directamente relacionadas con el peso molecular del polímero [69].

### Quitosano

El quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. La quitina y el quitosano son biopolímeros que en los últimos años han encontrado gran cantidad de aplicaciones, especialmente en la industria alimentaria y en la biotecnológica [71]. Las propiedades funcionales de los nanocompuestos del quitosano se encuentran condicionadas especialmente por el grado de desacetilación y por el peso molecular promedio del mismo [72].

El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano es lo que se denomina grado de desacetilación y está estrechamente vinculado con su solubilidad. Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo, se aumenta la capacidad hidrofílica del quitosano y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluídas (acético fórmico, clorhídrico, entre otros) ya que el pKa del grupo amino del quitosano es de 6,5 [72]. La protonación de los grupos amino del quitosano en medio ácido le confiere un carácter altamente reactivo.

El quitosano es un polímero formado por unidades repetidas de D-glucosamina, por lo que la longitud de la cadena y, por tanto, su peso molecular, es una característica importante de la molécula. Debido a su carácter catiónico y a sus propiedades gelificantes y filmogénicas, el quitosano ha sido estudiado en la industria farmacéutica por su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos [73], [74]. Constituye un vehículo para la encapsulación del fármaco, protegiéndolo y liberándolo de forma controlada, además de promover su absorción a través del epitelio. Así mismo, el quitosano presenta propiedades necesarias para su uso en

dicha industria, como son su biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad. La toxicidad del quitosano por vía oral es baja; se ha descrito una LD<sub>50</sub> (dosis letal para el 50% de un conjunto de animales de prueba) de 16g/Kg en ratas [75].

### **1.3.2 Métodos de síntesis de nanopartículas poliméricas**

En la literatura se encuentra una amplia variedad de técnicas que permiten la obtención de nanopartículas de polímeros de diferente naturaleza [76]–[80] . En general, la mayoría de métodos se rigen por un primer paso en el que se pueda atrapar el principio activo inmerso en una fase diferente y/o igual en la que se encuentra el polímero. Seguido a esto puede venir la inclusión de un agente estabilizante que evite la agregación de las nanopartículas recién formadas. Posteriormente se da la eliminación del solvente ya sea por evaporación con temperatura o al vacío o por ultracentrifugación. Finalmente las nanopartículas obtenidas sufren un proceso de purificación que puede realizarse mediante lavados, centrifugación, ultracentrifugación, separación por filtros, entre otros.

#### **1.3.2.1 Métodos para la síntesis de nanopartículas de PLA y PLGA**

Debido a que la naturaleza química del PLGA y el PLA es muy similar, la mayoría de metodologías publicadas para la obtención de nanopartículas de PLA para la encapsulación de un agente activo, son las mismas que para nanopartículas de PLGA [81]–[83] . Las principales metodologías empleadas en la preparación de nanopartículas de PLGA incluyen emulsiones con diferente forma de separación del solvente, nanoprecipitación, precipitación con sales, deposición interfacial, entre otras [61]. La mayoría de estas técnicas han sido descritas con base a la naturaleza del agente activo, si es hidrofílico o hidrofóbico. Sin embargo, para el caso de encapsulación de nanopartículas metálicas, que se encuentran en un sistema acuoso coloidal, las referencias son más escasas y las estrategias que se utilizan están relacionadas a los métodos empleados para la encapsulación de agentes activos hidrofílicos (ver tabla 2).

**Tabla 2** Encapsulación de agentes activos, incluidas nanopartículas en matrices poliméricas, en las últimas tres décadas.

Año	Método	Polímero	Agente activo	Tamaño	Porcentaje de encapsulación	Referencias
1989	Nanoprecipitación	PLA	taxol	260-20	100	Fessi <i>et al.</i>
1999	Nanoprecipitación	PLGA	Vancomicina	186,9	12,1	Baarichello <i>et al.</i>
2009	Deposición al vacío	Poliéstero	AgNPs (10-250nm)	200 ap.	---	Kumbhar <i>et al.</i>
2009	Nanoprecipitación	PLA		228-365	---	Rancan <i>et al.</i>
2009	W/O/W	PLGA	betametasona	>100	14	Ishihara <i>et al.</i>
2009	W/O	PLGA	Vincristine	98,8-8,4	67,8-5,10	Song <i>et al.</i>
2010	Nanoprecipitación	PLGA	Levofloxi na	80-30	15	Cheow <i>et al.</i>
	W/O			190-50	16	
	W/O/W			190-80	10	
2011	Reducción de Tollens modificado	Glucógeno	AgNPs		---	Bozanic <i>et al.</i>
2011	Solvent casting	PLGA	AgNPs		---	Fortunati <i>et al.</i>
2011	W/O	PLGA	MnONPs	140-50	157	Bennewitz <i>et al.</i>
2012	Nanoprecipitación	PLGA	AgNPs (15-30 nm)	811-5	---	Stevanovic <i>et al.</i>
2012	W/O/W	PLGA	CNPs	60 000	74	Singh <i>et al.</i>
2012	W/O	PLGA	Colato Na	116	---	Chen <i>et al.</i>
2013	W/O/W	CS- PLA	Rifampici na	220	57	Rajan <i>et al.</i>

2014	W/O/W	PLGA	AgNPs	775	---	Stevanovic et al.
------	-------	------	-------	-----	-----	-------------------

**Fuente:** Autor.

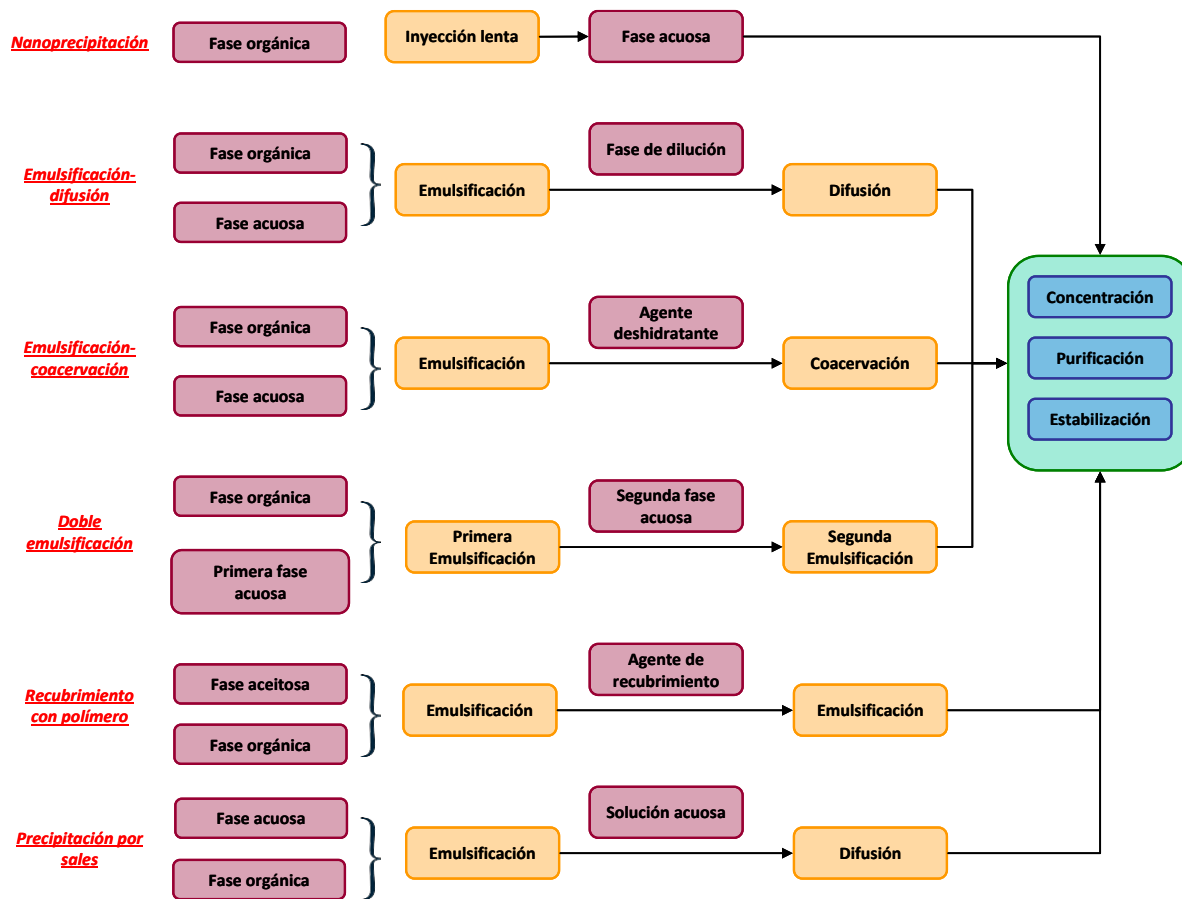
El proceso de distribución entre las fases participantes de cada uno de los métodos de síntesis de nanopartículas poliméricas más empleados, así como el proceso de separación se encuentran esquematizado en la figura 4.

#### Proceso de emulsión simple-difusión

En el método de emulsificación-difusión, el PLGA se disuelve en un solvente orgánico, mientras que en la fase acuosa, que contiene el agente activo y luego se realiza la emulsificación en un homogeneizador. La fase interna de la emulsión se añade sobre la fase externa acuosa, en la que se disuelve un agente tensoactivo que proporciona estabilidad a la emulsión. Posteriormente se realiza la eliminación del solvente orgánico ya sea bajo condiciones de presión reducida o por evaporación a presión atmosférica. Las nanopartículas obtenidas son finalmente lavadas para retirar excesos de agente estabilizante y polímero que no formó nanopartículas. La clave de esta técnica radica en la elección del solvente adecuado para el polímero, pues es necesario que no sea completamente inmiscible con agua para que se pueda dar la difusión hacia la fase acuosa que contiene el agente activo y agente estabilizante.

El polivinil alcohol (PVA) ha sido el agente estabilizante más empleado a la hora de preparar nanopartículas biodegradables a partir de poliésteres. Se ha observado que el incremento en la concentración del agente estabilizante produce una disminución del tamaño de las nanopartículas para concentraciones de PVA inferiores al 10%, punto a partir del cual el tamaño empieza a aumentar [84].

**Figura 4** Esquema del proceso de los principales tipos de síntesis de nanopartículas poliméricas (Adaptado de Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2010).



**Fuente:** Adaptado de Mora-Huertas, Fessi, y Elaissari, (2010).

### Método de doble emulsión- evaporación

El método de emulsión de agua-en-aceite-en-agua (W/O/W) es el más adecuado para encapsular agentes activos solubles en agua como péptidos, proteínas y vacunas, a diferencia de los métodos de emulsión individuales que son ideales para fármacos insolubles en agua como los esteroides. En primer lugar, se disuelve una cantidad apropiada de fármaco en la fase acuosa (agua desionizada) y a continuación se añade esta solución de agente activo a la fase orgánica que consta del polímero en diclorometano (DCM) o cloroformo con agitación vigorosa para producir una emulsión de agua-en-aceite generalmente por medio de ultrasonido. A continuación, se añade la emulsión primaria de agua en aceite a una solución acuosa que contiene el agente estabilizante y posteriormente se lleva a cabo la segunda emulsión durante menor

tiempo y mayores condiciones de agitación. La eliminación del solvente viene dada empleando presión reducida, siendo más favorable que la evaporación del solvente por calentamiento pues garantiza la formación de nanopartículas más homogéneas [86], [87].

A pesar de que la ultrasonificación ha sido ampliamente empleada como método para homogenizar, presenta una serie de inconvenientes tales como posible elevado índice de polidispersión del tamaño de las nanopartículas, inducción de reacciones químicas de degradación y dificultad de elaboración a gran escala [88]. La mayoría de disolventes empleados en esta técnica son organoclorados, principalmente diclorometano y cloroformo, por su inmiscibilidad en agua, fácil emulsificación, propiedades de solubilización y bajo punto de ebullición. La formación de la primera emulsión es un aspecto fundamental del método, ya que puede considerarse que el tamaño de la gotícula que se forma en la emulsión está directamente relacionado con el tamaño final de la partícula [89].

### Nanoprecipitación

En el método de nanoprecipitación tanto el polímero como el agente activo se encuentran en la misma solución, generalmente un solvente polar no prótico como la acetona. A continuación esta mezcla se agrega sobre una solución que puede contener un agente estabilizante bajo agitación magnética. Esta segunda solución debe estar disuelta en un solvente que cumpla con una importante característica: que sea miscible con el disolvente pero insoluble con el polímero, de manera que éste precipite. Las nanopartículas se forman instantáneamente por una rápida difusión del disolvente al medio acuoso, el cual se elimina posteriormente de la suspensión sometiéndola a presión reducida.

La utilidad de esta técnica está limitada a disolventes miscibles en agua, en los cuales el ritmo de difusión es lo suficientemente rápido como para producir la emulsificación espontánea. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es la dificultad de elección del sistema fármaco/polímero/disolvente/no-solvente en el cual se formen las

nanopartículas. Además, esta técnica únicamente es útil para principios activos solubles en este tipo de disolventes como pueden ser la indometacina, ciclosporina A o 5-fluorouracilo [90].

#### Método de precipitación por sales

El método de precipitación por sales o “*salting out*” emplea agentes electrolitos que permitan la separación de solventes miscibles en agua de la solución acuosa. Generalmente se emplea la acetona como solvente del polímero y del agente activo, que a continuación se emulsionará sobre un gel acuoso que contiene los electrolitos y un estabilizante. Esta emulsión se adiciona sobre una gran cantidad de solución acuosa de manera que se presente la difusión de la acetona hacia la fase acuosa, induciendo así la formación de nanoesferas. El mecanismo de formación de las nanopartículas se asemeja en cierto modo a la nanoprecipitación. Así, la difusión de la acetona desde las gotículas durante el paso de dilución puede generar turbulencias en la interfase y la precipitación del polímero en forma de nanopartículas [91]

#### **1.3.2.2 Métodos para la síntesis de nanopartículas de quitosano**

Para la preparación de nanopartículas de quitosano existen cuatro métodos a saber: gelificación ionotrópica, microemulsión, emulsificación-difusión de solvente y por formación de complejos con polielectrolitos. El proceso de gelificación ionotrópica está gobernado por una interacción entre los grupos amino libres del quitosano y cargas negativas de los grupos polianiónicos como el tripolifosfato. Para el proceso de microemulsión, un surfactante se disuelve en un solvente orgánico como n-hexano, mientras que el quitosano se disuelve en ácido acético para posteriormente formar una mezcla en presencia de glutaraldehído bajo condiciones de agitación vigorosa. La formación del complejo se da por el autoensamblaje entre el polímero catiónico y un plásmido de ADN; en este método las nanocápsulas se forman espontáneamente después de la adición de la solución del ADN sobre el quitosano disuelto en ácido acético bajo agitación a temperatura ambiente [58].

Otro método de obtención de micropartículas y nanopartículas es secado por aspersión o atomización, que ha sido utilizado en las industrias farmacéuticas y de alimentos para encapsular principios activos e ingredientes alimenticios [72], [92]. En este procedimiento el agente activo y el encapsulante se homogenizan en una misma fase que a continuación se pasa para su atomización a altas temperaturas y posterior proceso de secado. Las ventajas de este método incluyen que es un proceso de una sola etapa, es de bajo costo, no requiere solventes tóxicos, produce partículas de tamaño pequeño y se puede utilizar para agentes activos sensibles al calor con naturaleza hidrofílica o hidrofóbica. Los parámetros del proceso de atomización, como son el tipo de aguja, la velocidad de la bomba y el flujo de aire comprimido, permiten modular el tamaño de partícula [93].

#### **1.4 MICROORGANISMOS PATÓGENOS**

Desde el momento que se dio el avance en la medicina con el desarrollo de antibióticos y su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas, se mejoró en gran medida el nivel de vida de la humanidad. Sin embargo, el abuso de estos medicamentos dio lugar al surgimiento de microorganismos resistentes que actualmente son considerados un gran problema de salud pública a nivel mundial (World Health Organization, 2004a). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las infecciones bacterianas más comunes son aquellas en las que el problema de resistencia a antibióticos es más evidente: diarreas, infecciones del tracto respiratorio, meningitis, infecciones de transmisión sexual e infecciones nosocomiales (World Health Organization, 2004a). Las personas infectadas con microorganismos resistentes a antibióticos, tienden a permanecer por más tiempo en los hospitales y requieren un tratamiento con dos o tres antibióticos que puede resultar menos efectivo, más tóxico y más caro. Este hecho constituye un problema de salud pública de distribución mundial el cual además tiene implicaciones importantes desde el punto de vista económico y social [94].

### 1.4.1 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM o MRSA por sus siglas en inglés) es un patógeno de gran importancia en el sector salud que no se ha podido eliminar del ambiente hospitalario ni de la comunidad [95]. En los humanos, *Staphylococcus aureus* produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados, infecciones en sistema nervioso central, osteomielitis, endocarditis invasora, artritis séptica, septicemia, neumonía e infecciones del tracto urinario [95]. Una bacteremia causada por *S. aureus* produce entre el 25 y 63% de mortalidad [96].

En 1960, en el Reino Unido se aisló la primera cepa de *S. aureus* resistente a meticilina, sólo un año después de que este fármaco empezó a ser utilizado como alternativa a las penicilinas. En la actualidad, las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencias, que incluye a más de dieciséis tipos de antibióticos. En lo particular, la resistencia a meticilina se debe al gen *mecA*, que codifica para la proteína PBP2a, la cual presenta baja afinidad por la meticilina y todos los  $\beta$ -lactámicos [96].

Las infecciones causadas por SARM son de gran importancia clínica por su alta tasa de morbilidad y mortalidad y, por ser la principal causa de infecciones nosocomiales a nivel mundial [96]. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, en varios países asiáticos la incidencia actual del SARM es del 70-80% de los aislados de *S. aureus* totales (World Health Organization, 2004b). El Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (National Nosocomial Infectious Surveillance System, NNIS por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos determinó que, en pacientes hospitalizados, la prevalencia de cepas de SARM se incrementó del 4% en 1980 al 60.7% en 2004. En algunos hospitales estadounidenses se han reportado incidencias hasta del 80% [96]. En México, se han registrado centros hospitalarios con una resistencia global a meticilina del 24% [95]. De hecho, se ha descrito que las tasas de infección por SARM se ven incrementadas en las unidades de cuidados intensivos en Asia, África, Europa y principalmente en América Latina [97]–[99]. En Colombia se demostró la presencia de individuos sanos colonizados por cepas de SARM

productoras del factor de virulencia de Panton-Valentine Leucocidina con una alta incidencia por un estudio realizado en 2010 (PVL) [100].

#### **1.4.2 *Candida albicans***

Una levadura que ha presentado resistencia a los antimicóticos y ha sido ampliamente estudiado es *Candida albicans*, un hongo que reside en las superficies mucosas de boca, aparato digestivo y sistema urinario en el 15% al 60% de los individuos sanos. Además, constituye un buen ejemplo de patógeno oportunista, productor de infecciones superficiales y sistémicas en pacientes inmunodeprimidos [101].

La incidencia global de las infecciones nosocomiales ha aumentado en la mayoría de los hospitales, pero, en los últimos años, las producidas por *Candida spp.* han presentado un incremento mucho mayor, siendo la candidemia la forma de infección nosocomial por levaduras más frecuente [102]. Sin embargo, su tasa de incidencia global es difícil de precisar puesto que depende del grado de especialización del hospital. En los hospitales terciarios el incremento de su incidencia, comparada con la observada en la década de 1980, es superior al 500%; pero en los hospitales europeos, es considerablemente inferior (75%) [102]. No obstante, la incidencia está aumentando globalmente en todos los hospitales y en todas las unidades, estimándose que el 5% de los pacientes hospitalizados desarrolla una infección nosocomial y de éstas el 5% son debidas a alguna especie de *Candida*.

En España, según el estudio multicéntrico Sepsis Data el 72,1% de los casos de fungemia fue de origen nosocomial, con una tasa de mortalidad del 33,3% [102]. En Estados Unidos, *Candida spp.* es el cuarto microorganismo más frecuentemente aislado en las sepsis, produce el 8% de las mismas, con una tasa de mortalidad del 38%; en este país, el 85,6% de las micosis nosocomiales son debidas al género *Candida* [102].

Se han descrito tres posibles mecanismos de resistencia en *Candida albicans*; el primero es la modificación de la enzima blanco; el segundo, la incapacidad de alcanzar concentraciones adecuadas del antibiótico en el sitio de acción por la presencia de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo activo; y por último, la inactivación del antibiótico por modificación del mismo. De todos éstos, en el caso de los azoles sólo se conocen los dos primeros como potenciales causas de resistencia.

En las especies de *Candida* y en muchos otros hongos, el gen ERG11 se encarga de la síntesis de la Erg11p o la enzima 14  $\alpha$ -demetilasa indispensable para la síntesis del ergosterol. La resistencia a los azoles se ha descrito en aislamientos clínicos en los que se demuestra una disminución de la expresión de dicha enzima o la presencia de mutaciones específicas que la afectan en su estructura o función; y puede ser inducida por regulación negativa de su síntesis tras la exposición prolongada al fluconazol [103].

En la actualidad, la resistencia informada al fluconazol en especies de *Candida albicans* es cercana al 3%, con variaciones regionales y locales muy notorias. Un estudio realizado en Colombia, demostró resistencia al fluconazol del 20,8% en pacientes con infección en otofaringe para *Candida spp.* y 6,3% con patrón Sensible Dosis Dependiente (SDD) [104], [105].

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata y óxido de zinc nanoencapsuladas frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Candida albicans*.

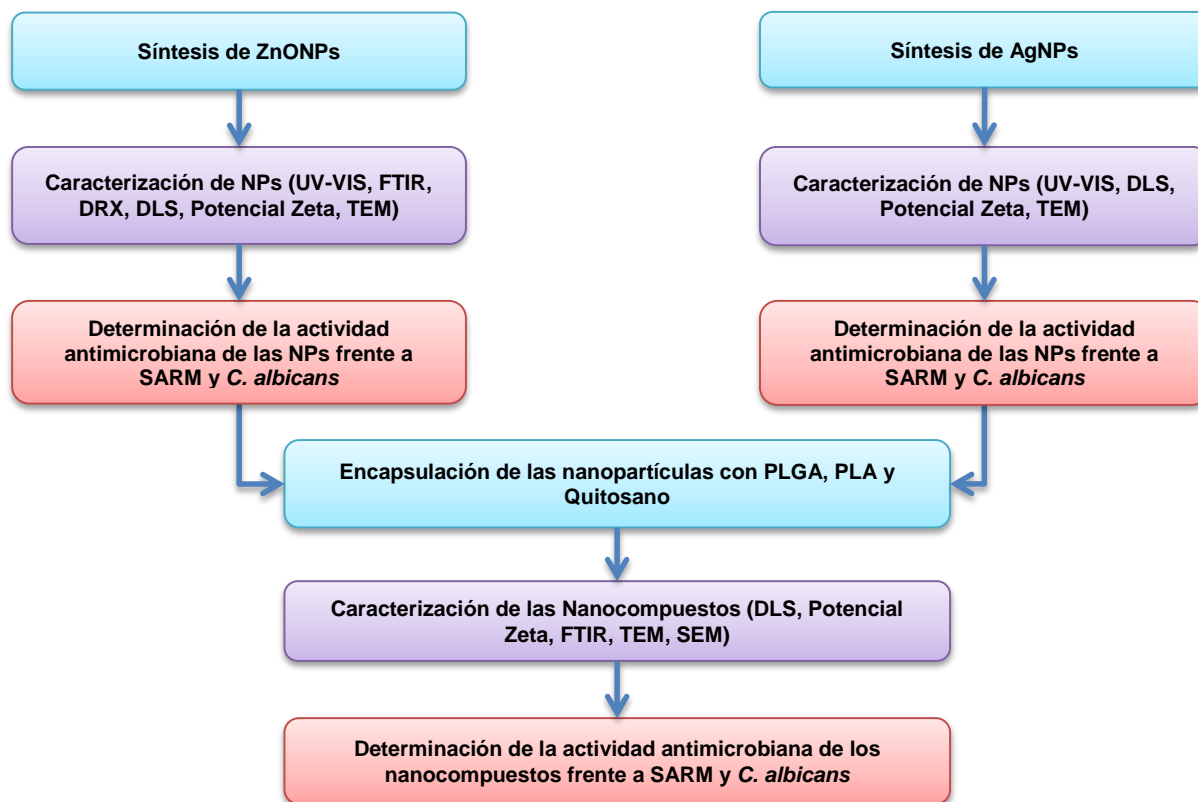
### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) y de óxido de zinc (ZnONPs) utilizando rutas de química verde empleando agentes reductores u oxidantes naturales no-contaminantes y condiciones suaves de reacción.
- Encapsular las nanopartículas metálicas utilizando tres sistemas de polímeros orgánicos biocompatibles.
- Caracterizar las nanopartículas metálicas libres y encapsuladas mediante técnicas de espectrofotometría UV-VIS, Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) y Dispersión de luz en modo dinámico (DLS).
- Determinar *in vitro* las concentraciones mínimas inhibitorias y microbicidas de las nanopartículas metálicas nanoencapsuladas frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Candida albicans*.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos, se planteó la metodología que se muestra en la figura 5. Inicialmente se obtuvieron dos sistemas de nanopartículas metálicas, de plata (AgNPs) y de óxido de zinc (ZnONPs) que fueron caracterizados por diversas técnicas espectroscópicas y microscópicas para posteriormente determinar su actividad antimicrobiana. A continuación se realizó la encapsulación en los tres biopolímeros: PLGA, PLA y Quitosano, que posteriormente también se caracterizaron. Finalmente se llevó a cabo la determinación de la actividad antimicrobiana de los nanocompuestos obtenidos.

**Figura 5** Metodología general para la tesis de investigación.



**Fuente:** Autor.

### 3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Los reactivos: nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ , 99.998%), acetato de zinc ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  99%), hidróxido de sodio (NaOH 95%) fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA 50:50, PM 38000-54000 Da), polivinil alcohol (PVA, 99+%), poloxamero 407, el ácido láctico (PLA 98%), polietilenimina (PEI %50 v/v en solución acuosa, PM 2000), glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  95%), maltosa ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  98%) gelatina (~50.000-100.000 Mw) fueron comprados de Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri). El quitosano empleado tiene un grado de desacetilación de 79.5% y peso molecular 129 KDa. Todos los reactivos usados eran de grado analítico y se emplearon sin purificación posterior. Las soluciones fueron preparadas con agua desionizada.

### 3.2 ADQUISICIÓN Y MANTENIMIENTO DE CEPAS

Las cepas patógenas *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) y *Candida albicans* fueron aisladas y donadas por el Hospital Universitario de Santander, Bucaramanga, Colombia. Para el mantenimiento de la cepa bacteriana se utilizó Agar de infusión de cerebro y corazón (BHI) realizando subcultivos mensuales a una temperatura de incubación de 37°C. Mientras que se utilizó Agar dextrosa saboreado (SDA) como medio de cultivo de mantenimiento de la levadura a una temperatura incubación de 35°C.

### 3.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

Inicialmente se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas que se utilizaron como agente activo en su posterior encapsulación con los tres tipos de polímero biodegradables. Se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) y óxido de zinc (ZnONPs) mediante reacciones de reducción química y sustitución respectivamente.

Para las AgNPs se empleó una ruta de síntesis verde donde se decidió variar el tipo de azúcar que actuó como agente reductor y su relación molar con respecto al precursor de plata. Mientras que para las ZnONPs se utilizó la síntesis asistida por polioles donde se varió el polirol empleado con el fin de observar el efecto sobre el tamaño final de las nanopartículas. Los demás parámetros de reacción en cada una de las síntesis ya fueron previamente establecidas en la literatura y en el presente trabajo se siguieron éstas condiciones de reacción determinadas.

### **3.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata**

La síntesis de AgNPs utilizando una ruta de síntesis verde se llevó a cabo con base a lo publicado en la literatura [106]. Inicialmente, se adicionó gelatina sobre agua desionizada hasta formar una solución translúcida bajo agitación a 40°C. Posteriormente se adicionó AgNO<sub>3</sub> (1M) lentamente con agitación controlada. A continuación se agregó una solución del azúcar (2M) y se mantuvo la reacción a temperatura constante de 75°C durante 24h en ausencia de luz. El progreso de la reacción fue monitoreado mediante espectrofotometría UV-VIS.

Se evaluó el poder reductor de dos azúcares: maltosa y glucosa y la influencia de la relación molar entre el agente reductor y el precursor de plata. Así pues, se obtuvieron cuatro tipos de AgNPs, empleando maltosa con una relación molar de 8:1 ó 4:1 (maltosa:plata) y utilizando glucosa con una relación molar de 8:1 ó 4:1 (glucosa:plata), respectivamente.

### **3.3.2 Síntesis de nanopartículas de ZnO**

En la síntesis de ZnONPs se empleó como precursor metálico acetato de Zn dihidratado disuelto en NaOH (11M) que posteriormente se adicionó sobre el solvente hasta completar un volumen final de 50 mL. La reacción se llevó a cabo en un balón con agitación suave constante y a una temperatura de 180°C durante 4h de acuerdo

a las condiciones establecidas en la literatura [45]. Al final de la reacción, el precipitado obtenido se centrifugó tres veces a 10000rpm durante 20 minutos con etanol para garantizar que no hay presencia de polímero que no haya reaccionado. Finalmente, el último lavado se realizó con acetona, que luego fue rotoevaporada y el precipitado recogido se secó en una mufla a 200°C durante 2h. Se evaluó la influencia del solvente en la síntesis de ZnONPs, de manera que se utilizó ditelilenglicol (DEG) o polietilenglicol (PEG) obteniéndose dos tipos de nanopartículas diferentes.

Para la obtención de las nanopartículas de ZnO se resuspendió el sólido obtenido en diferentes soluciones que contenían: un solvente adecuado (agua desionizada), agente estabilizante (citrato de sodio) y agente catiónico (polietilenimina) con el fin de encontrar las condiciones que permitieran conseguir nanopartículas de pequeños tamaños, carga superficial positiva y estables en función del tiempo.

### **3.4 ENCAPSULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS**

De acuerdo con lo que se ha demostrado en la literatura, la encapsulación exitosa de nanopartículas metálicas o cualquier principio activo depende de muchos factores, y uno de ellos, tal vez el más importante, es el método de encapsulación.

#### **3.4.1 Nanoencapsulación de nanopartículas utilizando PLGA**

Se realizó la encapsulación de nanopartículas de plata (AgNPs) y óxido de Zinc (ZnONPs) de acuerdo al método de doble emulsión-evaporación del solvente [86], [107], [108]. Inicialmente se solubilizó el PLGA en cierta cantidad de diclorometano (DCM) y a continuación se adicionaron las nanopartículas bajo agitación durante 20 minutos con el fin de crear la primera emulsión agua-aceite. A continuación, esta primera emulsión se adicionó sobre una solución acuosa que previamente contiene un agente estabilizante (Poloxamer 0,5%) y un agente catiónico (PEI 0,25%)

empleando un ultraturrax (15500 rpm) durante 10 minutos para obtener la segunda emulsión agua-aceite-agua (w/o/w).

Posteriormente se realizó la evaporación del solvente clorado bajo presión reducida a temperatura ambiente durante 45 minutos. Para separar las micropartículas que se hayan podido formar en el proceso, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos y finalmente se ajustó al pH que se encontró fue el más apto para obtener nanopartículas de carga superficial positiva y estables.

### **3.4.2 Nanoencapsulación de nanopartículas utilizando PLA**

La síntesis de nanopartículas de PLA se llevó a cabo siguiendo la metodología de doble emulsión con evaporación del solvente [86]. Las condiciones de reacción y de purificación al igual que las concentraciones de los reactivos se especifican en el apartado anterior.

### **3.4.3 Nanoencapsulación de nanopartículas utilizando Quitosano**

Se realizó la síntesis de nanocompuestos de quitosano cargados con nanopartículas de plata (AgNPs) y óxido de Zinc (ZnONPs) siguiendo la metodología de gelificación ionotrópica. Como describió Csaba y colaboradores [109], esta técnica se basa en la interacción entre polianiones cargados negativamente y las cargas positivas del quitosano. Para lograr un mayor entrecruzamiento, inicialmente se mezclaron las nanopartículas con el agente entrecruzante, tripolifosfato sódico (TPP) lentamente. A continuación y bajo vigorosa agitación se añadió gota a gota esta mezcla sobre una solución previamente preparada de quitosano en ácido acético al 2%. Se dejó avanzar la reacción durante dos horas manteniendo la agitación a temperatura ambiente. La suspensión resultante, se caracterizó visualmente como una

suspensión opalescente, lo cual indica la presencia de las nanopartículas que posteriormente se confirmó con dispersión de luz en modo dinámico (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Los nanocompuestos obtenidos se purificaron empleando una ultracentrífuga Sorvall RC 5B Dupont con tres ciclos de 30 minutos a 15000rpm y realizando tres lavados con agua desionizada bajo las mismas condiciones. Finalmente se liofilizaron los nanocompuestos con el fin de evitar su pronta degradación en medio acuoso y se guardaron en ausencia de luz a temperatura ambiente.

### **3.5 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y ENCAPSULADOS**

Se emplearon técnicas microscópicas especiales como microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM). Estas técnicas son muy útiles ya que dan imágenes directas de los nanomateriales. De igual manera la dispersión de luz en modo dinámico (DLS) también permitió la observación de la formación de nanocompuestos y su nivel de polidispersión en solución acuosa.

Además se emplearon técnicas basadas en el uso de los rayos X; como la dispersión de rayos X que da información indirecta de la morfología en volumen del sistema. Estas técnicas se complementaron con aquellas convencionales como la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopia ultravioleta y visible (UV-VIS). El uso conjunto de estas técnicas permitió una caracterización completa de los sistemas a nanoescala y es fundamental para comprender, diseñar y construir dispositivos nanotecnológicos.

#### **3.5.1 Dispersión de luz en modo dinámico (DLS)**

Las nanopartículas de Ag y ZnO fueron caracterizadas por dispersión de luz en modo dinámico (DLS) con un equipo Mastersizer 2000 de Malvern (UK) del Laboratorio de

Instrumentación química de la Universidad Industrial de Santander. Se necesitó un volumen de muestra de 1.5 mL de solución coloidal de AgNPs de un rango de concentración de 100-200ppm.

### **3.5.2 Potencial Zeta**

Las nanopartículas y los nanoencapsulados fueron analizadas por el equipo mencionado anteriormente que también mide el potencial Zeta de las partículas en dispersión (Mastersizer 2000 de Malvern). Se introdujeron 800  $\mu\text{L}$  de la muestra coloidal en la celda atravesada por un potencial de 150V. Se utilizó el programa Zetasizer software con el fin de medir la magnitud de la repulsión o atracción entre las nanopartículas. Su medición aporta información detallada sobre el mecanismo de dispersión y es la clave para controlar la dispersión electrostática.

### **3.5.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las nanopartículas se prepararon dejando caer 5  $\mu\text{L}$  de cada solución coloidal sobre un grid (Formvar) de cobre con recubrimiento de oro y se realizó su caracterización en un equipo de microscopía electrónica de barrido (FE-SEM, QUANTAFEC 650) en modo STEM de alta resolución con voltaje de 200kV del Laboratorio de Microscopía (GOTS) de la Universidad Industrial de Santander. Las muestras se analizaron empleando un voltaje e aceleración de 30 kV y 60000 X de ampliación.

### **3.5.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Se realizó la determinación de la morfología superficial de las nanopartículas metálicas y los nanocompuestos poliméricos en un equipo de microscopía electrónica de transmisión (TEM) JEOL JEM 2000FX del Centro Nacional de Microscopía

Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid (España) con un voltaje de aceleración de 200kV. Las muestras se prepararon mediante la tinción previa con acetato de uranilo de manera que se obtuviera mayor contraste del polímetro para luego dejar caer 5  $\mu$ L de la muestra teñida sobre un *grid* (Formvar) de cobre que posteriormente fue introducida en el porta-muestras.

### **3.5.5 Espectroscopia Infrarrojo**

Las nanopartículas de ZnO y los posteriores nanoencapsulados obtenidos fueron caracterizados mediante espectroscopia infrarroja utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo marca Bruker-Tensor 27, con celda ATR Platimun A225/Q de cristal de diamante. Las muestras líquidas se purificaron previamente a su medición de manera que sólo se observaran bandas de absorción en el espectro infrarrojo correspondientes a grupos funcionales presentes en la muestra. Así mismo, las muestras sólidas de ZnO sintetizadas se caracterizaron determinando las bandas características del enlace Zn-O en ausencia de grupos hidroxilo. El espectro fue tomado en un ancho espectral entre 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.5.6 Espectrofotometría UV-VIS**

Las nanopartículas se caracterizaron empleando un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-1601-1601 PC con un ancho de rejilla de 0.5 nm realizando un barrido desde 260 nm hasta 600 nm posterior a la reacción de formación. Se midieron de igual manera las nanopartículas de Ag y ZnO antes y después de su encapsulación en los diferentes polímeros. Se colocó la solución coloidal diluida en una cubeta de cuarzo y la absorbancia resultante se calculó empleando la Ley de Lamber-Beer.

### **3.6 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ENCAPSULACIÓN**

Con el fin de determinar el porcentaje de encapsulación, se realizó la purificación de los nanocompuestos obtenidos mediante separación por filtración empleando filtros para centrifugación tipo amicon con un grado de separación por peso molecular de 10kDa. Posterior a la purificación, se confirmó la ausencia de nanopartículas de plata libres empleando espectrofotometría UV-VIS con la desaparición de la banda de absorción alrededor de 400nm correspondiente a la superficie de plasmones resonantes [110].

### **3.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS Y NANOENCAPSULADOS**

De acuerdo con la literatura existen diversas metodologías que permiten conocer la actividad antimicrobiana de agentes activos [20], [111], [112] . Se eligió el método de microdilución en caldo debido a que se ha demostrado que presenta una mayor sensibilidad teniendo en cuenta que en medio líquido existe una mayor interacción entre las células bacterianas y las nanopartículas.

#### **3.7.1 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) frente a SARM**

El método de microdilución para la estimación de los valores de CMI se realizó en placas multipocillo de ELISA de acuerdo con los protocolos publicados por otros autores [113]–[115].

Inicialmente, se preparó un preinóculo de *S. aureus* resistente a Meticilina (SARM) en caldo Muller-Hilton (MH), en agitación constante de 200 rpm a 37°C durante 14h. Posteriormente, se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando el preinóculo bacteriano en microplacas tipo ELISA que previamente contenían AgNPs

a diferentes concentraciones (entre 0.25 y 80 µg/mL) a 37°C con una agitación de 200rpm durante 9h. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm. La CMI se definió como la menor concentración de AgNPs que produce una inhibición en el crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI<sub>99</sub>, CMI<sub>90</sub> CMI<sub>50</sub> corresponden a las dosis que inhiben el 99%, 90% y 50% del crecimiento bacteriano, respectivamente.

Posterior a la determinación de la CMI, se estableció la CMB. Se utilizaron los cultivos de SARM que fueron inhibidos por los nanocompuestos durante la determinación de CMI. Se tomaron muestras de estos cultivos y se inocularon en el caldo de cultivo Infusión de cerebro-corazón (BHI) en tubos Eppendorf a 37°C durante 24 horas.

A continuación, se tomó una alícuota de cada tubo y se realizó la siembra en superficie de cajas de Petri que contenían BHI agar con el fin de corroborar el efecto bactericida en aquellas donde no hubo crecimiento de colonias bacterianas. El valor de CMB se determinó como aquella concentración donde el 100% del crecimiento bacteriano fue inhibido completamente en comparación con el control positivo (sin tratamiento con nanocompuestos).

### **3.7.2 Determinación de CMI y CMF frente a *C. albicans***

La determinación de la actividad inhibitoria de los nanocompuestos obtenidos frente a *Candida albicans* se realizó de acuerdo al método recomendado por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) descrito en el documento M27-A3 y ha sido estandarizado previamente en el laboratorio.

Inicialmente se realizó el cultivo de las cepas de *Candida albicans* y *parapsilosis* en cajas petri con medio de cultivo agar sabouraud dextrosa (SDA) y se dejaron en incubación a 35°C durante 48h. A partir de este cultivo se tomaron de 3 a 5 colonias (cada colonia está conformada por un grupo de células del microorganismo) que se adicionaron a una solución salina estéril. Esta suspensión se ajustó a una

absorbancia entre 0,09-0,13 a una longitud de onda de 530 nm que corresponde a  $1-5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Una vez ajustada, a esta concentración se realizaron diluciones seriadas en solución salina y en medio de cultivo enriquecido RPMI (Roswell park memorial Institute) para obtener finalmente una concentración microbiana de  $0.5-2,5 \times 10^3$  unidades formadoras, la cual fue evaluada frente a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y nanocompuestos que actuaron como antifúngico. Este ensayo se realizó en una microplaca de 96 pozos que se dejó en incubación a 35°C durante 48h. Posterior a este tiempo de incubación, se realizó la medición de la absorbancia a 530nm y se comparó con los respectivos controles de crecimiento.

Posterior a la determinación de la CMI, se evaluó la CMF. Se utilizaron los cultivos de *C. albicans* que fueron inhibidos por los nanocompuestos durante la determinación de CMI. Se tomaron muestras de estos cultivos y se inocularon en un caldo de cultivo RPMI 1640 en tubos Eppendorf a 35°C durante 48 horas.

A continuación, se tomó una alícuota de cada tubo y se realizó una siembra en superficie de cajas de Petri que contenían SDA con el fin de corroborar el efecto fungicida en aquellas donde no hubo crecimiento de colonias. El valor de CMF se determinó como aquella concentración donde el 100% del crecimiento fúngico fue inhibido completamente en comparación con el control positivo (sin tratamiento con nanocompuestos).

### **3.8 CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS Y NANOCOMPUESTOS FRENTE A DOS LÍNEAS CELULARES**

Los ensayos de citotoxicidad de los nanocompuestos obtenidos se realizaron en el laboratorio del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander. Se utilizaron células tipo fibroblasto murino (ATCC® CRL-1658™) las cuales fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640

(Gibco) suplementado 5% de suero fetal bovino inactivo (SFBi, Hyclone) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

Los fibroblastos NIH/3T3 fueron tratados con diferentes concentraciones de las AgNPs (0,037-30 µg/mL) o con diluciones seriadas 1:10 de sus componentes. Las células control fueron mantenidas sin compuesto. La toxicidad fue determinada por el método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difenil-tetrazolio bromuro). La densidad óptica se determinó por espectrofotometría a 580 nm usando un lector de microplacas (Multiskan Go). El porcentaje de citotoxicidad fue calculado mediante la fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 100 \times \frac{D.O. \text{ grupo control} - D.O. \text{ grupo tratado}}{D.O. \text{ grupo control}}$$

La citotoxicidad fue expresada como la concentración tóxica de la muestra para el 50% y 90% de las células (CC<sub>50</sub>,CC<sub>90</sub>) calculados por regresión sigmoideal utilizando el software Mxlfite™ (ID Business Solution, UK); Los ensayos fueron realizados por triplicado.

### **3.9 PERFIL DE LIBERACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DE LOS NANOCOMPUESTOS**

El seguimiento de la liberación de nanopartículas de plata (AgNPs) y óxido de zinc (ZnONPs) desde los nanocompuestos se realizó de acuerdo a lo publicado en la literatura [116]–[118]. Los nanocompuestos se incubaron bajo condiciones fisiológicas a 37°C en agitación suave (100 rpm) y pH de 7.4 ajustando con buffer fosfato 85 mM. Se tomó muestra de cada nanocompuestos periódicamente y se determinó la concentración de nanopartículas de plata u óxido de zinc liberadas mediante espectroscopia de absorción atómica.

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS**

Se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) y de zinc (ZnONPs) mediante reacciones de reducción química y sustitución, respectivamente. Se variaron algunas condiciones de reacción para observar la influencia sobre las propiedades de las nanopartículas. Se evaluaron los dos tipos de nanopartículas con el fin de determinar sus propiedades fisicoquímicas y comparar sus propiedades antimicrobianas frente a dos cepas patógenas de interés clínico.

#### **4.1.1 Nanopartículas de plata**

En general, la formación de nanopartículas de Ag puede estar mediada por tres pasos determinantes: reducción de los iones  $\text{Ag}^+$ , condensación de los primeros núcleos y crecimiento de las partículas [119]. En un punto crítico el crecimiento de partículas continúa hasta la formación de racimos a través de reacciones de condensación que se acumulan en una capa repelente de contraiones que se encuentre en el medio. cuando se utilizan azúcares como agentes reductores, éstos se acumulan formando una capa superficial impidiendo el contacto de las nanopartículas recientemente formadas [120].

Durante la primera etapa de la síntesis, las sales metálicas son reducidas a nanopartículas metálicas, mientras que los azúcares son oxidados hasta los ácidos carboxílicos correspondientes. La lactona, producto de la oxidación de la glucosa, sufre una apertura que conlleva a la formación del ácido glucónico como producto final de la oxidación del monosacárido [106]. Para compensar las fuerzas de Van Der Waals responsables de la coalescencia de nanopartículas, los ácidos carboxílicos suelen generar una densidad de carga superficial negativa. Así, estos ácidos carboxílicos contribuyen a la estabilidad por medio de un revestimiento denso en las

superficies metálicas y por lo tanto, la inhibición del crecimiento de las partículas generadas [121]. Adicionalmente la presencia de seis grupos hidroxilo (-OH) en la glucosa permite la fácil donación de pares de electrones libres hacia las nanopartículas de plata recién formadas que les proporciona mayor estabilidad en solución acuosa [122].

La reducción de iones de plata mediada por monosacáridos como la glucosa no ha sido completamente dilucidada. Sin embargo, se ha demostrado que entre los posibles estereoisómeros de la glucosa, la  $\beta$ -piranosa es la forma más reactiva formando grupos aldehído libres como intermediarios. Inicialmente se presenta la formación de un complejo entre la glucosa y la especie reactiva de  $\text{Ag}^+$ . Esta reacción es una clásica oxidación-reducción que genera  $\text{Ag}^0$  y un radical libre que rápidamente da lugar a la formación de una lactona [122]. Por otra parte, los iones  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Ag}^0$  se acomplejan formando  $\text{Ag}_2^+$  que posteriormente se dimeriza a  $\text{Ag}_4^{2+}$ , especie que finalmente se encuentra en estado coloidal [123].

Por otra parte, cuando el agente reductor empleado es maltosa, ésta sufre hidrólisis generando dos moléculas de glucosa que siguen el mismo mecanismo anteriormente mencionado. Es probable que al tener mayor concentración de moléculas de glucosa disponible en el medio de reacción, la síntesis de AgNPs en presencia de maltosa haya sido más eficiente. Adicionalmente, cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de gelatina como agente estabilizante, los grupos amino libres de esta poliamida previenen la agregación de las nanopartículas de plata recién formadas [124].

#### **4.1.2 Caracterización de nanopartículas de plata**

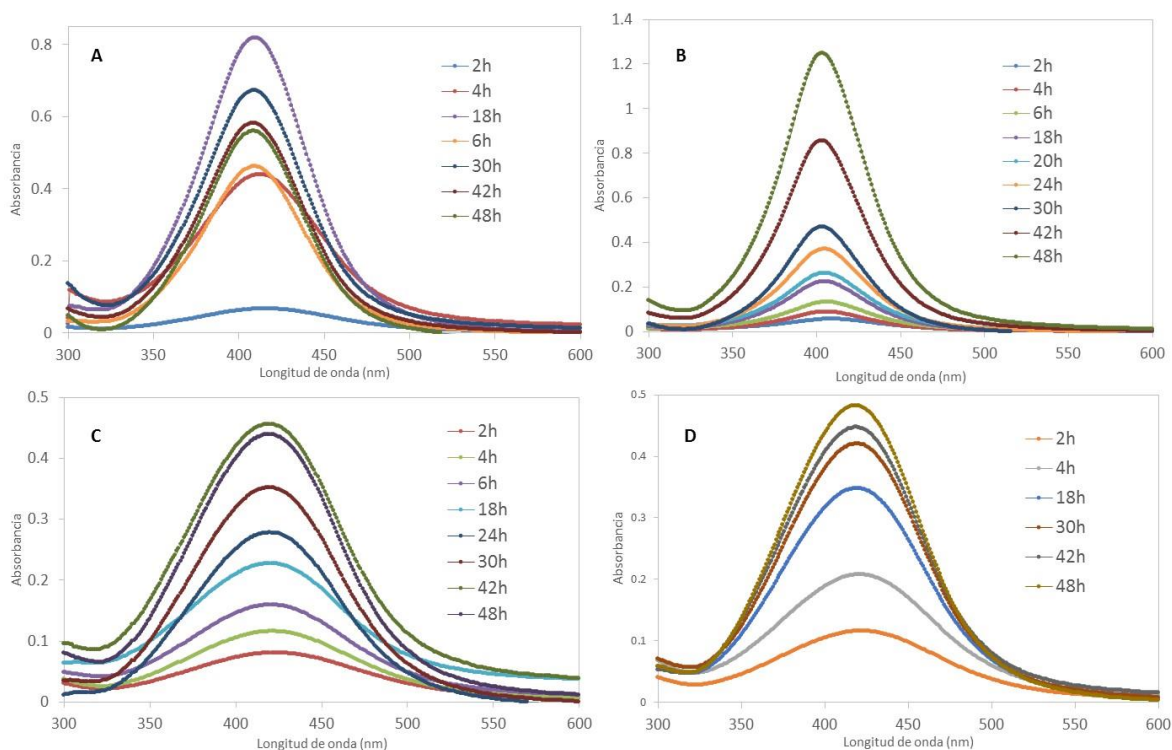
A fin de establecer una buena correlación entre la actividad antibacteriana y las propiedades de los nanomateriales, es necesario conocer las características físico-químicas de los mismos. Este es un punto clave para las AgNPs, ya que sus

propiedades están determinadas principalmente por el tamaño y morfología, incluso cuando tienen la misma composición química [125], [126].

### Espectrofotometría ultravioleta visible (UV-VIS)

Las nanopartículas metálicas, especialmente las de plata, exhiben una banda de absorción característica alrededor de 400nm [127], [128]. Se puede observar en la figura 6 que el máximo de absorción se ve desplazado a mayores valores de absorbancia en función del tiempo para los cuatro tipos de AgNPs (provenientes de la síntesis en presencia de maltosa o glucosa a dos diferentes relaciones molares: 4 y 8). Este resultado podría indicar una mayor formación de AgNPs obtenidas con el paso del tiempo, pues a mayor concentración de AgNPs mayor absorbancia, hecho que se ha observado previamente en otros estudios [129], [130] . Así mismo, la longitud de onda máxima a 420 nm se conserva en función del tiempo, lo cual permite presumir que no hubo cambio significativo en el tamaño de las AgNPs sintetizadas mientras progresaba la reacción. Adicionalmente se pudo observar un cambio en la coloración de las muestras, pues a medida que progresaba la reacción, la solución coloidal se tornaba amarillo oscuro lo que indicó la formación de las nanopartículas de plata, al igual que lo publicado por anteriores estudios [37].

**Figura 6** Espectros ultravioleta de las AgNPs sintetizadas empleando diferentes agentes reductores y diferentes relaciones molares. **A)** Agente reductor glucosa y relación molar 4:1 (glu4). **B)** Agente reductor glucosa y relación molar 8:1 (glu8). **C)** Agente reductor maltosa y relación molar 4:1 (mal4). **D)** Agente reductor maltosa y relación molar 8:1 (mal8).



**Fuente:** Autor.

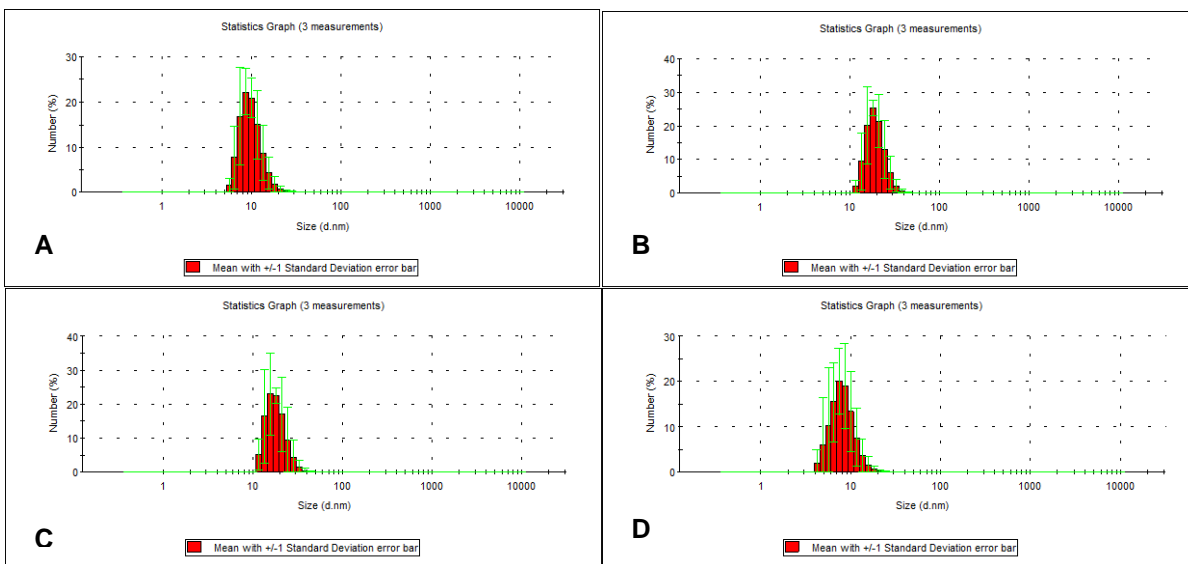
Dado que la intensidad del pico de absorción es proporcional a la concentración de AgNPs en la solución coloidal, la aparición de tales picos bien definidos sugiere que hubo un buen rendimiento de reacción especialmente en la síntesis empleando glucosa como agente reductor. Sin embargo, después de alcanzar el máximo de absorción (alrededor de 1 en la figura 6 A y B), las nanopartículas sintetizadas empleando glucosa coalescieron formando agregados de mayor tamaño. Mientras que las AgNPs sintetizadas empleando maltosa como agente reductor sólo alcanzó un máximo de absorción alrededor de 0.5 unidades de absorbancia (ver figura 6 C y D), pero fueron más estables en función del tiempo. Adicionalmente, a partir de los espectros de UV-VIS de las AgNPs sintetizadas se puede presumir que aquellas con una banda de absorción más ancha tendrán mayor tamaño debido a la excitación de

los plasmones superficiales en diferentes modos de resonancia: cuadrupolos y multipolos [37].

#### *Dispersión de luz en modo dinámico (DLS)*

En la figura 7 se puede apreciar la distribución de tamaño de los cuatro tipos de AgNPs sintetizados. Se observa una única población con tamaño promedio alrededor de 10 nm y con una angosta distribución en cada una de las AgNPs obtenidas, lo cual indica que la síntesis empleando glucosa y maltosa fue efectiva en la obtención de nanopartículas homogéneas y de tamaño promedio inferior a 20 nm. Los resultados también permiten comparar el efecto de la relación molar sobre el tamaño de las AgNPs sintetizadas. Cuando la relación molar entre el agente reductor y la plata fue mayor (en las muestras glu8 y mal8), se obtuvieron AgNPs de menor tamaño, similar a lo publicado anteriormente por otros autores [106]. Mientras que al utilizar maltosa como agente reductor, en ambas relaciones molares el observó una pequeña disminución en el tamaño promedio de las AgNPs. Asimismo, la tabla 3 muestra que el índice de polidispersión no supera el 0.5 y fue menor para las nanopartículas sintetizadas con una relación molar inferior.

**Figura 7** Distribución de tamaño promedio de las AgNPs obtenidos por DLS **A)** Agente reductor glucosa y relación molar 4:1 (glu4) **B)** Agente reductor glucosa y relación molar 8:1 (glu8) **C)** Agente reductor maltosa y relación molar 4:1 (mal4) **D)** Agente reductor maltosa y relación molar 8:1 (mal8).

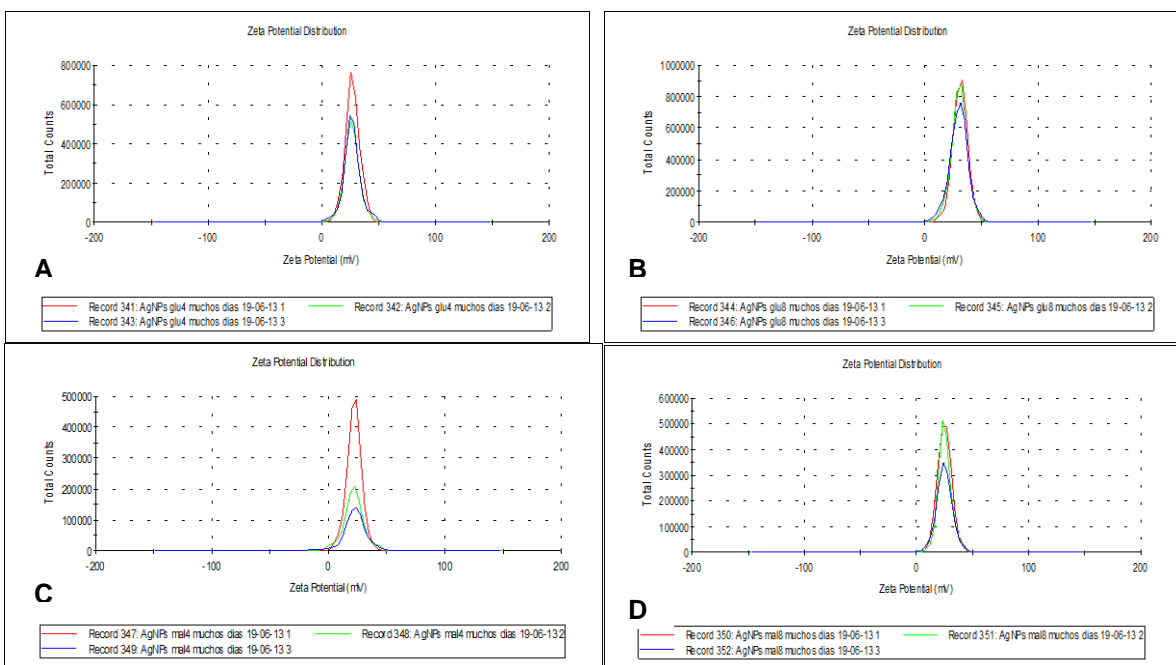


**Fuente:** Autor.

### Potencial zeta

La figura 8 presenta el potencial zeta determinado para las cuatro muestras sintetizadas de AgNPs. Se puede apreciar que la carga superficial en todos los casos es positiva con un valor promedio de +25 mV. Este valor refleja un estado de estabilidad de las nanopartículas que evita su coalescencia y su posterior agregación. La carga positiva puede ser atribuida a los grupos amino libres de la gelatina que podría adsorberse sobre la superficie de las nanopartículas [124]. Adicionalmente, la oxidación de la glucosa conlleva a la formación del ácido glucónico que podrían acomplejar las AgNPs sintetizadas, proporcionándole carga superficial positiva y mayor estabilidad previniendo su aglomeración en función del tiempo.

**Figura 8** Carga superficial obtenida mediante la medición del potencial zeta de las AgNPs empleando dos diferentes agentes reductores y dos relaciones molares. **A)** Agente reductor glucosa y relación molar 4:1 (glu4) **B)** Agente reductor glucosa y relación molar 8:1 (glu8) **C)** Agente reductor maltosa y relación molar 4:1 (mal4) **D)** Agente reductor maltosa y relación molar 8:1 (mal8).



**Fuente:** Autor.

La tabla 3 resume las propiedades físicas determinadas para los cuatro tipos de AgNPs sintetizadas. Se puede observar que cuando la relación molar entre el agente reductor y la plata es 4:1, el índice de polidispersión es menor (Pdl). El índice de polidispersión es una medida de la amplitud de la distribución del tamaño promedio de las partículas [131]. Por tanto, cuanto menor sea este valor, las partículas tendrán una mayor tendencia a encontrarse en un rango más pequeño de distribución de tamaño.

**Tabla 3** Propiedades físicas determinadas para las nanopartículas de plata sintetizadas.

Tipo de Nanopartículas	Agente reductor/oxidante	Relación molar	Tamaño promedio (nm)	Pdl	Carga superficial (mV)
AgNPs	Glucosa	8	12.42 ± 0.85	0.54 ± 0.06	+30.37 ± 0.74
AgNPs	Glucosa	4	18.34 ± 3.14	0.30 ± 0.02	+26.60 ± 0.26
AgNPs	Maltosa	8	8.31 ± 1.71	0.53 ± 0.01	+25.03 ± 0.21
AgNPs	Maltosa	4	10.06 ± 1.46	0.22 ± 0.02	+22.07 ± 0.51

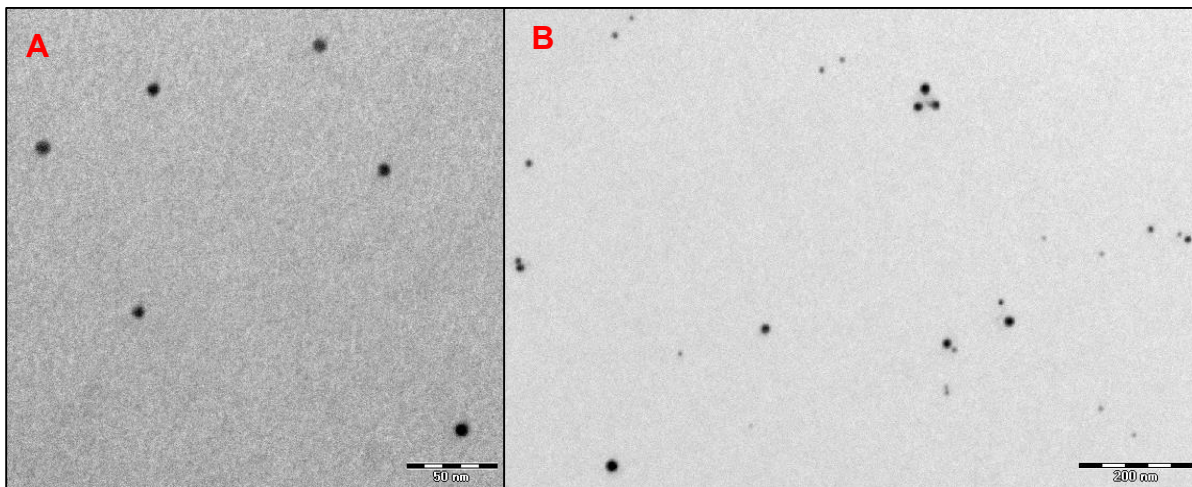
**Fuente:** Autor.

#### Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se realizó el análisis de las AgNPs mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) con el fin de observar tanto el tamaño y forma de las nanopartículas sintetizadas. Se obtuvieron imágenes de TEM para las AgNPs que fueron sintetizadas con maltosa como agente reductor, en una relación molar entre la maltosa y la plata de 4:1 y 8:1.

En la figura 9 se puede observar que las AgNPs son esféricas con un tamaño promedio de 10 nm altamente homogéneas sin la formación de agregados de mayor tamaño y con una distribución de tamaño estrecha. De acuerdo con lo publicado en la literatura, la gelatina también participa en la síntesis de las AgNPs evitando el crecimiento de los clúster en la primera etapa de la síntesis [106]. Se realizó el seguimiento de la estabilidad en función del tiempo y se encontró que las AgNPs sintetizadas con maltosa en una relación molar entre maltosa y plata de 4:1 fueron las más estables ya que ocho meses después de realizada la síntesis conservaban su tamaño promedio menor a 20 nm. Mientras que las otras tres muestras de AgNPs perdieron estabilidad luego de transcurridos tres meses desde la reacción de formación.

**Figura 9** Microscopías de transmisión electrónica de las nanopartículas AgNPs sintetizadas empleando maltosa como agente reductor. **A)** Con una relación molar 4:1 **B)** Con una relación molar 8:1.



**Fuente:** Autor.

### 4.1.3 Nanopartículas de óxido de zinc

Las nanopartículas de ZnO (ZnONPs) fueron obtenidas mediante la síntesis química asistida por polioles. La reacción global de obtención de ZnONPs se describe como una reacción de desplazamiento químico entre el acetato de zinc y el NaOH, de manera que el estado de oxidación del Zn (II) se ve inalterado [132].

Se ha establecido que en el primer paso el acetato de zinc se disuelve en el dietilenglicol (o polietilenglicol), las moléculas de agua y de acetato se ven reemplazadas por moléculas de DEG a través de la formación de enlaces de coordinación de Zn-OH y Zn-O [133], [134]. Se ha propuesto que en este proceso se da también la formación de intermedios de complejos de alcoxiacetatos como  $Zn_3(OAc)_4(O(CH_2)_2O(CH_2)_2O)$  y  $Zn_2(OAc)_3(OCH_2CH_2OH)$  [133]. A continuación los complejos de alcoxiacetatos sufren hidrólisis por efecto del incremento en la concentración de los iones  $OH^-$ , conllevando a una sustitución parcial de los aniones

acetato por los iones hidroxilo en los complejos resultantes. Finalmente, con el aumento de la temperatura los complejos de hidroxil-alcoxiacetatos se empiezan a condensar a medida que continúa la reacción de hidrólisis y progresivamente se comienzan a formar los núcleos de ZnO que se transforman en los cristales de ZnO por medio de reacciones de oxalación [45]. A la temperatura de ebullición del solvente, se produce la precipitación del óxido de zinc [135]. Se han empleado diferentes tipos de solventes en la síntesis que permitan detener el crecimiento de los primeros cristales formados. Los polioles han demostrado tener esta cualidad pues acomplejan la superficie de las partículas actuando como un agente quelante de modo que se limita su crecimiento y aglomeración [135]. Por tal razón se planteó variar el poliol empleado para evaluar el efecto sobre el tamaño de las ZnONPs al final de la síntesis.

De acuerdo con este mecanismo planteado, uno de los principales factores que afectan la formación de los núcleos de Zn y la morfología es la relación de la sal de Zn con respecto a los iones  $\text{OH}^-$  provenientes del hidróxido de sodio. Las concentraciones y relaciones molares apropiadas que permitan obtener las mejores propiedades físicas de las ZnONPs, fueron establecidas previamente por otros autores [45].

#### **4.1.4 Caracterización de nanopartículas de óxido de zinc**

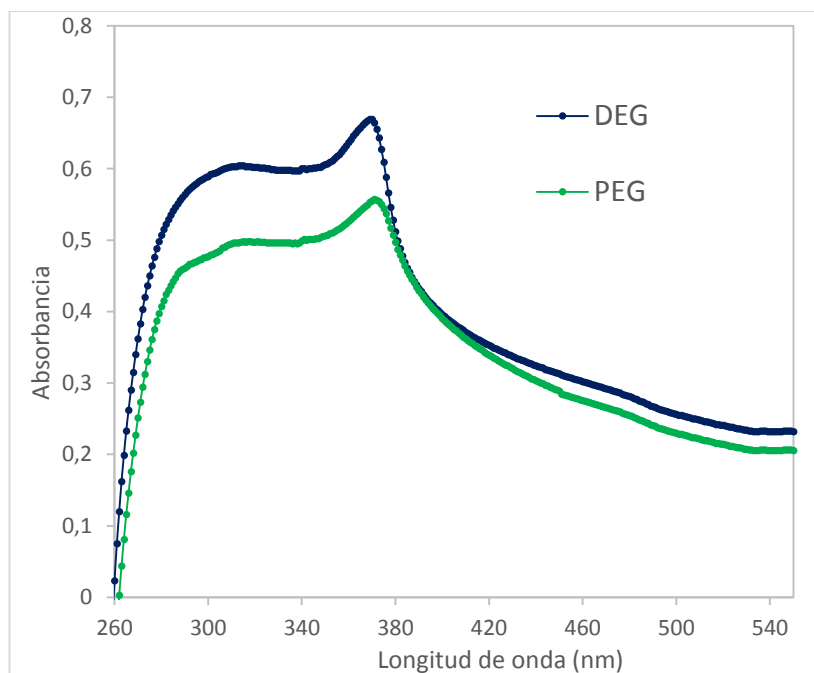
Las nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) se caracterizaron mediante seis técnicas analíticas. Las principales propiedades fisicoquímicas (tamaño, carga superficial y morfología) se encuentran muy relacionadas con la posible actividad antimicrobiana y permiten determinar la obtención y grado de pureza del óxido.

##### *Espectrofotometría ultravioleta visible (UV-VIS)*

La figura 10 muestra el espectro de absorción de las nanopartículas de ZnO sintetizadas. Se puede apreciar un pico ancho de absorción alrededor de 360-380 nm que corresponde a una banda característica de ZnO [135]. Adicionalmente, no se

observan otros picos de absorción en el espectro lo que confirma la pureza de las nanopartículas obtenidas. Las ZnO obtenidas empleando DEG exhibe un máximo alrededor de 370 nm mientras que usando PEG como solvente tiene un máximo de absorción en 373 nm. Es bien conocido que un desplazamiento a mayores longitudes de onda en el espectro UV-VIS refleja un incremento en el tamaño de partícula [135]. Sin embargo, las dos longitudes de onda máxima son cercanas entre sí, lo que se relaciona con los tamaños promedio entre 5-10nm obtenidos para ambos tipos de síntesis determinados por DLS y se ilustran en la figura 10.

**Figura 10** Espectros de ultravioleta UV-VIS de las ZnONPs sintetizadas empleando dos diferentes solventes, utilizando una dilución 1/10 en agua desionizada.



**Fuente:** Autor.

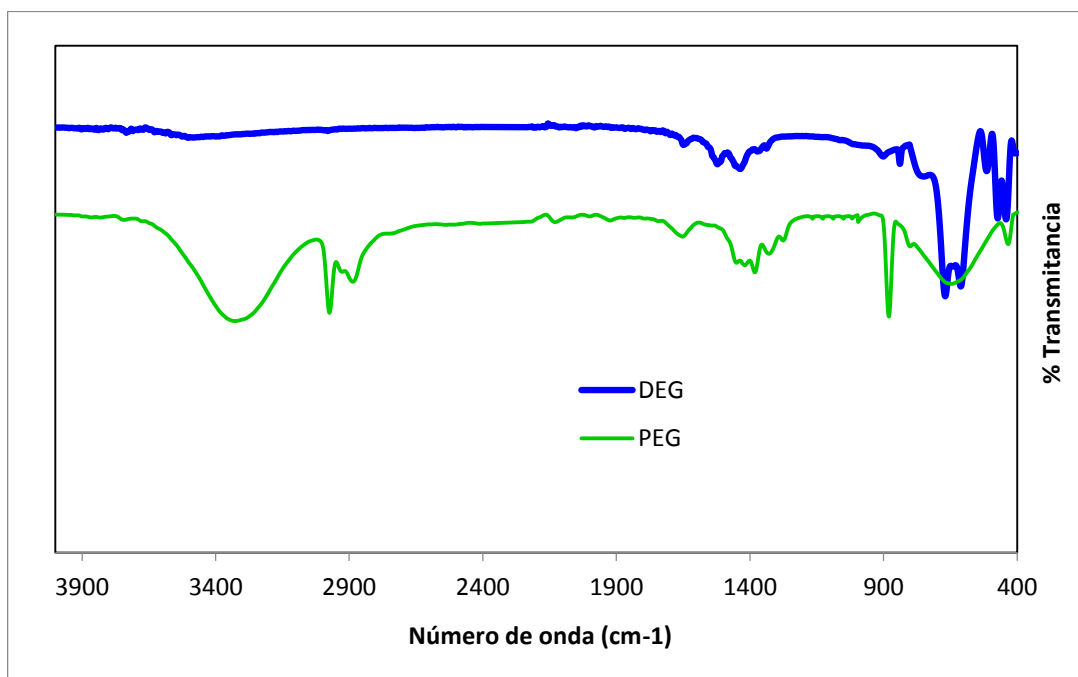
### Espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

La figura 11 muestra los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de las nanopartículas de ZnO sintetizadas empleando DEG y PEG, respectivamente. Se puede observar una banda de absorción cerca de  $450\text{cm}^{-1}$  que se encuentra dentro del rango característico para una vibración del enlace Zn-O del tipo

estiramiento [136]. Adicionalmente, la ausencia de una banda de absorción alrededor de  $3450\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a una vibración de estiramiento del enlace O-H presente en los hidróxidos de zinc, puede indicar la formación selectiva de sólo el óxido de este metal en presencia de DEG [137]. Cuando las nanopartículas se sintetizaron en presencia de PEG se pudo observar una banda alrededor de  $2900\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un estiramiento del enlace C-O y una banda ancha poco intensa a  $3400\text{ cm}^{-1}$  que puede estar relacionada con un enlace O-H, lo que indica que esta muestra podría contener ZnOH [136].

Las otras bandas de absorción observadas alrededor de  $590\text{ cm}^{-1}$  y  $900\text{ cm}^{-1}$  probablemente se encuentran relacionadas con restos de carbonatos que en general se observan cuando los espectros de FTIR se miden al aire [10].

**Figura 11** Espectro de Infrarrojo obtenido para la muestra de ZnONPs sintetizada empleando dos diferentes solventes, DEG y PEG.

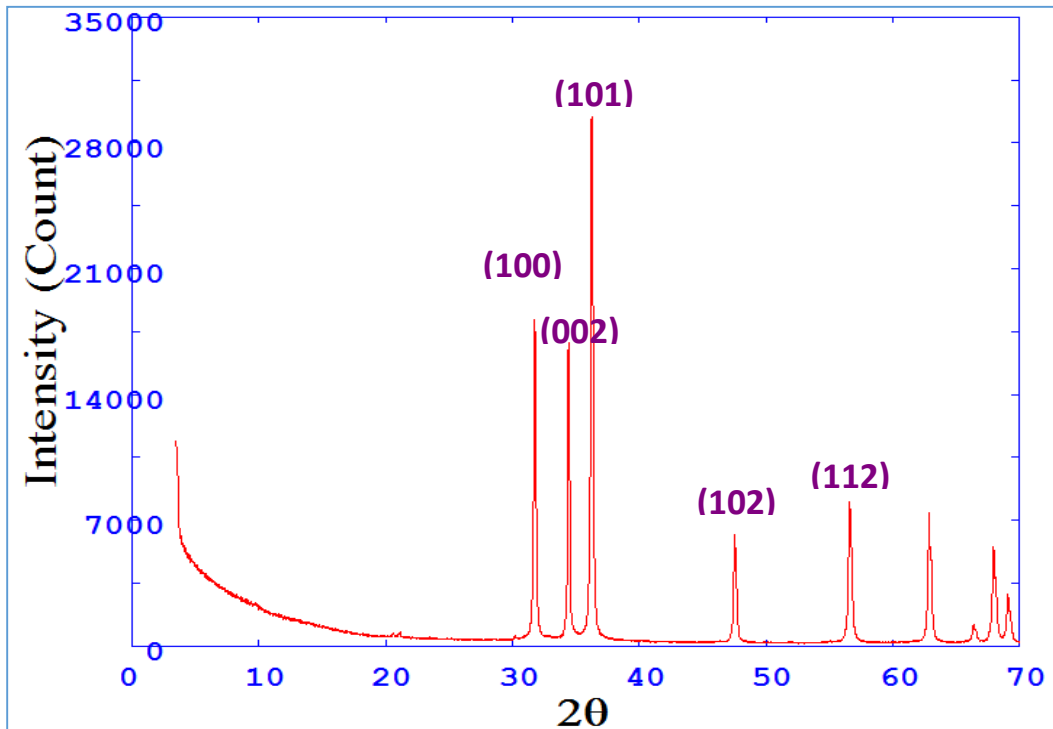


**Fuente:** Autor.

### Difracción de rayos X (DRX)

Teniendo en cuenta que la difracción de rayos X es la técnica que permite confirmar la obtención de óxido de zinc, se realizó el análisis de las muestras obtenidas. En la figura 12 el difractograma muestra picos máximos de difracción correspondientes a una única fase que corresponde a la wurzita. La wurzita es una fase del óxido de zinc que tiene una estructura hexagonal. Los picos alrededor de  $32^\circ$ ,  $35^\circ$ ,  $37^\circ$ ,  $48^\circ$  y  $57^\circ$  corresponden a los planos (100), (002), (101), (102) y (112) que se encuentran indexados en la tarjeta N° 36-1451 de la JCPDS (Comité conjunto de Estándares de difracción en polvo, por sus siglas en inglés) [138]. La intensidad fuerte y la angostura de los picos de difracción de las nanopartículas de ZnO indican que el producto obtenido era altamente cristalino [135], [139]. El difractograma obtenido para la muestra de ZnONPs sintetizada en presencia de PEG mostró los mismos picos que confirmaron la presencia de la wurzita en la síntesis.

**Figura 12** Difractograma obtenido para la muestra de ZnONPs sintetizada empleando DEG.

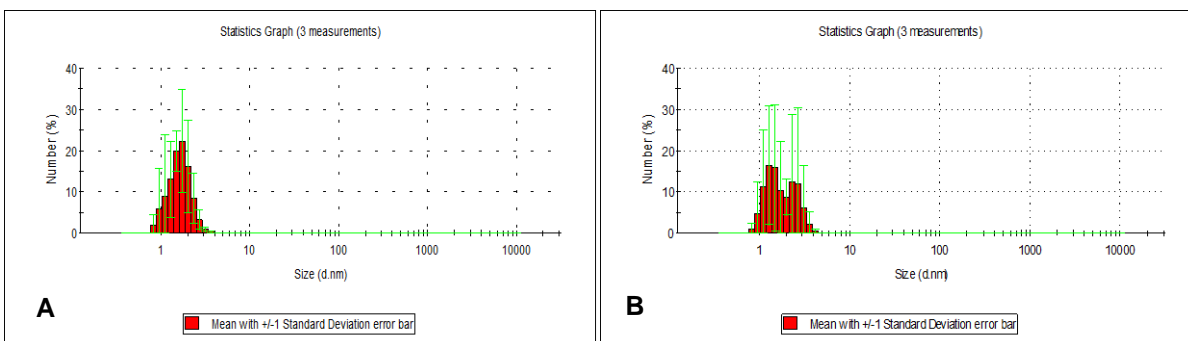


Fuente: Autor.

### Dispersión de luz en modo dinámico (DLS)

De acuerdo con los histogramas obtenidos para los dos tipos de ZnONPs sintetizadas, se puede apreciar mayor polidispersión cuando las nanopartículas fueron sintetizadas en presencia de PEG (ver figura 13). No obstante, el tamaño hidrodinámico promedio se encuentra entre 1-5 nm en ambos casos. Existen dos principales factores que contribuyen a la morfología y tamaño de las nanopartículas finales obtenidas bajo condiciones térmicas: la nucleación inicial de los cristales y la solubilidad del precursor en los disolventes con diferentes presiones de vapor [138]. En consecuencia, cuando el solvente tenga más baja presión de vapor saturada se observará un crecimiento más rápido de los núcleos de ZnO, resultando en partículas de mayor tamaño. Este comportamiento se evidenció cuando el solvente utilizado fue PEG. Adicionalmente, la longitud de la cadena del polímero que actúa como disolvente también ejerce un efecto marcado sobre el crecimiento de los cristales de ZnO formando interacciones con el disolvente [138].

**Figura 13** Distribución de tamaño promedio de las ZnONPs sintetizadas empleando dos diferentes solventes **A) DEG B) PEG**.

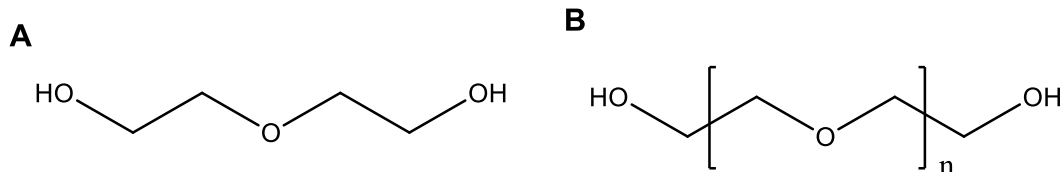


**Fuente:** Autor.

Si la polaridad del polímero empleado como solvente disminuye en función de una menor longitud en la cadena polimérica, es posible que haya una menor interacción con la superficie de los cristales de ZnO resultando en morfologías similares a cilindros alargados ocasionando mayor polidispersión [138]. Sin embargo, este efecto se observa cuando cambia drásticamente la polaridad de los dos polímeros.

Teniendo en cuenta que la diferencia en la estructura química entre los dos solventes utilizados (ver figura 14) es mínima, los cambios en la polidispersión de los dos tipos de ZnONPs sintetizadas tampoco son significativos.

**Figura 14** Estructuras químicas de los dos solventes utilizados en la síntesis de ZnONPs **A)** Dietilenglicol (DEG) **B)** Polietilenglicol (PEG).

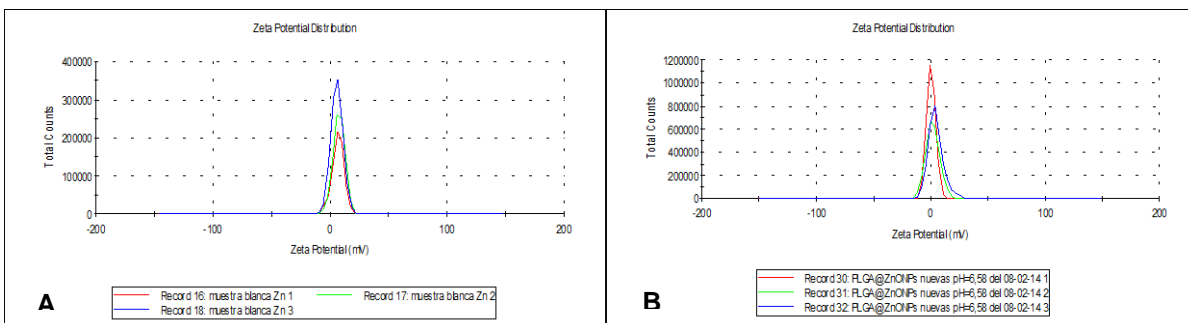


**Fuente:** Autor.

### Potencial zeta

En la figura 15 se puede apreciar el potencial zeta de las nanopartículas de ZnO sintetizadas empleando DEG y PEG, respectivamente. El potencial zeta es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla. Por lo tanto, el potencial zeta es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula [140]. Se ha establecido que el ZnO en ausencia de agentes catiónicos y estabilizantes presenta una carga de cero alrededor de un pH de 9.1 [141]. No obstante las nanopartículas de ZnO fueron preparadas a un pH 7.0, donde se encontró que tenían carga positiva que se vio mejorada por la adición de polietilenimina (PEI) como agente catiónico.

**Figura 15** Carga superficial obtenida mediante la medición del potencial zeta las ZnONPs sintetizadas empleando dos diferentes solventes **A)** DEG **B)** PEG.



**Fuente:** Autor.

Posterior a la síntesis de ZnONPs, se evaluó el efecto de la adición de PEI sobre las nanopartículas resuspendidas. Se pudo observar que las nanopartículas de ZnO obtenidas en presencia de DEG, presentaron una carga positiva al resuspenderlas en polietilenimina (PEI). En ambos casos las ZnONPs sintetizadas exhibieron una carga superficial positiva inferior a 20mV, lo que indica que estas nanopartículas no fueron completamente estables. Valores de carga superficial que se encuentren por fuera del rango comprendido entre -20mV y 20mV reflejan una mayor estabilidad de las soluciones coloidales. La estabilidad de las soluciones coloidales indica si las partículas de un líquido tienden a asociarse o a formar sedimentos [142]. La tabla 4 muestra el resumen de las propiedades físicas determinadas para los dos tipos de ZnONPs obtenidas mediante la síntesis asistida mediante polioles.

**Tabla 4** Propiedades físicas determinadas para las nanopartículas de óxido de zinc sintetizadas en presencia de dos diferentes solventes.

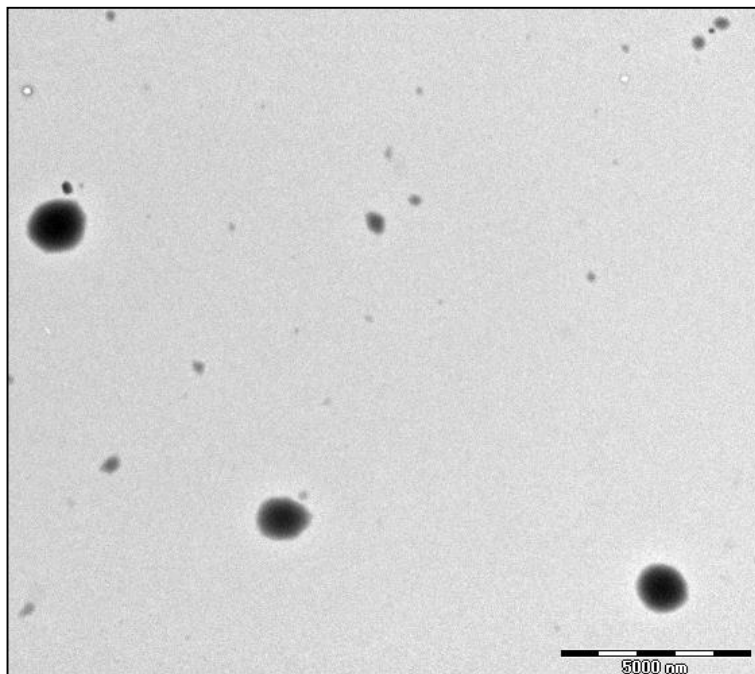
Tipo de Nanopartículas	Agente estabilizante	Tamaño promedio (nm)	Pdl	Carga superficial (mV)
ZnONPs	DEG	1.65 ± 0.32	0.52 ± 0.04	+6.76 ± 0.86
ZnONPs	PEG	2.44 ± 0.50	0.47 ± 0.05	+3.55 ± 0.32

**Fuente:** Autor.

### Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se realizó el análisis de las ZnONPs mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) con el fin de observar tanto el tamaño y forma de las nanopartículas sintetizadas. Las ZnONPs presentan una alta polidispersión pues se obtuvieron nanopartículas desde 1nm hasta 100 nm como se puede apreciar en la figura 16. Esta polidispersión es concordante con los resultados obtenidos por DLS y puede estar relacionada con la dificultad para redispersar apropiadamente las nanopartículas obtenidas. Se ha establecido ampliamente el uso de agentes estabilizantes que permitan una completa redispersión de las nanopartículas, pues en solución acuosa precipitan al cabo de 4 horas [143]. Se empleó citrato de sodio como agente estabilizante a diferentes concentraciones hasta alcanzar dispersiones que fueron estables por varios días. Las ZnONPs que fueron estables por mayor tiempo, se obtuvieron cuando las concentraciones finales de citrato de sodio y PEI fueron 30mM y 0.5%, respectivamente.

**Figura 16** Microscopias de transmisión electrónica (TEM) de las nanopartículas de ZnO sintetizadas en presencia de DEG.



**Fuente:** Autor.

Se ha publicado en la literatura que las nanopartículas de ZnO pueden presentar morfología esférica debido a varios aspectos estructurales. El primero de ellos, se relaciona con la estructura de la wurtzita por sí misma, pues presenta un oxígeno polar basal en el plano (100) y una cara polar de Zn en el plano (001) de diferente carga y reactividad lo que conlleva a interacciones electrostáticas de atracción favoreciendo la formación de la morfología esférica. Por otro lado, podría presentarse una coordinación entre las moléculas de dietilenglicol, teniendo en cuenta que etilenglicol consta de dos grupos hidroxilo fuertemente polares, con los cristales de ZnO que resultaría en una morfología esférica inhibiendo el crecimiento de los cristales en otros planos longitudinales [138]. Sin embargo, es importante resaltar que es posible que las ZnONPs hayan cristalizado en forma de agujas y estén formando conglomerados, por lo que las estructuras que se aprecian en la figura 16 no son totalmente esféricas.

## **4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS**

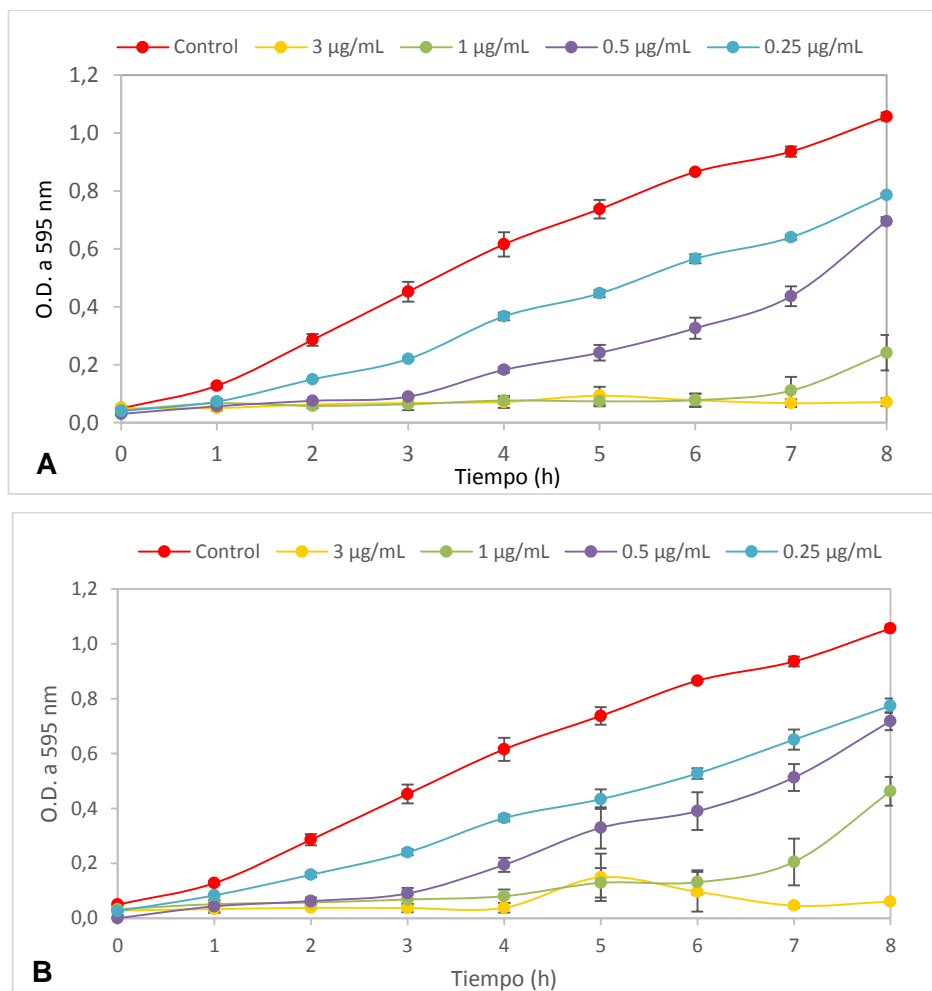
Se realizó la evaluación de las propiedades antimicrobianas de las AgNPs y las ZnONPs sintetizadas frente a dos cepas patógenas: *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Candida albicans* como modelos de bacteria Gram-positiva y levadura, respectivamente. La determinación del efecto antimicrobiano se llevó a cabo empleando el método de microdilución en caldo y calculando posteriormente las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) o concentraciones mínimas fungicidas (CMF) según fuera el caso.

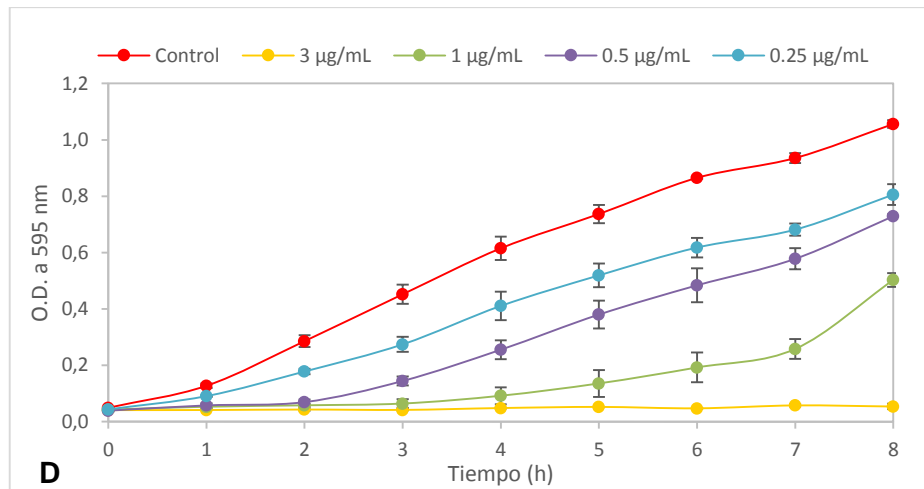
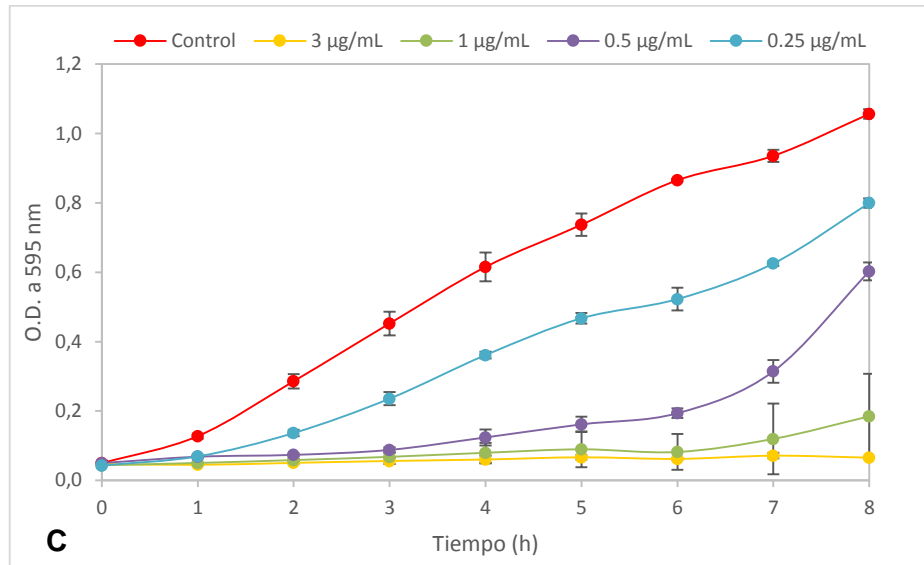
### **4.2.1 Determinación de CMI y CMB frente a *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM)**

En la figura 17 se pueden apreciar las cinéticas de crecimiento de SARM en presencia de diferentes concentraciones de AgNPs obtenidas por reducción en presencia de

glucosa o maltosa. Las gráficas muestran un efecto dosis dependiente, donde a mayor concentración de AgNPs, mayor inhibición en el crecimiento bacteriano.

**Figura 17** Cinéticas de crecimiento de SARM en presencia de diferentes concentraciones de AgNPs **A)** sintetizadas con glucosa (glu4) **B)** sintetizadas con glucosa (glu8) **C)** sintetizadas con maltosa (mal4) **D)** sintetizadas con maltosa (mal8). Las cinéticas se realizaron durante 8h a 37°C con una agitación de 200 rpm.





**Fuente:** Autor.

Aunque no se aprecia un cambio significativo entre los cuatro tipos de AgNPs sintetizados en función del tiempo requerido para provocar la inhibición del crecimiento de SARM, la determinación de las CMI muestra que las AgNPs sintetizadas empleando maltosa presentaron mayor actividad antimicrobiana. Este hecho puede estar relacionado con las propiedades fisicoquímicas encontradas de las AgNPs. Como se observa en la tabla 3, el tamaño promedio de las nanopartículas oscila entre 8-15 nm, es decir que entre las AgNPs obtenidas no se observa cambio significativo con respecto al tamaño promedio, por tanto sus propiedades antibacterianas son similares. El pequeño tamaño y la gran área superficial de estas

nanopartículas permiten la aparición de efectos electrónicos que mejoran la reactividad de la superficie de las AgNPs [144]. La gran área superficial, que se traduce en una mayor cantidad de átomos de Ag en la superficie de las nanopartículas, proporcionará una mayor interacción y mayor contacto con el microorganismo [111].

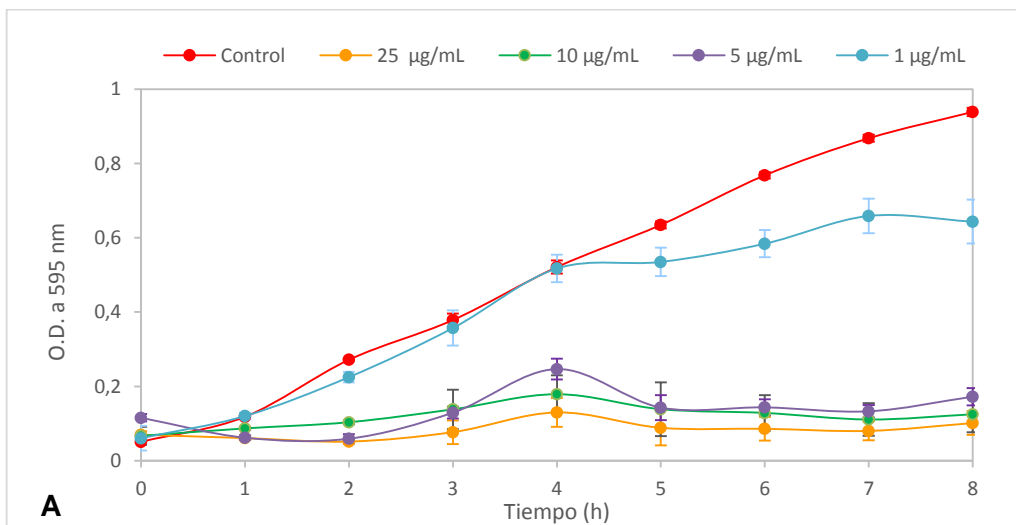
Por otra parte, se observa que la carga superficial de las AgNPs sintetizadas oscilan entre +20 y +30 mV. Esta carga positiva refleja la estabilidad de las AgNPs y adicionalmente permite una mayor atracción electrostática entre la membrana bacteriana que se encuentra negativamente cargada y las nanopartículas con carga positiva [111], [130]. Esta primera interacción con la bacteria es crucial para la actividad antibacteriana, pues le confiere un mayor acceso de las AgNPs hacia el interior de la bacteria y ocasiona un mayor daño en la membrana celular [52], [145]. Adicionalmente, los agentes catiónicos (como el PEI) además de proporcionar estabilidad a las nanopartículas, debido a su carga positiva, podrían presentar una tendencia a adsorberse sobre la membrana celular [146]. En las bacterias gram-positivas como SARM, la adsorción ocurre en la capa de ácidos lipoteitoicos, que se caracterizan por su carga natural negativa y su habilidad de interactuar con moléculas cargadas positivamente [147].

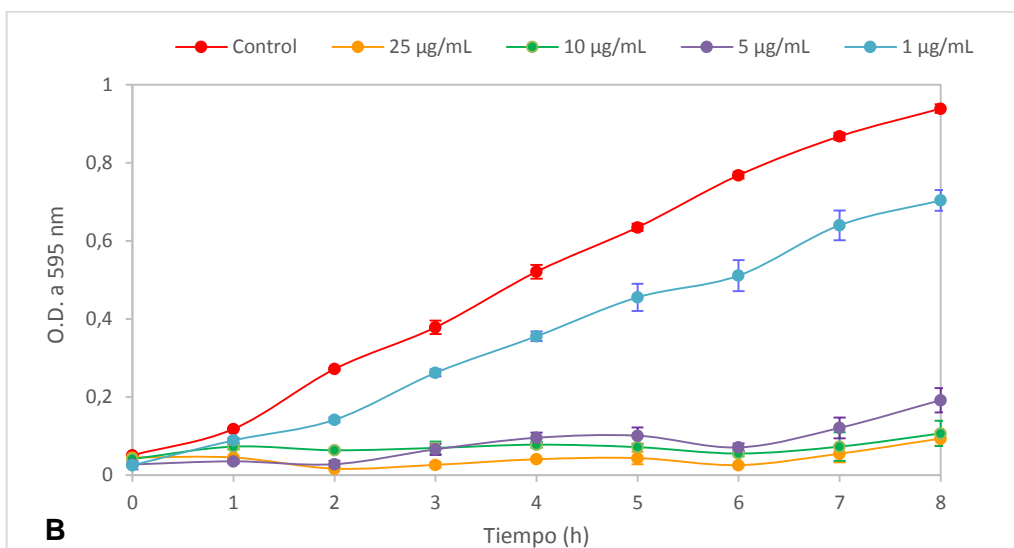
Algunos estudios han propuesto tres diferentes mecanismos de acción para las AgNPs. Primero, las AgNPs atacan la superficie de la membrana celular alterando funciones principales, como permeabilidad y respiración celular [148]. Esta hipótesis se refuerza con estudios que muestran la plasmólisis (separación del citoplasma de la pared celular) en *P. aeruginosa* y la inhibición de la síntesis de la pared celular en *S. aureus* [148]. En segundo lugar, una vez las AgNPs logran penetrar la bacteria, éstas pueden interactuar con algunas proteínas citoplasmáticas que contengan sulfuros o grupos fosfatos. De hecho, se cree que parte la actividad biológica de las AgNPs está atribuida a esta gran afinidad puesto que la mayoría de las proteínas presentes en la membrana, interna como externamente, contienen azufre o fósforo lo que conduce a una mayor interacción con las AgNPs causando la muerte celular

[149], [150]. En tercer lugar, se ha observado que las AgNPs, presentan más de un estado de oxidación, pues no sólo está presente  $Ag^0$ , sino también especies iónicas  $Ag^+$  en concentraciones micromolares [150]. Ambas especies contribuyen en la actividad antibacteriana. Estudios previos demuestran que existe una liberación de iones  $Ag^+$  desde las AgNPs que podrían aportar en el efecto bactericida presentado frente a *E. coli* y *S. aureus* [53].

La figura 18 muestra las cinéticas de crecimiento de SARM en presencia de las nanopartículas de ZnO sintetizadas en presencia de DEG (A) y PEG (B). Se puede observar que en concentraciones iguales a 5  $\mu\text{g/mL}$  el porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano superaba el 50%. Estos resultados confirman el potencial microbicida de las ZnONPs sintetizadas, pues se ha registrado en la literatura efecto inhibitorio de nanopartículas de ZnO frente a *S. aureus* desde concentraciones de 39  $\mu\text{g/mL}$  [151].

**Figura 18** Cinéticas de crecimiento de SARM en presencia de diferentes concentraciones de ZnONPs **A)** DEG **B)** PEG Las cinéticas se realizaron durante 8h a 37°C con una agitación de 200 rpm.





**Fuente:** Autor.

Adicionalmente, se pudo observar que el efecto inhibitorio en el crecimiento de SARM en presencia de ZnONPs, es dosis dependiente, ya que a mayor concentración de nanopartículas, mayor inhibición del crecimiento de SARM. Este resultado es concordante con lo publicado por otros autores en previas investigaciones. [152]. Así mismo, se ha relacionado la actividad antimicrobiana con las propiedades fisicoquímicas como tamaño, forma, carga y composición química superficial de las ZnONPs [150]. Al igual que en la mayoría de los materiales metálicos, las nanopartículas de ZnO exhiben mayor actividad antibacteriana que su equivalente en micro escala. Dado que los dos tipos de nanopartículas de ZnO sintetizadas no presentan cambios significativos en el tamaño promedio, la actividad antibacteriana tampoco muestra diferencias marcadas, pues en ambos casos hubo inhibición desde 5 µg/mL.

La tabla 5 muestra las CMI<sub>50</sub> y CMB determinadas para las AgNPs y ZnONPs frente a SARM. De acuerdo con la literatura, las AgNPs sintetizadas presentan mayor actividad antimicrobiana frente a cepas iguales de SARM que las nanopartículas obtenidas por otros autores, pues éstos han publicado CMI de 14.38 µg/mL y 50 µg/mL [153], [154]. Así mismo, los valores de CMI<sub>50</sub> de ZnONPs frente a *S. aureus*

son muy inferiores comparado con lo publicado por otros autores [151], [155]. Estos resultados evidencian que las nanopartículas sintetizadas presentan un potente efecto inhibitor en el crecimiento de la bacteria.

**Tabla 5** Propiedades antibacterianas de las AgNPs y las ZnONPs frente a SARM.

Tipo de Nanopartículas	Condiciones de Síntesis			Actividad antibacteriana frente a SARM	
	Agente reductor/oxidante	Solvente	Relación molar	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMB (µg/mL)
AgNPs	Glucosa	Gelatina	4	0.50	>5
AgNPs	Glucosa	Gelatina	8	0.50	>5
AgNPs	Maltosa	Gelatina	4	0.25	5
AgNPs	Maltosa	Gelatina	8	0.50	5
ZnONPs	Hidróxido de Sodio	DEG	4	2.50	>100
ZnONPs	Hidróxido de Sodio	PEG	4	2.50	>100

**Fuente:** Autor.

Otro factor que influye directamente en la actividad antibacteriana es la carga superficial de las nanopartículas otorgada por los grupos funcionales cargados en la superficie de las nanopartículas. A mayor carga superficial positiva presente de las nanopartículas, mayor será la interacción electrostática con la membrana bacteriana y por tanto mayor efecto inhibitorio. Las ZnONPs sintetizadas en presencia de DEG y PEG presentan una carga positiva de +13.5 mV y +4.2 mV respectivamente (ver tabla 4) adquirida en ambiente circundante con el PEI, que actúa como agente catiónico y permite mejor acceso a la bacteria y potenciar el efecto antimicrobiano.

Se ha investigado el posible mecanismo de acción de las ZnONPs sobre bacterias encontrándose que éstas causan rompimiento de la membrana bacteriana. La posible producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) como superóxidos y radicales hidroxilos llevaría a la deformación de la membrana

bacteriana [156]. Algunas de estas especies reactivas de oxígeno liberadas de la superficie del ZnO, como los peróxidos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pueden penetrar la membrana celular y provocar la lisis de la bacteria. Estudios recientes demuestran que las ROS generados fueron capaces de causar la oxidación de los lípidos de la membrana en la pared celular mediante la determinación del malondialdehído, que es un subproducto de la reacción de peroxidación de lípidos de ácidos grasos insaturados [152].

#### 4.2.2 Determinación de CMI y CMF frente a *Candida albicans*

En la tabla 6 se puede observar la actividad antifúngica de las nanopartículas metálicas sintetizadas. Los valores encontrados de CMI frente a *C. albicans* fueron inferiores cuando se utilizó AgNPs como agente antifúngico en comparación con ZnONPs. Este resultado se relaciona con los valores de actividad antibacteriana y confirman que la actividad antimicrobiana intrínseca de la plata es superior al ZnO sintetizado, probablemente por su mayor habilidad para interactuar favorablemente con las proteínas de membrana que contienen azufre o nitrógeno [149], [150]. La tabla 6 también muestra que no existen diferencias significativas entre los diferentes tipos de AgNPs sintetizados con respecto a la actividad antifúngica, lo que podría estar relacionado con las similares propiedades fisicoquímicas de igual manera como se observó en la actividad frente a SARM.

**Tabla 6** Propiedades antifúngicas de las AgNPs y las ZnONPs frente a *Candida albicans* ATCC10231.

Tipo de Nanopartículas	Condiciones de Síntesis			Actividad antifúngica frente a <i>Candida albicans</i>	
	Agente reductor/oxidante	Solvente	Relación molar	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMF (µg/mL)
AgNPs	Glucosa	Gelatina	4	< 0.1	0.2
AgNPs	Glucosa	Gelatina	8	< 0.1	0.4

AgNPs	Maltosa	Gelatina	4	< 0.1	0.2
AgNPs	Maltosa	Gelatina	8	< 0.1	0.4
ZnONPs	Hidróxido de Sodio	DEG	4	< 0.5	1
ZnONPs	Hidróxido de Sodio	PEG	4	< 0.5	1

**Fuente:** Autor.

La actividad antifúngica de las AgNPs y ZnONPs frente a *C. albicans* ha sido evaluada por otros autores, siendo las CMI<sub>50</sub> más bajas de 0.5 µg/mL y 0.9 µg/mL, respectivamente [157], [158]. Las CMI<sub>50</sub> determinados de las nanopartículas sintetizadas en el presente estudio frente a *C. albicans* son inferiores a las publicadas en la literatura, lo cual indica que las nanopartículas presentan mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de la levadura y por lo tanto exhibe mejores propiedades antifúngicas que las nanopartículas anteriormente evaluadas.

Al realizar la comparación entre la actividad antibacteriana y la actividad antifúngica de las nanopartículas de plata se pudo observar que se requirieron menores concentraciones para inhibir el crecimiento de *C. albicans* que para inhibir SARM. Esta diferencia puede estar asociada al grado de patogenicidad de cada uno de los microorganismos evaluados [46]. La cepa utilizada de *S. aureus* en este estudio fue una cepa resistente a varios antibióticos β-lactámicos, pues se evaluó frente a otros antibióticos y se encontró que presentó resistencia frente a penicilina y oxacilina, mientras que la cepa de *C. albicans* empleada fue una cepa de referencia ATCC 10231 sensible dosis dependiente frente al fluconazol comercial con una CMI<sub>50</sub> de 16 µg/mL.

Por otra parte, las ZnONPs presentaron mayor actividad fungicida con una CMF de 0.5 µg/mL mientras que para alcanzar una concentración bactericida se requirió más de 100 µg/mL. Este hecho puede estar relacionado con la estructura menos compleja de las bacterias que las pone en desventaja frente a las levaduras, que al ser células eucariotas presentan mayor organización estructural y una mejor desintoxicación de su sistema [159]. El efecto tóxico selectivo contra organismos procariotas y

eucariotas de las ZnONPs ha sido confirmado por estudios anteriores, donde a una concentración tóxica frente a bacterias en unidades de milimoles producen mínimos efectos sobre la viabilidad de células eucariotas humanas de linfocitos tipo T [155], [159].

Algunos estudios previos han investigado el posible mecanismo de acción de las AgNPs. Se ha publicado que se puede presentar un daño en la estructura de la membrana de *C. albicans* durante la exposición a AgNPs. Mediante análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) se observó la formación de “piscinas” sobre su superficie lo que conlleva a la formación de poros y la muerte celular. También se ha reportado que las AgNPs inhiben el proceso de gemación normal de la levadura, probablemente a través del daño causado en la membrana celular [160]. Adicionalmente, las células levaduriformes contienen en su membrana ergosterol que se intercala en varios gradientes entre la membrana citoplasmática y permiten su correcto funcionamiento. Como resultado de la interacción con las AgNPs este gradiente se rompe, lo que conduce a daño permanente de la membrana, y por tanto a la muerte celular [157].

### **4.3 ENCAPSULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS**

Con el objetivo de mejorar las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas sintetizadas, se evaluó el uso de tres biopolímeros (PLGA, PLA y quitosano) como agentes encapsulantes.

Para llevar a cabo la síntesis de nanocompuestos, se seleccionaron las mejores nanopartículas de cada tipo (Ag y ZnO) de acuerdo con las mejores características fisicoquímicas, mayor estabilidad en función del tiempo y actividad antimicrobiana. En el caso de las AgNPs se seleccionaron las sintetizadas empleando maltosa con relación molar 4:1 (maltosa:plata) y en el de las ZnONPs, las obtenidas en presencia de DEG como solvente.

#### 4.3.1 Nanoencapsulación de nanopartículas utilizando PLGA y PLA

Teniendo en cuenta que la naturaleza química del PLGA y del PLA es similar, se utilizó la metodología de doble emulsión- evaporación del solvente anteriormente descrita para la encapsulación de AgNPs y ZnONPs en cada uno de estos dos polímeros. Para evaluar algunas de las variables más importantes para la obtención de nanocompuestos empleando PLGA o PLA como agente encapsulante se realizó un estudio preliminar.

La metodología de encapsulación empleando doble emulsión- evaporación del solvente consta de tres procesos fundamentales. El primero de ellos fue la primera emulsión donde se homogenizó una fase acuosa que contiene el agente activo, en este caso las nanopartículas metálicas, con una fase orgánica que contiene el polímero. Se eligió como solvente orgánico diclorometano (DCM) debido a que era un solvente apropiado para el polímero y altamente miscible en agua, lo que facilitó la rápida precipitación del polímero en la formación de la segunda emulsión [161].

A continuación se realizó la segunda emulsión sobre una fase acuosa de mayor volumen que contenía un agente catiónico y agente estabilizante, resultando en una emulsión múltiple del tipo  $W_1/O/W_2$ . La segunda emulsión se realizó a 15500 rpm ya que se ha establecido que cuando la segunda emulsión se realiza a altas velocidades, las microgotas preformadas en la primera emulsión disminuyen de tamaño y la estructura tipo cápsulas se convierte en la más dominante [86].

Así mismo, se evaluaron dos agentes estabilizantes, poloxámero y polivinil alcohol (PVA), con el fin de observar el efecto sobre el tamaño promedio de los nanocompuestos. Cuando se utilizó poloxámero 407 se obtuvieron nanopartículas con un tamaño hidrodinámico promedio alrededor de 300 nm y con baja polidispersión, siendo estos tamaños menores a los obtenidos con PVA.

La concentración del agente catiónico utilizado polietilenimina (PEI) se varió en función de la carga superficial de los nanocompuestos, desde 0.1% hasta 0.5% (p/v). Los resultados obtenidos indicaron que al incrementar la concentración de PEI, la carga superficial de los nanocompuestos disminuye. Este resultado se debe a que la PEI es un polielectrolito, por tanto, incrementa la fuerza iónica del medio debido a los grupos ionizables presentes en su estructura, de manera que disminuyen las interacciones iónicas con la nanopartícula, en consecuencia el potencial zeta disminuye [162]. La mayor carga superficial positiva se obtuvo a una concentración de PEI de 0.25 %(p/v), por lo que fue la mejor concentración de PEI establecida.

Adicionalmente se evaluó el efecto del pH sobre la carga superficial y la estabilidad del tamaño promedio de los nanocompuestos obtenidos en un rango desde 5 hasta 7.5 con intervalos de 0.5. De acuerdo a los resultados obtenidos se evidenció que la carga superficial de los nanocompuestos fue inversamente proporcional al incremento del pH. Mientras que el tamaño promedio de partícula se mantenía estable en un rango de pH entre 6 y 7. Se determinó que a un pH de 6.5 los nanocompuestos fueron estables con una carga superficial positiva.

La tabla 7 resume las condiciones experimentales establecidas para la síntesis de nanocompuestos empleando la metodología de doble emulsión- evaporación de solvente que se utilizaron para las síntesis posteriores.

**Tabla 7** Condiciones de reacción determinadas para el proceso de encapsulación de nanopartículas empleando PLGA o PLA.

Variables	Valores
[Polímero] mg/mL	25
[AgNPs] ppm	12500
[PEI] (% w/v)	0.25
[Poloxámero] (%w/v)	0.5
Velocidad de primera emulsión	3000
Velocidad de segunda emulsión	15500
Relación en masa Polímero: AgNPs	1:2

Fase orgánica (DCM) (mL)	1
Fase acuosa interior (mL)	0.1
Fase acuosa exterior (mL)	10
Ajuste pH	6.5

**Fuente:** Autor.

#### 4.3.2 Nanoencapsulación de nanopartículas utilizando Quitosano

La nanoencapsulación empleando quitosano como polímero se realizó mediante gelificación ionotrópica en presencia de tripolifosfato (TPP). Con el fin de encontrar las mejores condiciones que permitieran obtener nanocompuestos de quitosano estables, de un tamaño promedio entre 200nm y 300 nm, se realizó inicialmente un estudio de las variables más importantes la síntesis.

En la gelificación ionotrópica se da la formación de redes sin reacción química (solo por intercambio de iones) debido al entrecruzamiento de cadenas poliónicas con contraiones multivalentes. Por tanto, es importante que la velocidad de adición del TPP (que aporta cinco grupos fosfato con cargas negativas) sobre el quitosano (que actúa como un catión polivalente) sea lenta de manera que permita un mayor entrecruzamiento. [163].

La concentración de quitosano es un parámetro que influye directamente sobre el tamaño del nanocompuesto sintetizado. Los resultados obtenidos evidenciaron que debido a su alta viscosidad, concentraciones iguales o superiores a 0.3% no permitieron la formación de nanocompuestos, sino que se formaron agregados de tamaño de micras.

Uno de los parámetros que más afecta en el tamaño de los nanocompuestos finales es la relación molar entre el quitosano y el TPP. Se ha evidenciado que la relación molar de Quitosano:TPP más adecuada para la obtención de nanopartículas altamente homogéneas y estables en función del tiempo, es de 5:1. Por lo tanto esta

fue la condición que se utilizó en todos los ensayos de nanoencapsulación mediante gelificación ionotrópica [75].

Adicionalmente se evaluó la mejor concentración de AgNPs necesaria para la encapsulación en matrices de quitosano a partir del porcentaje de carga de nanopartículas. Se estableció que el máximo porcentaje de carga en masa de AgNPs con respecto al quitosano era de 20%, lo que equivale a una concentración inicial de nanopartículas metálicas, similar a lo publicado por otros autores [164].

La tabla 8 resume las condiciones experimentales establecidas para la síntesis de nanocompuestos empleando quitosano que se utilizaron para las síntesis posteriores.

**Tabla 8** Condiciones de reacción determinadas para el proceso de encapsulación de nanopartículas empleando quitosano.

Variables	Valores
[QTS] (% w/v)	0.1%
[NPs] ppm	5000
[TPP] (% w/v)	0.1%
Relación QTS:TPP (w:w)	5:1
Velocidad de adición	1 gota/sg
Velocidad de agitación (rpm)	300
Tiempo de reacción (h)	2
Temperatura (°C)	25

**Fuente:** Autor.

#### 4.4 CARACTERIZACIÓN DE ENCAPSULADOS

Las características fisicoquímicas de los nanocompuestos como el tamaño hidrodinámico, carga superficial, morfología, y porcentaje de encapsulación, confieren las principales propiedades de las nanopartículas poliméricas como

sistema de liberación de fármacos. La técnica que se utilizó para la determinación de tamaño promedio y distribución de tamaños fue dispersión de luz en modo dinámico (DLS), la cual brindó información del diámetro hidrodinámico de los nanocompuestos en suspensión. Se estableció la carga superficial de los nanocompuestos mediante la determinación del potencial zeta atribuido al desplazamiento electroforético de las nanopartículas en solución. Los porcentajes de encapsulación pudieron determinarse por diferencia en masa inicial de las nanopartículas metálicas mediante espectroscopia de absorción atómica. Para evaluar la interacción y/o modificación de los enlaces covalentes presentes en los polímeros empleados en presencia de las nanopartículas metálicas, se utilizó espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). La morfología de las nanopartículas se determinó por microscopía electrónica de barrido (SEM) o transmisión (TEM).

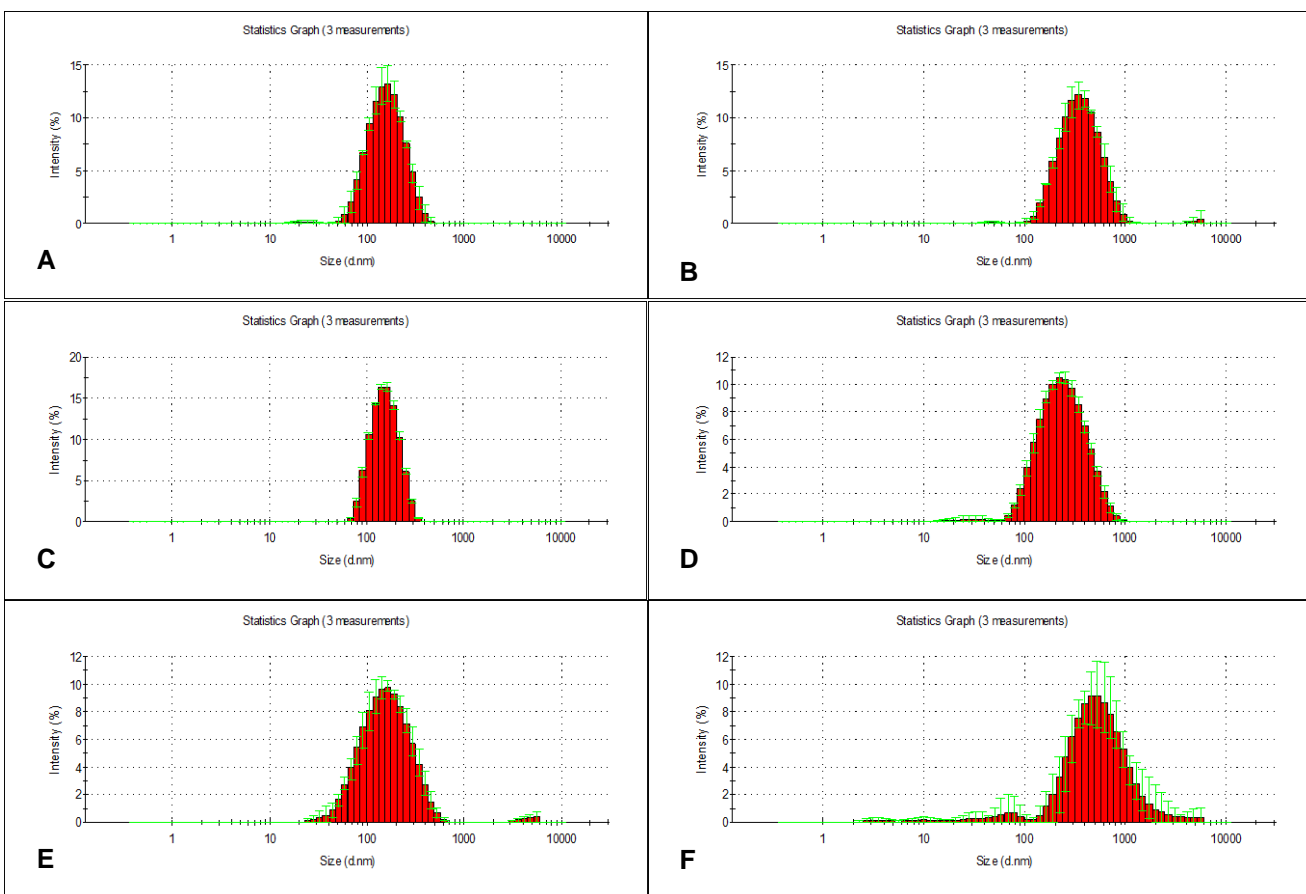
#### **4.4.1 Dispersión de luz en modo dinámico (DLS)**

En la figura 19 se encuentran los tamaños promedios hidrodinámicos obtenidos para los seis nanocompuestos sintetizados obtenidos mediante DLS. Se pudo evidenciar que todos los nanocompuestos obtenidos que contenían AgNPs presentaron menores tamaños promedios que aquellas que contenían ZnONPs. Este resultado podría estar relacionado con la alta polidispersión de las ZnONPs libres (ver tabla 4) que indica poblaciones de diferentes tamaños presentes en la muestra, y por tanto la distribución de tamaño de los nanocompuestos obtenidos con ZnONPs también será mayor. Sin embargo, todos los nanocompuestos obtenidos no superan los 400 nm presentando baja polidispersión (por debajo de 0.50), lo cual indica que el método de síntesis fue apropiado para la obtención de nanocompuestos.

La figura 19 también muestra que la distribución de tamaño de los nanocompuestos en la mayoría se encuentra en una sola población con un máximo alrededor de 200nm. Se ha visto evidenciado que es recomendable, para que se pueda manifestar

un mayor efecto antibacteriano, que el tamaño de partícula tenga un estricto control en el rango entre 200 y 400 nm [165]. A pesar de que la encapsulación de agentes activos también se puede obtener mediante sistemas microparticulados, las formulaciones en nanoescala se encuentran favorecidas debido a una mayor interacción con la membrana bacteria, que se encuentra distribuída como una matriz con intersticios de un tamaño promedio entre 20 y 300 nm [166]. Otra ventaja que presentan, en virtud de su pequeño tamaño, es que los nanocompuestos pueden evadir las eficazmente los fagocitos presentes en el organismo, conllevando a un incremento en la biodisponibilidad del agente activo en el lugar de la infección [167].

**Figura 19** Distribución de tamaño promedio obtenido por DLS de los nanocompuestos sintetizados **A)** PLGA@Ag **B)** PLGA@ZnO **C)** PLA@Ag **D)** PLA@ZnO **E)** QTS@Ag **F)** QTS@ZnO.

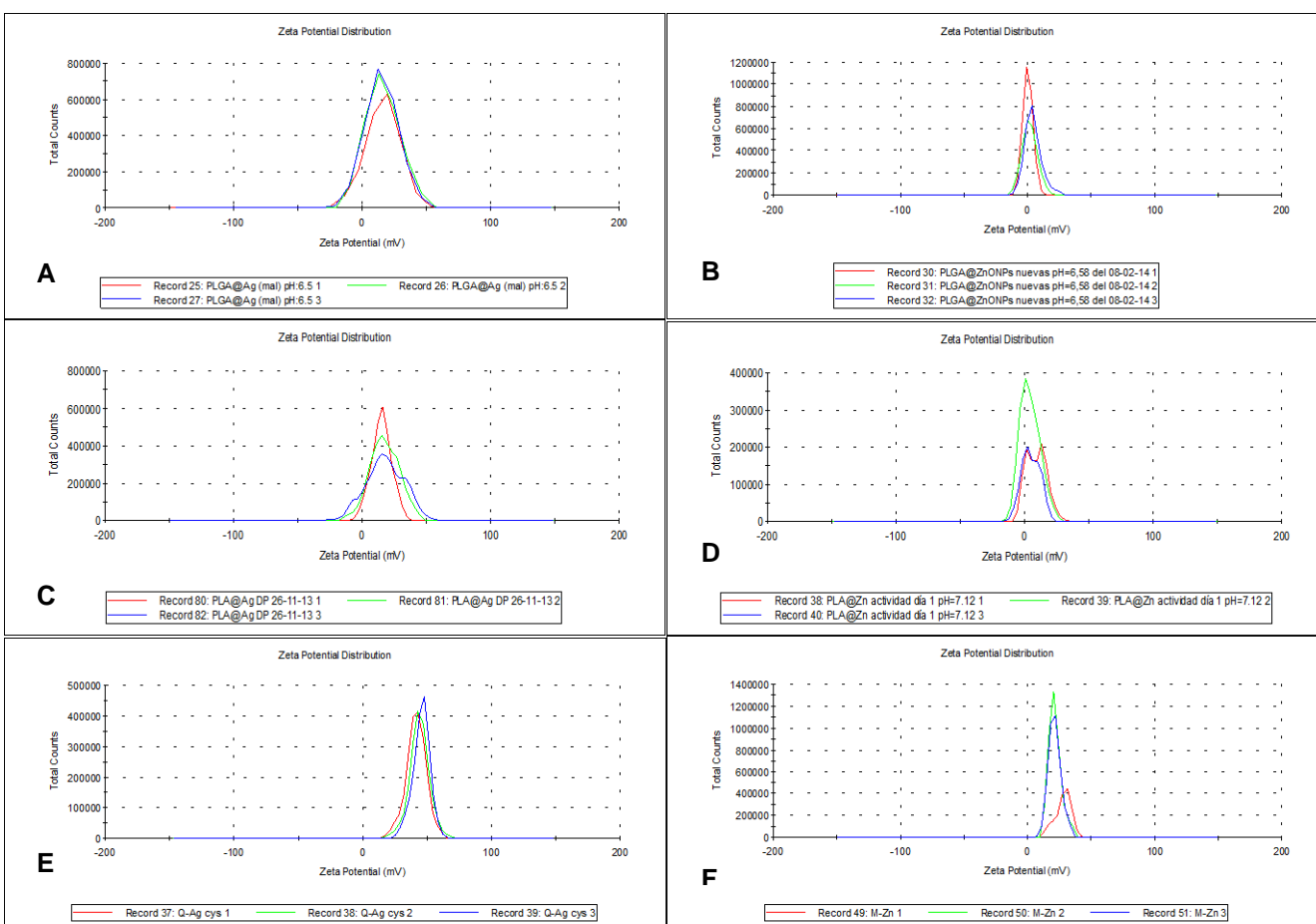


**Fuente:** Autor.

#### 4.4.2 Potencial Zeta

La figura 20 muestra los potenciales zeta de los nanocompuestos obtenidos, reflejo de la carga superficial de las nanopartículas en dispersión. Se puede apreciar que en la mayoría de casos esta carga superficial es positiva, lo que indicaría una interacción electrostática favorable con la membrana del microorganismo. En el caso de los nanocompuestos encapsulados con PLA y PLGA esta carga positiva se atribuye al efecto del agente catiónico empleado en la síntesis, PEI. La polietilenimina se encuentra fuertemente cargada debido a su estructura ramificada con alto contenido de grupos amino, lo que permite estabilizar los nanocompuestos, evitando su aglomeración y también presentan carga positiva.

**Figura 20** Distribución de carga superficial determinados mediante la medición del potencial zeta de los nanocompuestos sintetizados **A) PLGA@Ag B) PLGA@ZnO C) PLA@Ag D) PLA@ZnO E) QTS@Ag F) QTS@ZnO**.



Fuente: Autor.

Adicionalmente se puede observar que cuando el agente activo empleado fueron las ZnONPs la carga superficial disminuyó en aproximadamente 10 unidades. Este fenómeno puede atribuirse a que el ZnO, debido a su estructura hexagonal, presenta una tendencia a formar cargas negativas. Algunos autores han registrado la producción de ZnONPs en ausencia de agentes estabilizantes con cargas superficiales negativas [135]. Sin embargo, ésta se puede modificar en presencia de algunos polímeros como grupos fostatos y polietilenglicol. Recientes estudios demuestran que el incremento en la carga superficial de las ZnONPs dependen de la concentración y el peso molecular del polímero empleado [168].

Por otra parte, como lo muestra la tabla 9, los nanocompuestos obtenidos empleando quitosano como agente encapsulante, mostraron una carga superficial mucho mayor lo que le proporciona mayor estabilidad a los mismos. Las cargas superiores a +30mV indica que partículas de un líquido no tienden a asociarse o a formar sedimentos. Estas cargas superficiales se presentan debido a la gran cantidad de grupos amino libres que quedan expuestos en la superficie de los nanocompuestos provenientes del entrecruzamiento del TPP con el quitosano.

**Tabla 9** Propiedades físicas determinadas para las nanopartículas encapsuladas en tres diferentes polímeros empleando un equipo Zetasizer.

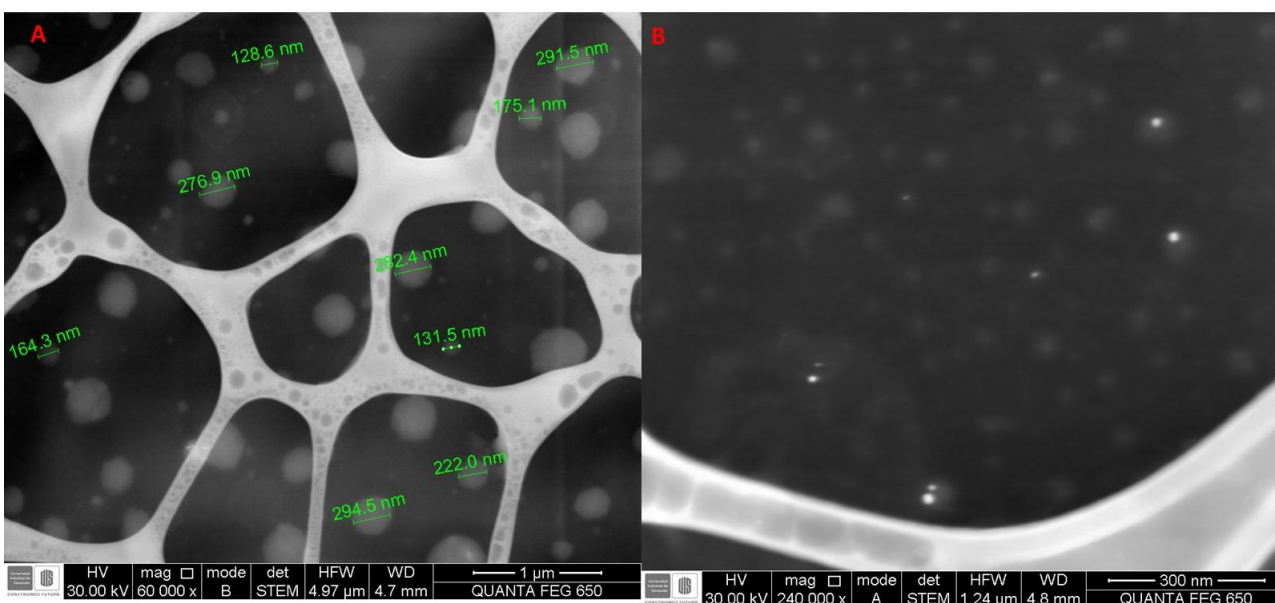
Tipo de Nanocompuesto	Tamaño promedio (nm)	Pdl	Carga superficial (mV)
PLGA@Ag	162.30 ± 3.05	0.27 ± 0.03	+ 15.70 ± 0.43
PLGA@ZnO	369.43 ± 17.62	0.34 ± 0.05	+ 6.44 ± 0.68
PLA@Ag	154.33 ± 11.62	0.11 ± 0.01	+ 16.70 ± 1.48
PLA@ZnO	266.50 ± 14.12	0.25 ± 0.01	+ 6.00 ± 2.59
QTS@Ag	174.83 ± 12.49	0.24 ± 0.01	+ 43.47 ± 1.89
QTS@ZnO	390.0 ± 51.91	0.56 ± 0.01	+ 30.07 ± 4.93

**Fuente:** Autor.

#### 4.4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

De acuerdo con la figura 21 los nanocompuestos empleando PLGA como agente encapsulante presentan un tamaño promedio alrededor de 200nm, valor cercano al determinado por DLS. Sin embargo, los tamaños promedios determinados por DLS son ligeramente mayores que los determinados por SEM. Este fenómeno puede deberse a efectos hidrodinámicos, a capas de iones presentes alrededor de las partículas y los agregados que puedan haberse formado en el proceso de síntesis [169]. Los nanocompuestos presentan morfología uniformemente esférica sin la presencia de aglomerados. Adicionalmente, la figura 21 B muestra la diferencia de contrastes entre el polímero y las AgNPs, lo que confirma la internalización heterogénea de las nanopartículas metálicas e la matriz del PLGA.

**Figura 21** Microscopías electrónica de barrido (SEM) de los nanocompuestos de PLGA@Ag en dos diferentes zonas.

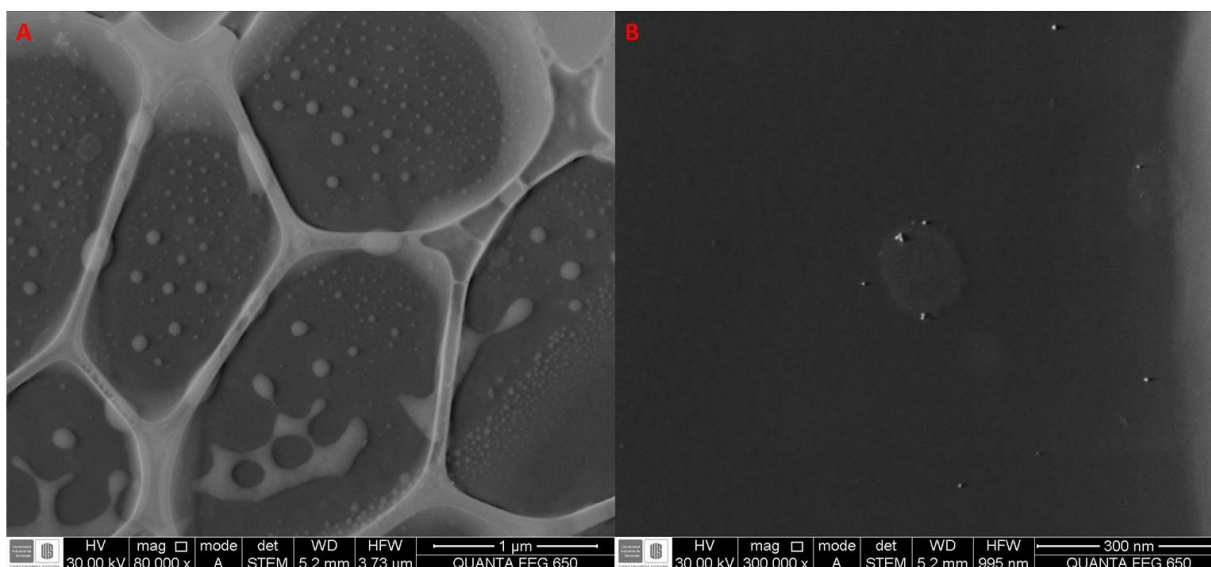


**Fuente:** Autor.

En la figura 22 se puede apreciar las microscopías de los nanocompuestos de PLA@Ag. Se observa que los nanocompuestos obtenidos presentan una amplia distribución de tamaños con morfología mayoritariamente esféricas. Se ha publicado que cuando se realiza la segunda emulsión se pueden obtener diferentes estructuras dependiendo del grado de atrapamiento de la microgota en la fase acuosa interior

pues puede no atrapar ninguna, una o más de una. Estas microgotas se comportan de manera diferente durante la eliminación del disolvente, y por tanto conduce a diferentes morfologías en las nanopartículas finales [86]. Al igual que las PLGA@Ag, la figura 22 B muestra la carga de las nanopartículas metálicas. En este caso, el contraste se puede apreciar en la superficie del nanocompuesto de PLA, lo que podría indicar que una interacción electrostática únicamente.

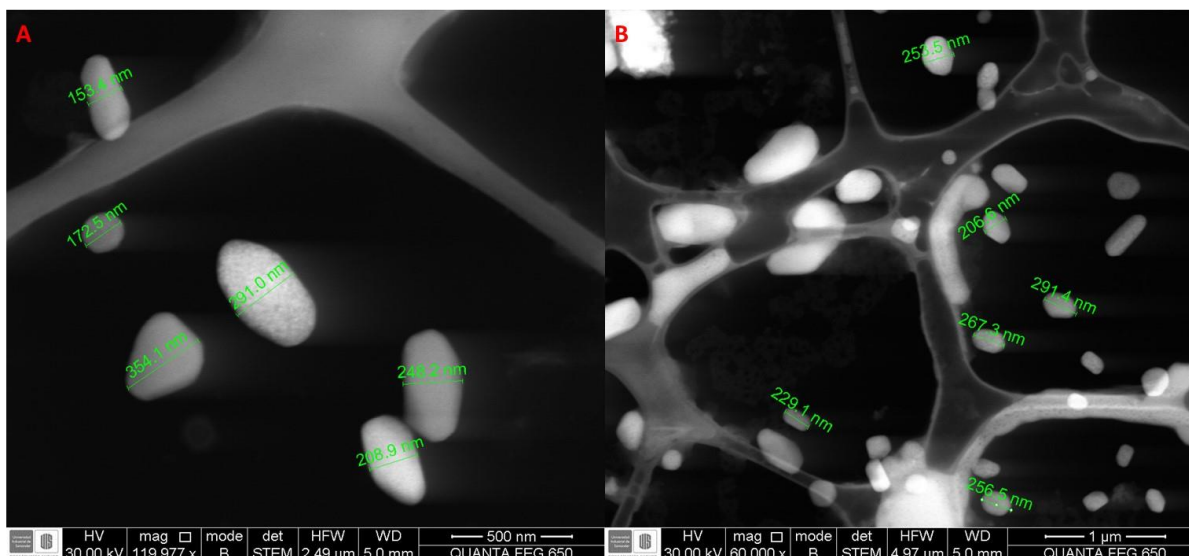
**Figura 22** Microscopías electrónica de barrido (SEM) de los nanocompuestos de PLA@Ag en dos diferentes zonas.



**Fuente:** Autor.

En la figura 23 se puede observar las microscopías de barrido obtenidas de los nanocompuestos PLGA@ZnO y PLA@ZnO respectivamente. Los nanocompuestos presentan un tamaño promedio de 280nm, similar al observado por DLS. Se muestran estructuras ovaladas donde se puede apreciar variación del contraste en el interior de los nanocompuestos de forma definida y esférica, lo que podría atribuirse a las ZnONPs encapsuladas. Se ha publicado que las nanopartículas de ZnO pueden interactuar con los grupos carboxilo del PLGA creando complejos que podrían conllevar una eficiente porcentaje de encapsulación como lo muestra la imagen [170].

**Figura 23** Microscopías electrónica de barrido (SEM) de los nanocompuestos sintetizados **A)** PLGA@ZnO **B)** PLA@ZnO.



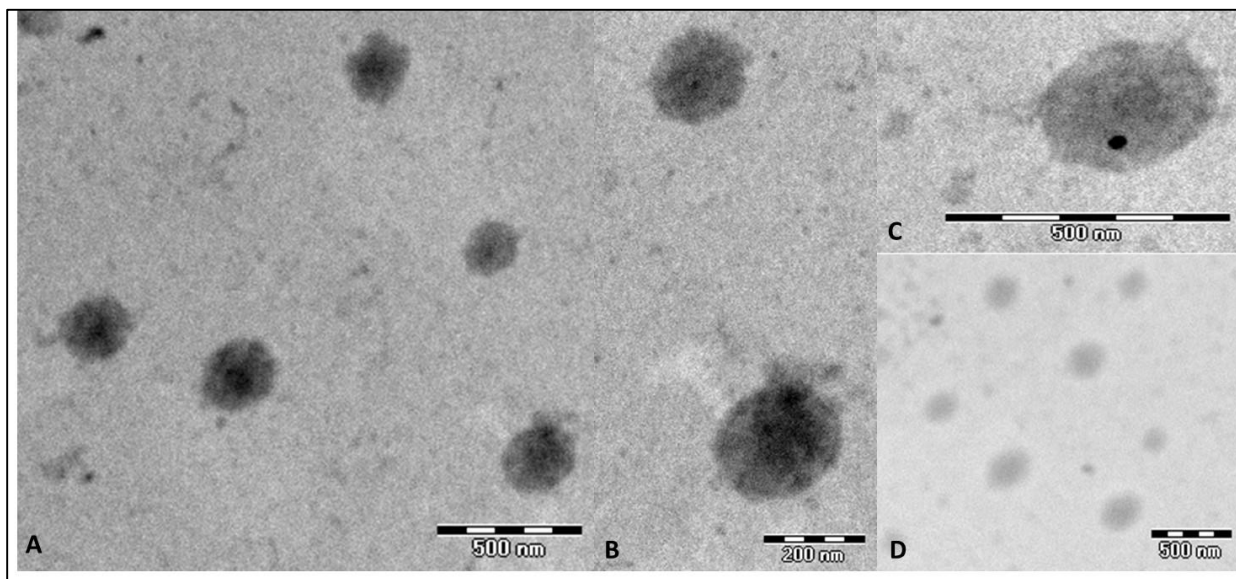
**Fuente:** Autor.

#### 4.4.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Uno de los requerimientos fundamentales para alcanzar una liberación controlada y balanceada de agentes activos en el cuerpo humano es que los nanocompuestos presenten una forma esférica y con una angosta distribución de tamaño [131].

En las imágenes de TEM de la figura 24 se pueden apreciar algunas partículas en zonas más brillante y otras más oscuras. Este contraste está relacionado con la densidad electrónica de las partículas presentes en los nanocompuestos. Así pues, teniendo en cuenta la naturaleza metálica de la plata, las partículas que mayor contraste presenten corresponderán a AgNPs, mientras que las de menor será atribuida al quitosano. Los grandes cambios de contraste en los nanocompuestos obtenidos indican la diferente composición y estructura de la muestra. Como se puede apreciar en la figura 24 B el tamaño de los nanocompuestos de QTS@Ag es menor a 200nm con morfología predominantemente esférica. La figura 24 C muestra claramente la internalización de las AgNPs en la matriz del quitosano.

**Figura 24** Microscopias de transmisión electrónica (TEM) de los nanocompuestos sintetizados con quitosano **A) QTS@Ag B) Acercamiento de QTS@Ag C) Acercamiento de QTS@Ag D) QTS@ZnO.**



**Fuente:** Autor.

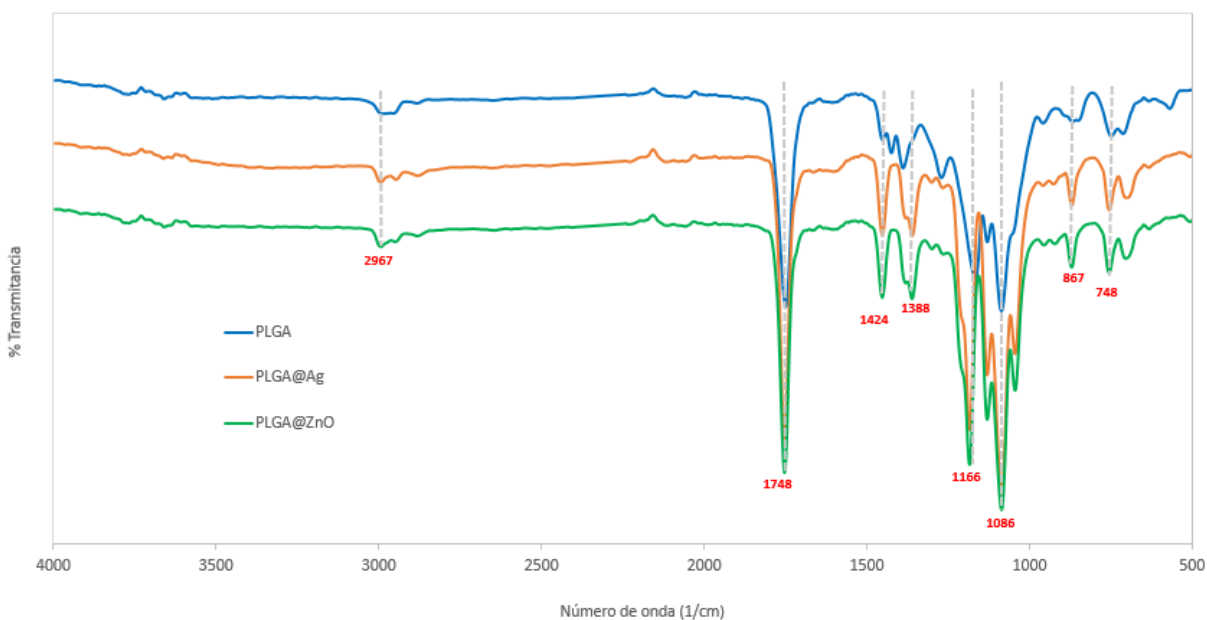
#### 4.4.5 Espectroscopia Infrarrojo

La figura 25 muestra los cambios estructurales del polímero PLGA debido a las posibles interacciones con las nanopartículas metálicas.

Se puede apreciar en el espectro del PLGA en ausencia de nanopartículas (línea azul) una banda débil en  $2987\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a vibraciones de tensión asimétrica del enlace C-H presente en los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ . A continuación una fuerte banda de absorción en  $1748\text{ cm}^{-1}$  de la vibración de tensión de grupo carbonilo C=O presente en el éster del PLGA. Las bandas de absorción a  $1424$  y  $1388\text{ cm}^{-1}$  se encuentran relacionadas con las vibraciones de flexión del grupo C-H del grupo metilo. El siguiente grupo de bandas ( $1270\text{ cm}^{-1}$ ,  $1166\text{ cm}^{-1}$ ,  $1129\text{ cm}^{-1}$  y  $1086\text{ cm}^{-1}$ ) corresponden a las vibraciones de tensión del enlace C-O presente en los enlaces

tipo éster del PLGA. Finalmente, las bandas  $867\text{ cm}^{-1}$  y  $748\text{ cm}^{-1}$  corresponde al modo de vibración de flexión y balanceo en el plano del grupo metileno respectivamente [131]. Se puede observar que en los dos siguientes espectros en presencia de AgNPs y ZnONPs no hubo cambios significativos en las principales regiones de absorción de los grupos funcionales característicos del PLGA. No obstante, se aprecia la aparición de una banda de absorción débil a  $703\text{ cm}^{-1}$ , que se asocia a la región conocida como “huella dactilar” donde podría presentarse una interacción con los enlaces vecinos, es decir, alguna modificación en la polaridad del enlace C-O. Este cambio podría ocurrir debido a la presencia e interacción inespecífica con las nanopartículas metálicas presentes en los nanocompuestos. Este resultado demuestra, que a través de la técnica de infrarrojo, no se puede concluir si hubo formación de un nuevo enlace covalente o iónico entre algún grupo funcional entre el PLGA y las nanopartículas metálicas.

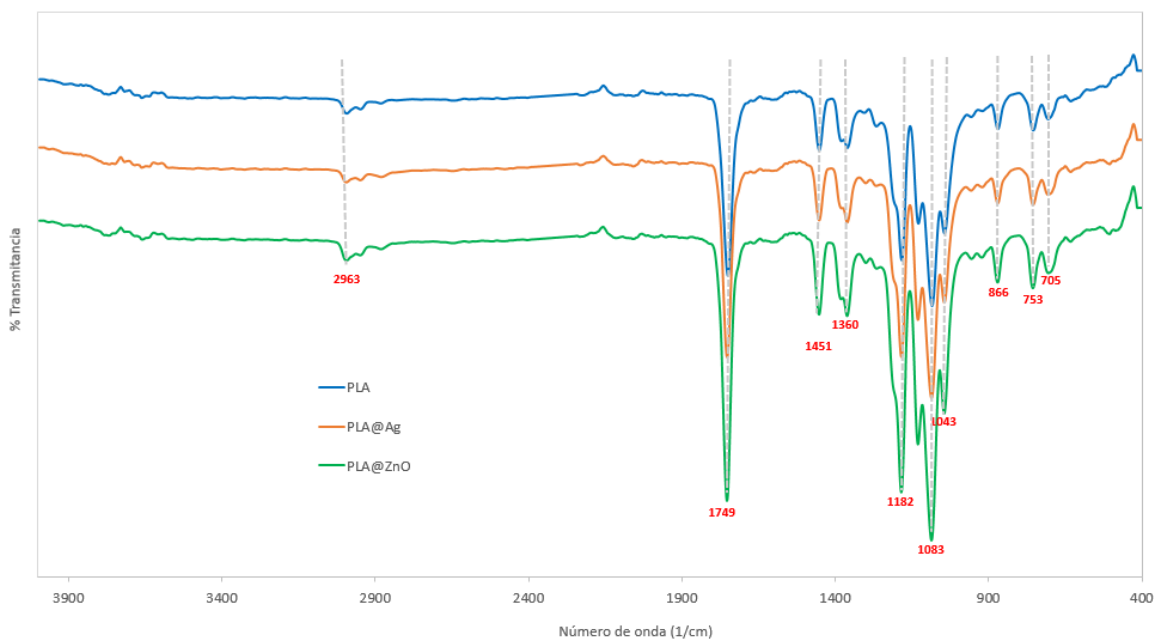
**Figura 25** Espectro de infrarrojo del polímero PLGA libre y en presencia de cada tipo de nanopartículas metálicas tras la síntesis de los nanocompuestos. Los espectros IR fueron tomados con un ancho espectral entre  $4000$  y  $600\text{ cm}^{-1}$ .



**Fuente:** Autor.

De igual manera, las figura 26 muestra el espectro infrarrojo del PLA en ausencia y en presencia de las nanopartículas metálicas. Al igual que el espectro de PLGA, las principales bandas de absorción se encuentran relacionadas a los principales grupos funcionales presentes en el éster del ácido poli-láctico. Las bandas a  $1182\text{ cm}^{-1}$ ,  $2993\text{ cm}^{-1}$  y  $3501\text{ cm}^{-1}$  fueron asignadas al modo vibracional de tensión de los enlaces C-O, C-H y O-H respectivamente, pertenecientes al grupo terminal  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-OH}$  del PLA [171]. La fuerte absorción presente a  $1749\text{ cm}^{-1}$  es característica de vibración por tensión del grupo carbonilo ( $-\text{C}=\text{O}$ ) correspondiente a ácidos carboxílicos. Los picos registrados a  $1451$  y  $1360$  fueron asignados a modos vibracionales de tensión simétrica y asimétrica de los grupos metilo y  $-\text{C-H}$  respectivamente. Se puede observar en los dos siguientes espectros en presencia de AgNPs y ZnONPs que no presentan desplazamientos en las principales regiones de absorción de los grupos funcionales característicos del PLA.

**Figura 26** Espectro de infrarrojo del polímero PLA libre y en presencia de cada tipo de nanopartículas metálicas tras la síntesis de los nanocompuestos. Los espectros IR fueron tomados con un ancho espectral entre  $4000$  y  $600\text{ cm}^{-1}$ .

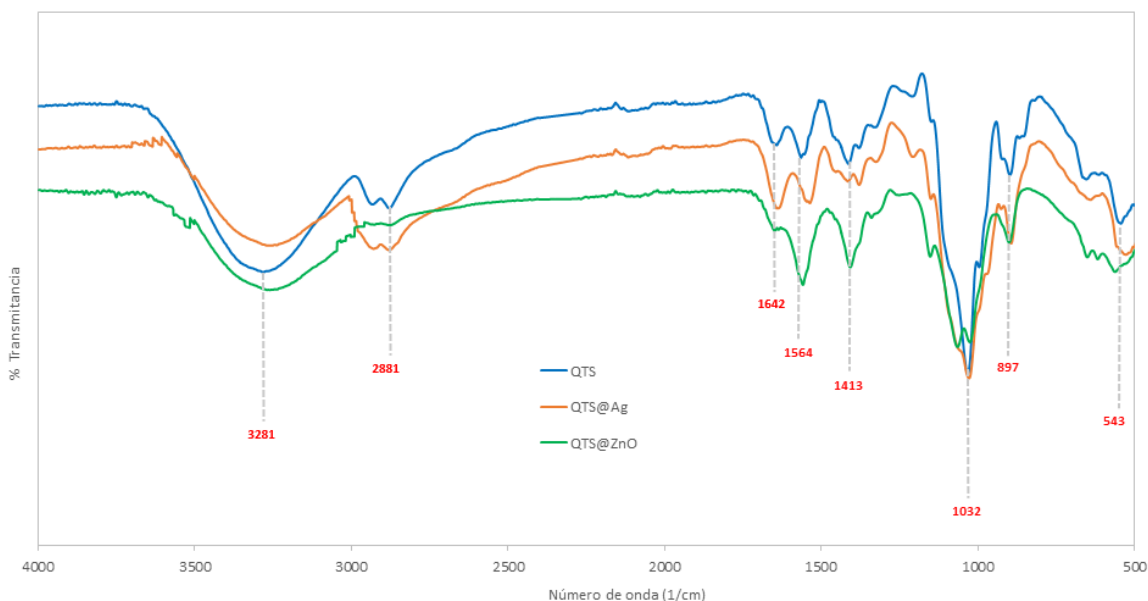


**Fuente:** Autor.

Finalmente, en la figura 27 se observan los espectros de absorción en infrarrojo de Quitosano en ausencia de nanopartículas (línea azul) y en presencia de AgNPs (línea naranja) y ZnONPs (línea verde). La banda de absorción en  $3281\text{ cm}^{-1}$  muestra el modo vibracional de tensión asimétrica combinada de los grupos amino primario ( $\text{NH}_2$ ) e hidroxilo (OH) presentes en el Quitosano. Mientras que cuando está en presencia de AgNPs esta banda se ve desplazada a  $3260\text{ cm}^{-1}$  con menor amplitud, lo que podría indicar la reducción de enlaces de Hidrógeno. Se ha propuesto que la reducción de puentes de Hidrógeno en las nanopartículas producidas por entrecruzamiento iónico puede deberse a la estructura más abierta que resulta de la reticulación del TPP con el Quitosano [172]. La siguiente banda de absorción se encuentra a  $2881\text{ cm}^{-1}$  y corresponde al solapamiento de las señales del modo vibracional de tensión asimétrica de los enlaces C-H y C-N de los grupos metilo y amino del quitosano.

Por otra parte, la banda a  $1413\text{ cm}^{-1}$  también se ve desplazada hasta  $1379\text{ cm}^{-1}$  cuando el quitosano se encuentra en presencia de AgNPs, que corresponde a la vibración del enlace OH. Esta deformación del alcohol secundario en los monómeros de la piranosa del quitosano, puede indicar que los grupos hidroxilo podrían contribuir a la estabilización de la plata en la matriz del nanocompuesto [173].

**Figura 27** Espectro de infrarrojo del polímero Quitosano libre y en presencia de cada tipo de nanopartículas metálicas tras la síntesis de los nanocompuestos. Los espectros IR fueron tomados con un ancho espectral entre 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ .



**Fuente:** Autor.

Se puede apreciar que la banda de absorción vibracional se desplaza desde 1564  $\text{cm}^{-1}$  hasta 1536  $\text{cm}^{-1}$  en presencia de AgNPs con una disminución en la intensidad de la banda en la figura 25. Este corrimiento podría estar asociado a una interacción del grupo amino primario con la superficie del metal que podría actuar como agente estabilizante de las AgNPs. La disminución de la intensidad en el enlace N-H podría deberse al aumento en el peso molecular después de la interacción con la plata, tal como se ha evidenciado por otros autores [174], [175]. De igual manera, se puede observar una banda fuerte en 1642  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al modo vibracional de flexión del enlace N-H del grupo funcional amino ( $\text{NH}_2$ ) perteneciente a las cadenas no acetiladas del quitosano. Al igual que la banda en 1564  $\text{cm}^{-1}$ , la disminución en la intensidad de esta banda de absorción en presencia de AgNPs y ZnONPs podría indicar una interacción entre las nanopartículas metálicas con el Nitrógeno de los grupos amino y amido del quitosano [176].

Posteriormente se observa una fuerte e intensa banda de absorción a  $1032\text{ cm}^{-1}$  relacionada con el modo vibracional de tensión simétrica del enlace C-N, el cual es característico para las aminas alifáticas primarias y por tanto se observa sin mayor cambio en las tres muestras. De igual manera se aprecia a  $897\text{ cm}^{-1}$  una banda correspondiente a la flexión fuera del plano del enlace N-H propia de las aminas primarias, que en este caso, están presentes en el quitosano. Finalmente, la banda alrededor de  $543\text{ cm}^{-1}$  está relacionada con la tensión en el plano de los enlaces – C-N-C- correspondiente a los grupos amido presentes en las regiones acetiladas del quitosano.

Los cambios presentados en las señales de absorción en el infrarrojo del quitosano en presencia de AgNPs indican que sí hubo una interacción probablemente electrostática que deforma la estructura de las nanopartículas de quitosano vacías. Este resultado confirma que el proceso de entrecruzamiento en presencia de AgNPs es diferente debido a la afinidad de éstas por los grupos aminos libres y los grupos hidroxilo terminales del TPP.

#### **4.4.6 Determinación del porcentaje de encapsulación**

Los porcentajes de encapsulación de los nanocompuestos obtenidos se presentan en la tabla 10. Los porcentajes de encapsulación y carga se determinaron de acuerdo a lo publicado en la literatura [165]. El porcentaje de encapsulación fue calculado con base a la masa de AgNPs encapsulada con respecto a la masa inicial de AgNPs empleada en la síntesis del nanocompuesto. El porcentaje de carga relaciona la masa de las nanopartículas metálicas con la masa inicial del polímero utilizada en el proceso de encapsulación.

Los bajos porcentajes de encapsulación ( $\leq 1.1\%$ ) se encuentran generalmente asociados a la difusión a la fase acuosa cuando una parte del principio activo, en este caso las nanopartículas metálicas, se encuentran adsorbidas superficialmente a los nanocompuestos poliméricos [165]. Por tanto, el principio activo es más fácilmente

lavado en los pasos de purificación comparado con el principio activo que esté encapsulado en la matriz polimérica, lo que conlleva a un bajo porcentaje de carga. Sin embargo, cuando se emplea un solvente inmiscible como el DCM como solvente del polímero, se podría prevenir la adsorción superficial del principio activo, lo que se reflejaría en un mayor porcentaje de carga [165]. Esta hipótesis es concordante con los resultados obtenidos pues para las encapsulaciones realizadas por la metodología de doble emulsión- evaporación del solvente, donde se empleó DCM como solvente del polímero se logró un mayor porcentaje de carga similar a lo publicado por otros autores [165].

**Tabla 10** Porcentaje de encapsulación determinado para cada uno de los nanocompuestos sintetizados.

Tipo de Nanocompuesto	Porcentaje de encapsulación	Porcentaje de carga
PLGA@Ag	24.94 ± 4.67	1.25 ± 0.23
PLA@Ag	25.43 ± 10.62	1.54 ± 0.82
QTS@Ag	2.67 ± 0.83	0.53 ± 0.05
PLGA@ZnO	24.82 ± 3.49	1.75 ± 0.93
PLA@ZnO	19.17 ± 0.59	1.56 ± 0.59
QTS@ZnO	23.91 ± 19.66	0.97 ± 0.62

**Fuente:** Autor.

Empleando la metodología de doble emulsión- evaporación de solvente se ha evidenciado que cuando el agente activo es altamente hidrofílico, el porcentaje de encapsulación es muy bajo debido a su alta solubilidad acuosa que le permite difundir a la fase acuosa externa en la síntesis [165]. Adicionalmente, si la evaporación del disolvente se realiza lentamente, es posible que el principio activo, que en este caso corresponde a las nanopartículas metálicas, estén de forma continua particionadas entre la fase acuosa externa y la interna a través de los poros superficiales de los nanocompuestos que se pudieron haber creado en la síntesis, lo que conllevaría a un menor porcentaje de encapsulación [86]. Sin embargo, las AgNPs no presentan

un comportamiento completamente hidrofílico ni hidrofóbico, pues son suspensiones sólidas en el medio líquido, y por tanto es probable que por ser un sistema coloidal no experimenten difusión entre fases tan fácilmente, conllevando a mayores porcentajes de encapsulación que los publicados en la literatura para otros agentes activos [177]–[179]. Por otra parte, el porcentaje de encapsulación de las nanopartículas metálicas en matrices de quitosano fue menor que el obtenido para los nanocompuestos sintetizados mediante doble emulsión- evaporación del solvente.

#### **4.5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ENCAPSULADOS DE NANOPARTÍCULAS**

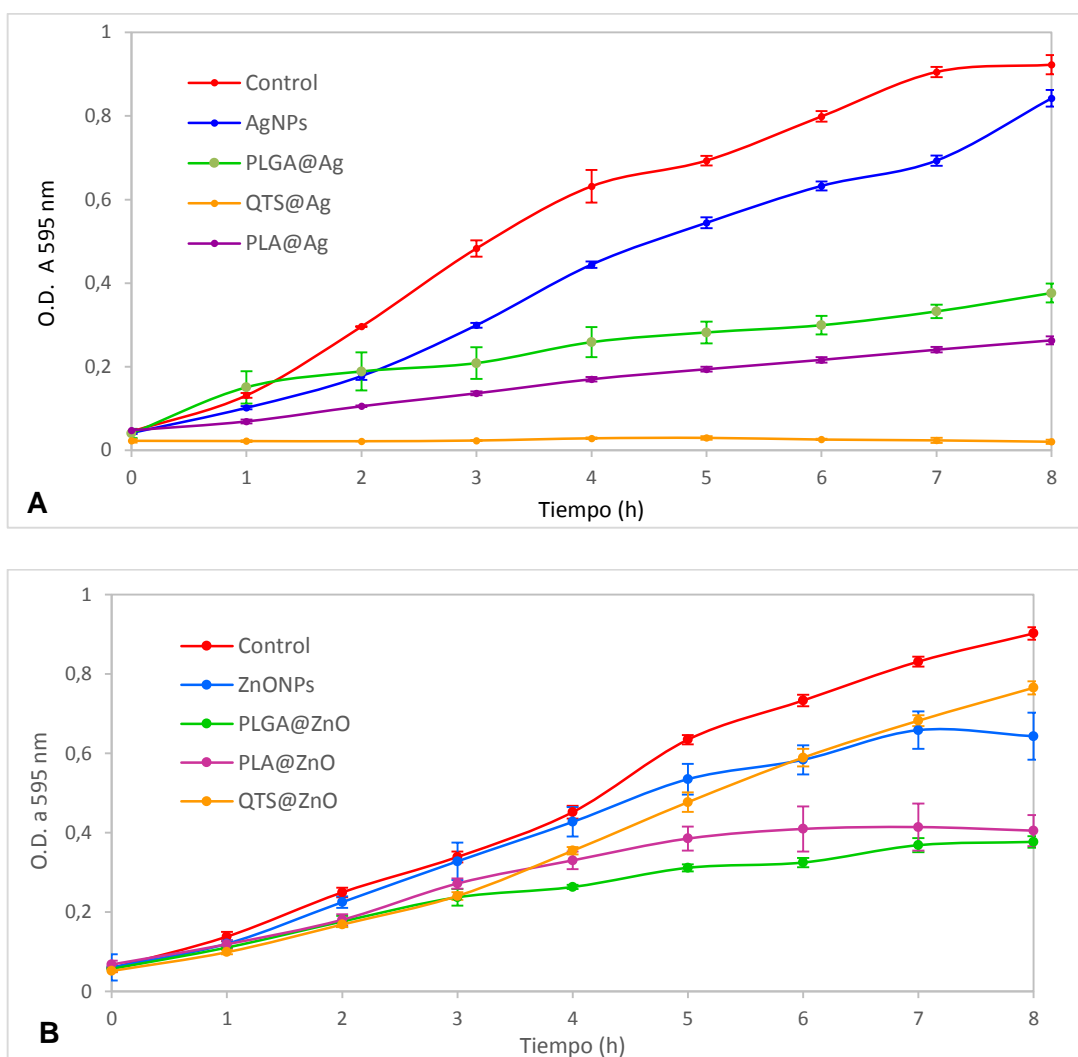
Con el fin de evaluar el cambio en la actividad antimicrobiana frente a SARM y *C. albicans* de las nanopartículas de plata y óxido de zinc encapsuladas en diferentes polímeros, se las cinéticas de crecimiento de la bacteria y se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), concentraciones mínimas bactericidas (CMB) y concentraciones mínimas fungicidas (CMF) para la bacteria y la levadura respectivamente. Todos los ensayos de actividad se realizaron empleando la metodología de microdilución en caldo incluyendo el control de crecimiento y el control de esterilidad por triplicado.

##### **4.5.1 Determinación de CMI y CMB frente a *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM)**

En la figura 28 se pueden apreciar las cinéticas de crecimiento bacteriano en presencia de una concentración establecida de nanopartículas libres y encapsuladas en cada uno de los polímeros. La figura 28 A muestra un incremento significativo en el efecto inhibitorio del crecimiento de SARM en concentraciones iguales o superiores a 0.10 µg/mL de AgNPs encapsulada con cada uno de los polímeros empleados como agentes encapsulantes. Se ha planteado que estos resultados puedan deberse a un efecto sinérgico entre los agentes estabilizantes (en este caso PEI), agente encapsulante (PLGA) y las AgNPs. Los grupos funcionales polivalentes,

especialmente catiónicos, podrían generar interacciones electrostáticas que conduciría a un aumento de las propiedades antimicrobianas de las AgNPs libres.

**Figura 28** Cinéticas de crecimiento de SARM en presencia de nanopartículas libres y encapsuladas en las tres matrices poliméricas a la misma concentración. **A)** 0.1  $\mu\text{g/mL}$  de AgNPs libre y encapsulada. **B)** 1.0  $\mu\text{g/mL}$  de ZnONPs libre y encapsulada.



**Fuente:** Autor.

Es bien sabido que la mayoría de las infecciones bacterianas son iniciadas por la adhesión de los microorganismos a las superficies mucosas del huésped [180]. Así pues, la presencia de ligandos policatiónicos daría lugar a la amplificación de interacciones electrostáticas débiles entre la membrana de la superficie de la bacteria

y el polímero. Teniendo en cuenta que la membrana de las bacterias Gram-positivas presentan ácidos teioicos, los grupos funcionales catiónicos podrían unirse a éstos a través de múltiples puntos de unión que conllevarían a acelerar la lisis de la membrana celular bacteriana [181]. Por tanto, teniendo en cuenta la naturaleza catiónica de cada uno de los polímeros y la gran proporción de los grupos funcionales cargados en la superficie de los nanocompuestos, es posible que éstos sirvan de “linkers” o puntos de unión temporales sobre la membrana negativa de SARM, lo que conllevaría a mayor disponibilidad de las AgNPs permitiéndole presentar un efecto antibacteriano más efectivo. De igual manera, estudios previos muestran que algunos antibióticos formulados en nanopartículas poliméricas han mejorado su efecto antimicrobiano frente a SARM, comparado con los antibióticos penicilínicos y N-metiltio- $\beta$ -lactámicos libres [180].

Por otra parte, se observa un efecto mayor cuando las nanopartículas metálicas se encapsulan en PLA. La tabla 11 muestra que la actividad de las AgNPs mejora en desde una concentración de 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se ha sugerido que tras la degradación del ácido poli-láctico, el monómero podría presentar propiedades antimicrobianas debido a su naturaleza de ácido orgánico a concentraciones elevadas [182]. Se ha propuesto que el ácido láctico, al ser un ácido débil lipofílico podría pasar a través de la membrana celular, deteriorada por el efecto de las AgNPs, y una vez dentro de la célula, podría liberar protones y por tanto acidificar el citoplasma que conllevaría a un desequilibrio homeostático en la misma causándole daños severos contribuyendo con el efecto antibacteriano provocado por las AgNPs [181]. Por tanto, es posible asumir que se presente un efecto combinado entre los monómeros de ácido láctico y las nanopartículas de plata sobre la actividad antimicrobiana frente a SARM bajo las condiciones de estudio.

**Tabla 11** Porcentajes de inhibición del crecimiento de SARM en presencia de nanopartículas de AgNPs libre y encapsulada a diferentes concentraciones.

Tipo de Nanocompuesto	% Inhibición en el crecimiento de SARM			CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMI <sub>90</sub> (µg/mL)
	Concentración (µg/mL)				
	0.50	0.10	0.05		
AgNPs	50%	25%	14%	0.50	5
PLGA@Ag	83%	48%	40%	0.10	>1
PLA@Ag	99%	99%	90%	< 0.05	0.05
QTS@Ag	80%	78%	30%	---	>0.5

**Fuente:** Autor.

Por otra parte, la tabla 12 muestra la actividad antibacteriana de las ZnONPs libres y encapsuladas en cada uno de los polímeros empleados como agentes encapsulantes. Al igual que la encapsulación de AgNPs, el mayor incremento en el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano se evidenció cuando se encapsuló en matrices de PLA. Así mismo, se puede apreciar que desde una concentración de 1.0 µg/mL se presentó un incremento en la actividad antimicrobiana. Estos resultados indican que la encapsulación de las ZnONPs fue un proceso apropiado que permitió obtener nanocompuestos con un efecto inhibitorio en el crecimiento de SARM empleando tres tipos de polímeros biodegradables diferentes a concentraciones más bajas que las encontradas en la literatura [183]. No obstante, está claro que la actividad antimicrobiana intrínseca de las AgNPs es superior a la del ZnONPs y se ve reflejada también en la actividad de los nanocompuestos con plata, la cual es mayor que la alcanzada por los nanocompuestos de ZnONPs.

**Tabla 12** Porcentajes de inhibición del crecimiento de SARM en presencia de nanopartículas de ZnONPs libre y encapsulada a diferentes concentraciones.

Tipo de Nanocompuesto	% Inhibición en el crecimiento de SARM			CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMI <sub>90</sub> (µg/mL)
	Concentración (µg/mL)				
	5.0	1.0	0.1		
ZnONPs	70%	35%	20%	2.5	10
PLGA@ZnO	99%	60%	30%	0.5	3
PLA@ZnO	99%	65%	32%	0.5	3
QTS@ZnO	40%	20%	10%	> 5	> 5

**Fuente:** Autor.

Es importante resaltar que se realizaron los respectivos controles con los nanocompuestos vacíos (en ausencia de nanopartículas metálicas), con el polímero libre, con el agente estabilizante y con el agente catiónico. Los resultados obtenidos evidenciaron que a las concentraciones evaluadas, el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano no es superior al 20%.

#### 4.5.2 Determinación de CMI y CMF frente a *Candida albicans*

La tabla 13 muestra los resultados de actividad antifúngica de las nanopartículas libres y encapsuladas en PLGA, PLA y Quitosano, respectivamente. Se observa claramente que las concentraciones requeridas para apreciar un efecto fungicida en el crecimiento de *C. albicans* disminuye en un margen de hasta diez veces por debajo de las concentraciones necesarias de las nanopartículas libres. Este resultado es similar al evidenciado en el aumento de la actividad antibacteriana de los mismos

nanocompuestos frente a SARM. Por tanto, es posible que este resultado también sea consecuencia de un efecto sinérgico entre las nanopartículas de plata, el agente catiónico utilizado y los polímeros empleados.

**Tabla 13** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) y concentración mínima fungicida (CMF) de las nanopartículas libres y encapsuladas frente a *Candida albicans*.

Tipo de Nanocompuesto	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMF (µg/mL)
AgNPs	< 0.1	0.2
PLGA@Ag	0.05	0.05
PLA@Ag	0.05	0.05
QTS@Ag	0.01	0.05
ZnONPs	< 0.5	1
PLGA@ZnO	0.01	0.5
PLA@ZnO	0.01	0.5
QTS@ZnO	0.5	>0.5

**Fuente:** Autor.

Por otra parte, las CMI<sub>50</sub> presentaron un comportamiento más variado, pues para las AgNPs encapsuladas en PLGA y PLA, el valor se mantuvo constante pero cuando se encapsuló ZnONPs en estos mismos polímeros, la CMI<sub>50</sub> disminuyó diez veces frente a la misma cepa. Cabe resaltar que los valores encontrados de CMI y CMF frente a la cepa *C. albicans* de los nanoencapsulados son muy bajos comparables con lo publicado previamente por otros autores [131], [159], [184].

#### 4.6 CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS Y NANOENCAPSULADOS FRENTE A CÉLULAS MAMÍFERAS

Las tablas 14 y 15 muestran los resultados obtenidos de citotoxicidad para las nanopartículas libres y encapsuladas frente a células de fibroblasto murino. Se puede observar que para las AgNPs una concentración de 9.57 µg/mL exhibe un efecto citotóxico del 50% en la línea celular evaluada. Se ha considerado que las

nanopartículas metálicas, en especial las AgNPs inducen la toxicidad en células eucariotas predominantemente a través de estrés oxidativo por la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) [185]. Algunos estudios sugieren que los iones de plata son más citotóxicos que las AgNPs y que el posible efecto citotóxico de las mismas puede estar relacionado con la liberación de iones de plata desde las nanopartículas [110]. Sin embargo, al estar encapsuladas en nanopartículas poliméricas como el PLGA y el PLA, el porcentaje de citotoxicidad decrece. Se puede apreciar que a una concentración de 1.1 µg/mL de AgNPs libre se induce un efecto citotóxico de 6.28% mientras que al estar formando nanocompuestos con PLGA y PLA el efecto disminuye a 1.24% y 1.77%, respectivamente. Se ha evidenciado que al aplicar muy pequeñas dosis *in-vitro* de AgNPs en fibroblastos se pueden proteger las células contra el estrés oxidativo caracterizado por decrecimiento en la peroxidación lipídica y el incremento en la producción de enzimas potencialmente antioxidantes como la glutatión transferasa [186].

Estos resultados son similares a los publicados previamente, donde muestran que el potencial efecto tóxico de las AgNPs puede disminuirse empleando la encapsulación con matrices poliméricas como el PLGA, que adicionalmente incrementan su biocompatibilidad [110].

**Tabla 14** Porcentaje de citotoxicidad sobre células de fibroblasto murino a diferentes concentraciones de nanopartículas libres.

Tipo de Nanocompuesto	% Citotoxicidad				CC <sub>50</sub> (µg/mL)	CC <sub>90</sub> (µg/mL)
	Concentración (µg/mL)					
	1.1	3.3	10	30		
AgNPs	6.28 ± 2.7	8.37 ± 1.5	75.81 ± 1.1	83.94 ± 3.3	9.57 ± 0.06	> 30
ZnONPs	22.81 ± 3.2	38.09 ± 3.1	64.30 ± 0.6	88.12 ± 0.1	4.75 ± 0.58	> 1

Fuente: Autor.

Por otra parte, la concentración citotóxica al 50% (CC<sub>50</sub>) determinada ZnONPs fue de 4.75%, que al igual que para AgNPs, se encuentra asociado a la producción espontánea de EROs basada en su naturaleza de óxido metálica y las características superficiales de las nanopartículas [187], [188]. Cuando las células se encuentran expuestas a elevados niveles de EROs que exceden su capacidad celular de defensa antioxidante, ésta entra en un estado de estrés oxidativo que resulta en el daño de componentes celulares como lípidos, proteínas y ADN [188]. No obstante, al encapsular las ZnONPs en matrices de PLGA y PLA se observó que desde concentraciones iguales o superiores a 1.1 µg/mL el efecto citotóxico era considerablemente mayor con valores de 77.73% y 30.42%, respectivamente.

Adicionalmente se realizaron los respectivos controles con los nanocompuestos vacíos (en ausencia de nanopartículas metálicas), con el polímero libre, con el agente estabilizante y con el agente catiónico. Los resultados obtenidos evidenciaron que a las concentraciones evaluadas, no se produce un efecto citotóxico superior al 10.86%.

**Tabla 15** Porcentaje de citotoxicidad sobre células de fibroblasto murino a diferentes concentraciones de nanopartículas encapsuladas.

Tipo de Nanocompuesto	% Citotoxicidad				CC <sub>50</sub> (µg/mL)	CC <sub>90</sub> (µg/mL)
	Concentración (µg/mL)					
	0.037	0.11	0.33	1.1		
PLGA@Ag	0.39 ± 1.9	0.64 ± 0.59	3.19 ± 2.0	1.24 ± 4.6	> 1	> 1
PLA@Ag	0.21 ± 2.4	0.32 ± 0.58	0.38 ± 4.1	1.77 ± 2.7	> 1	> 1
PLGA@ZnO	0.04 ± 4.4	5.1 ± 3.0	40.7 ± 1.3	77.73 ± 0.38	0.44 ± 0.1	> 1
PLA@ZnO	2.2 ± 0.7	6.7 ± 4.4	6.7 ± 2.2	30.42 ± 1.4	> 1	> 1

**Fuente:** Autor.

Al relacionar la actividad antimicrobiana con el efecto citotóxico de los nanocompuestos sintetizados, se puede observar que la concentración mínima inhibitoria al 50% (CMI<sub>50</sub>) no produce un efecto adverso en el crecimiento de los fibroblastos. Para el caso de los nanocompuestos de plata, PLGA@Ag y PLA@Ag la CMI<sub>50</sub> fue de 0.10 y < 0.05 µg/mL con un porcentaje de citotoxicidad de 0.64% y 0.21% respectivamente. Este resultado que indica que la concentración necesaria para inducir un efecto inhibitorio en el crecimiento del microorganismo no produce una disminución significativa en la viabilidad de células de fibroblasto murino. Estos resultados confirman la hipótesis de esta investigación, que planteaba que la toxicidad asociada a las nanopartículas metálicas libres, se ve disminuida gracias a la acción de los agentes protectores y del polímero encapsulante, haciendo que el nanocompuesto sea mucho más biocompatible y menos tóxico.

De igual manera se puede apreciar en la tabla 12 que los nanocompuestos de óxido de zinc PLGA@ZnO y PLA@ZnO presentaron una CMI<sub>50</sub> de 0.5 y 0.5 µg/mL con un porcentaje de citotoxicidad de 40.7% y 6.7% respectivamente. A pesar de que la citotoxicidad presentada para los compuestos con ZnO fue mayor, los resultados indican que los nanocompuestos no afectan más de 40% de la viabilidad de los fibroblastos y por tanto, pueden considerarse como sistemas que podrían resultar efectivos para el control de infecciones ocasionadas por SARM sin ser potencialmente citotóxicos.

#### **4.7 PERFIL DE LIBERACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO DE LOS NANOENCAPSULADOS**

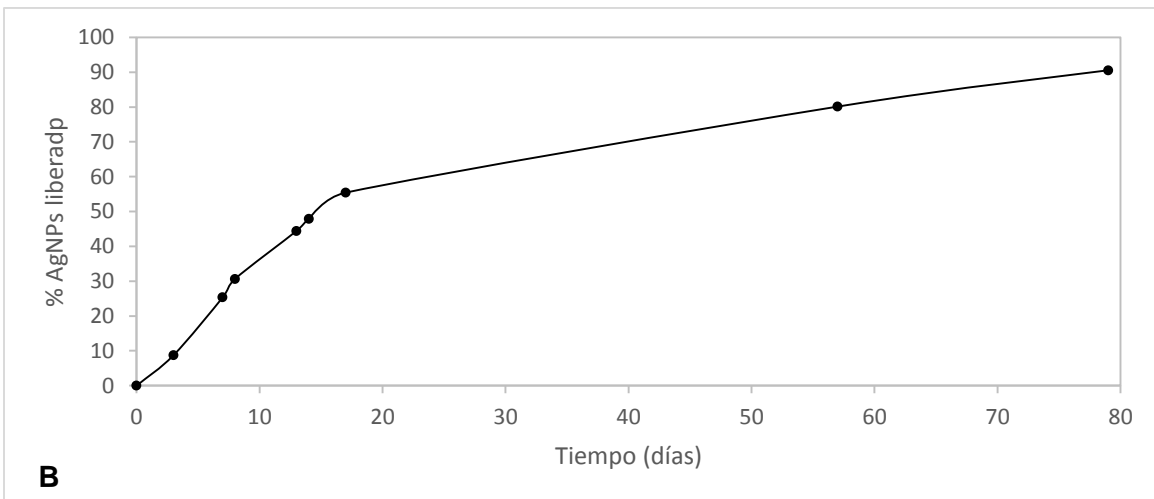
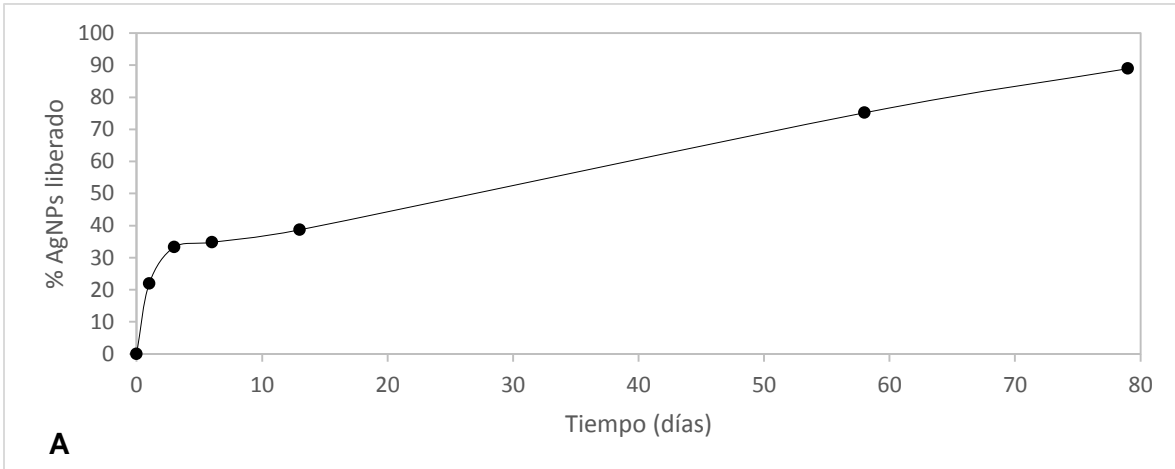
El mecanismo de liberación de principios activos generalmente consta de tres etapas a saber. En la primera etapa se produce la liberación inicial del principio activo enlazado a la superficie o embebido en la región superficial del sistema de transporte empleado (frente de hinchamiento también conocido como “burst”). En la segunda etapa se da la liberación difusional del principio activo a través de la matriz del polímero y a través de los poros durante la degradación de la matriz

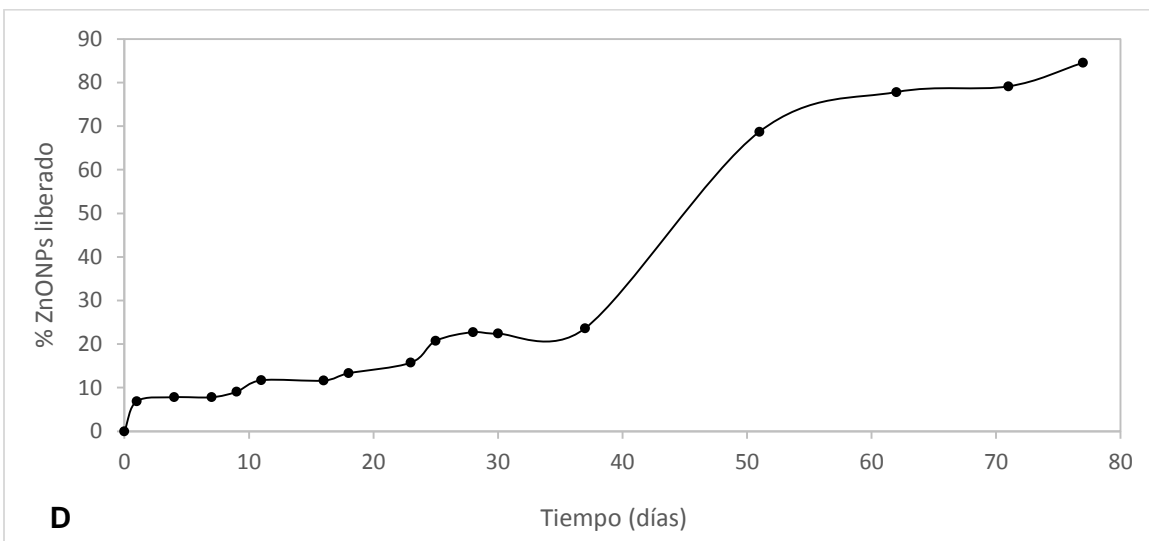
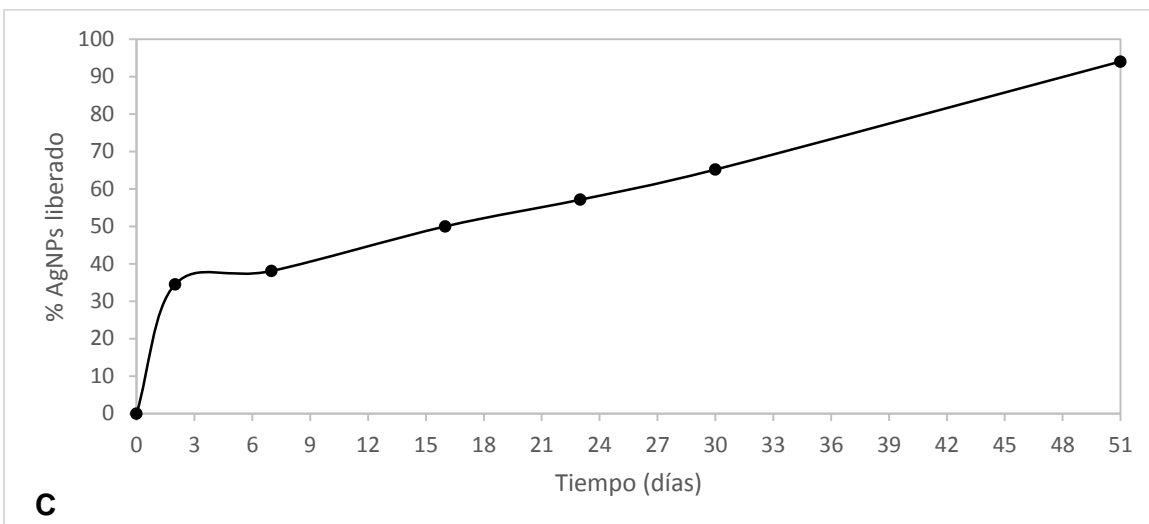
(frente difusional). Por último, en la tercera etapa se presenta la liberación erosional del principio activo por la desintegración de la matriz del polímero (frente de erosión) [189].

Dependiendo de la distribución del agente activo, el perfil de liberación constará de dos o tres de las etapas descritas anteriormente. Si el agente activo está heterogéneamente distribuido en la matriz del polímero, la curva de liberación puede poseer un modelo trifásico. Si por el contrario, el agente activo está homogéneamente distribuido en la matriz del polímero la curva de liberación puede poseer un modelo bifásico, es decir, la primera fase no ocurre porque no existe principio activo enlazado a la superficie de la matriz [190].

En este experimento, los nanocompuestos fueron colocadas en pequeñas bolsas de diálisis bajo condiciones de agitación con un medio exterior de PBS a 7.4 . Teniendo en cuenta que los nanocompuestos no pueden permear las bolsas de diálisis, el principio activo es liberado al medio acuoso exterior para posteriormente ser cuantificado, como lo ha reportado previamente otros autores [108]. Las bolsas de diálisis se realizaron con una membrana de permite monitorear la difusión del principio activo de un medio a otro evitando el paso de proteínas o moléculas de peso molecular igual o superior a 12 KDa.

**Figura 29** Perfil de liberación de las nanopartículas metálicas bajo las mismas condiciones de incubación a 37°C, pH 7.4 y 100 rpm de agitación **A)** Liberación de AgNPs desde nanocompuesto de PLGA@Ag **B)** Liberación de AgNPs desde nanocompuesto de PLA@Ag **C)** Liberación de AgNPs desde nanocompuesto de QTS@Ag **D)** Liberación de ZnONPs desde nanocompuesto de QTS@ZnO.





**Fuente:** Autor.

La figura 29 A, B, C y D muestran que en los primeros días se presentó una liberación de AgNPs a una velocidad mayor. Este fenómeno puede estar relacionado con la primera etapa de liberación conocida como “burst”, donde las AgNPs que se encuentren adheridas superficialmente serán las primeras en liberarse del sistema. Adicionalmente, si los nanocompuestos presentan poros en su superficie se presentará una liberación del principio activo más rápida en la primera etapa. Se ha establecido que las nanopartículas obtenidas a alta velocidad de agitación (como es el caso de la segunda emulsión,) la liberación por “burst” es más importante debido

a que la estructura de cápsula rota puede ser predominante en la totalidad de la muestra [86].

Es importante mencionar que, a diferencia de los principios activos orgánicos encapsulados el PLGA, la liberación de AgNPs desde los nanocompuestos de PLGA fue más lenta. Se puede apreciar en la figura 29 A, que tras 79 días se alcanzó la liberación del 88% de AgNPs desde los nanocompuestos. Este hecho puede atribuirse a la limitada solubilidad de las nanopartículas en buffer 7.4 La mayoría de agentes activos son moléculas orgánicas, que presentan algún grado de solubilidad en el medio de liberación, a diferencia de las nanopartículas inorgánicas. La solubilidad de las moléculas orgánicas cambia el perfil de liberación desde la rápida liberación inicial hasta la liberación producida por la erosión del polímero [191]. Sin embargo, en el caso de la liberación de nanopartículas inorgánicas, ésta inicialmente depende de la degradación característica del PLGA y de la erosión superficial de los nanocompuestos [192]. La degradación de nanocompuestos de PLGA ocurre debido a la hidrólisis que conlleva al decrecimiento del peso molecular y generando los correspondientes monómeros (del tipo de grupos ácidos carboxílicos) que continúan catalizando la hidrólisis y en consecuencia, disminuyendo el pH del microambiente que los rodea [193], [194].

De igual manera, a liberación del principio activo desde las nanopartículas de PLA puede ocurrir por difusión a través de la partícula, por desorción desde la superficie de la nanopartícula o después de la degradación del polímero y en tiempos muy prolongados como se observa en la figura 29 B [60]. Adicionalmente la liberación del principio activo depende del microambiente tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*, pues la naturaleza hidrofílica, el pH y la fuerza iónica juegan un papel importante.

Por otra parte, la figura 29 C y D muestra el perfil de liberación de AgNPs y ZnONPs respectivamente, desde los nanocompuestos sintetizados con quitosano. Se puede apreciar que aunque la liberación fue sostenida en función del tiempo, se alcanzó un

porcentaje de 94% de AgNPs durante los primeros 51 días, menor tiempo en comparación con el requerido para los nanocompuestos de PLGA. Así pues, se demuestra que los dispositivos de liberación basados en quitosano pueden prolongar la duración de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas metálicas, mejorando su eficiencia y reduciendo los efectos secundarios bajo condiciones deseadas. Mientras que la liberación de ZnONPs presentó un comportamiento similar al observado para PLGA, pues en 79 días alcanzó a liberarse más el 80%. El uso de quitosano es una alternativa de gran interés, ya que es un polímero natural biodegradable, que también promueve la bioadhesividad en las mucosas del cuerpo [190]. Por lo tanto, una aplicación importante del quitosano es el desarrollo de sistemas de liberación, tales como las nanopartículas usadas como vehículos para la liberación controlada de agentes activos.

## 5 CONCLUSIONES

- ❖ Se sintetizaron AgNPs mediante una ruta de síntesis verde empleando azúcares (glucosa y maltosa) como agentes reductores y gelatina como agente estabilizante. Las AgNPs presentaron tamaño promedio de 10nm, carga superficial alrededor de +25 mV y estabilidad en sus propiedades físicas superior a seis meses.
- ❖ La actividad antifúngica de las AgNPs y las ZnONPs frente a *C. albicans* fue mayor que la actividad antibacteriana frente a SARM. Las concentraciones mínimas inhibitorias alcanzadas frente a *C. albicans* fueron de < 0.1µg/mL y < 0.5µg/mL para AgNPs y ZnONPs, respectivamente siendo valores menores a los publicados en la literatura.
- ❖ Se obtuvieron nanocompuestos de AgNPs y ZnONPs empleando PLGA, PLA y Quitosano como agentes encapsulantes con tamaños promedio alrededor de 250 nm con índices de polidispersión menor a 0.40, carga superficial positiva y con una morfología esférica altamente homogéneas. Las PLGA@Ag y PLA@Ag presentaron el menor tamaño promedio con 154nm y 162nm, respectivamente.
- ❖ La encapsulación de nanopartículas metálicas empleando la metodología de doble emulsión ( $W_1/O/W_2$ ) en matrices de polímeros hidrofóbicos tipo éster se logró alcanzando porcentajes de encapsulación superiores a 20% bajo las condiciones de síntesis y purificación estandarizadas en el presente trabajo.
- ❖ Los nanocompuestos QTS@Ag y QTS@ZnO obtenidos mediante gelificación ionotrópica fueron analizados mediante espectroscopia de infrarrojo,

evidenciando que existe una fuerte interacción entre las nanopartículas metálicas y la matriz de quitosano que provoca desplazamientos en las principales bandas de absorción del polímero.

- ❖ Las nanopartículas de plata encapsuladas en matrices de PLA, que presentaron el menor tamaño promedio con 154 nm y carga superficial de +16.70 mV, fueron las que exhibieron mayor actividad antimicrobiana frente a SARM, alcanzando valores de  $CMI_{50} < 0.05 \mu\text{g/mL}$  y el mayor porcentaje de encapsulación de 25.43%, valores mayores a los encontrados en la literatura.
  
- ❖ La actividad antimicrobiana de las AgNPs tanto libres como encapsuladas fue superior a la determinada para las ZnONPs libres y encapsuladas frente a ambas cepas de estudio, como se evidenció en los menores valores de  $CMI_{50}$  expuestos en el presente trabajo.
  
- ❖ Las nanopartículas libres de Ag y ZnO presentaron citotoxicidad significativa en células de fibroblastos murino de 60% desde concentraciones de 10  $\mu\text{g/mL}$  mientras que al encapsularlas en matrices poliméricas no hubo citotoxicidad apreciable ( $< 1\%$ ) en las concentraciones evaluadas.

## 6 RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar el porcentaje de citotoxicidad de los nanocompuestos encapsulados y de las nanopartículas metálicas libres sobre otras líneas celulares relacionadas con la aplicación deseada como células epiteliales así como también sobre líneas celulares cancerígenas como las células HeLa.
  
- ✓ Optimizar las condiciones de purificación de los nanocompuestos de nanopartículas metálicas obtenidos de manera que permitan la conservación de los sistemas en sólido para evitar su pronta degradación en función del tiempo en medio acuoso.
  
- ✓ Realizar el perfil de liberación de los nanocompuestos de AgNPs y ZnONPs bajo diferentes condiciones de pH con el fin de evaluar la influencia sobre la velocidad de liberación así como implementar una buffer más similar al fluido sanguíneo humano.
  
- ✓ Realizar un estudio proteómico con técnicas como electroforesis en dos dimensiones que permita identificar las proteínas de membrana implicadas en la actividad antibacteriana y antifúngica de las nanopartículas metálicas libres y encapsuladas en cada uno de los polímeros utilizados.
  
- ✓ Determinar las propiedades antimicrobianas de los nanocompuestos encapsulados así como de las nanopartículas metálicas libres bajo condiciones experimentales *in-vivo* mediante el uso de modelos animales.

## BIBLIOGRAFIJA

- [1] J. H. Xin, W. a. Daoud, and Y. Y. Kong, "A New Approach to UV-Blocking Treatment for Cotton Fabrics," *Text. Res. J.*, vol. 74, no. 2, pp. 97–100, Feb. 2004.
- [2] P. Dibrov, J. Dzioba, K. K. Gosink, and C. C. Ha, "Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag<sub>2</sub> in *Vibrio cholerae*," vol. 46, no. 8, pp. 2668–2670, 2002.
- [3] V. K. Sharma, R. a Yngard, and Y. Lin, "Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities.," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 145, no. 1–2, pp. 83–96, Jan. 2009.
- [4] H.-L. Liu, S. a Dai, K.-Y. Fu, and S.-H. Hsu, "Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 5, pp. 1017–28, Jan. 2010.
- [5] Y. a Krutyakov, a a Kudrinskiy, a Y. Olenin, and G. V Lisichkin, "Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects," *Russ. Chem. Rev.*, vol. 77, no. 3, pp. 233–257, Mar. 2008.
- [6] G. R. and S. D.V.L., "Characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthema decandra* L.," *Ind. Crops Prod.*, vol. 51, pp. 107–115, Nov. 2013.
- [7] I. Aiad, M. M. El-Sukkary, E. a. Soliman, M. Y. El-Awady, and S. M. Shaban, "In situ and green synthesis of silver nanoparticles and their biological activity," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 20, no. 5, pp. 3430–3439, Sep. 2014.
- [8] M. M. Stevanović, S. D. Škapin, I. Bračko, M. Milenković, J. Petković, M. Filipič, and D. P. Uskoković, "Poly(lactide-co-glycolide)/silver nanoparticles: Synthesis, characterization, antimicrobial activity, cytotoxicity assessment and ROS-inducing potential," *Polymer (Guildf)*, vol. 53, no. 14, pp. 2818–2828, Jun. 2012.
- [9] R. Wahab, A. Mishra, S.-I. Yun, Y.-S. Kim, and H.-S. Shin, "Antibacterial activity of ZnO nanoparticles prepared via non-hydrolytic solution route.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 87, no. 5, pp. 1917–25, Aug. 2010.
- [10] M. Premanathan, K. Karthikeyan, K. Jeyasubramanian, and G. Manivannan, "Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and

- cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation.," *Nanomedicine*, vol. 7, no. 2, pp. 184–92, May 2011.
- [11] Y. S. Lee, D. W. Kim, Y. H. Lee, J. H. Oh, S. Yoon, M. S. Choi, S. K. Lee, J. W. Kim, K. Lee, and C.-W. Song, "Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKC $\zeta$ -dependent signaling in A549 lung cells.," *Arch. Toxicol.*, vol. 85, no. 12, pp. 1529–40, Dec. 2011.
- [12] I. Cient and M. Polim, "No Title," 1900.
- [13] W.-T. Liu, "Nanoparticles and their biological and environmental applications.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 102, no. 1, pp. 1–7, Jul. 2006.
- [14] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 1, pp. 76–83, 2009.
- [15] G. Bystrzeewska-Piotrowska, J. Golimowski, and P. L. Urban, "Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management.," *Waste Manag.*, vol. 29, no. 9, pp. 2587–95, Sep. 2009.
- [16] M. Ferrari, "CANCER NANOTECHNOLOGY :," vol. 5, no. March, 2005.
- [17] C. Buzea, I. I. P. Blandino, and K. Robbie, "Nanomaterials and nanoparticles : Sources and toxicity," vol. 2, no. 4, pp. 1–103, 2007.
- [18] M. Ohde, H. Ohde, and C. M. Wai, "Recycling Nanoparticles Stabilized in Water-in-CO<sub>2</sub> Microemulsions for Catalytic Hydrogenations," *La*, no. 27, pp. 1738–1744, 2005.
- [19] J. J. Mock, M. Barbic, D. R. Smith, D. a. Schultz, and S. Schultz, "Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles," *J. Chem. Phys.*, vol. 116, no. 15, p. 6755, 2002.
- [20] W.-R. Li, X.-B. Xie, Q.-S. Shi, H.-Y. Zeng, Y.-S. Ou-Yang, and Y.-B. Chen, "Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 85, no. 4, pp. 1115–22, Jan. 2010.
- [21] X. Chen and H. J. Schluesener, "Nanosilver: a nanoparticle in medical application.," *Toxicol. Lett.*, vol. 176, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2008.
- [22] J. Bai, Y. Li, J. Du, S. Wang, J. Zheng, Q. Yang, and X. Chen, "One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 106, no. 2–3, pp. 412–415, Dec. 2007.
- [23] F. Martínez-Gutierrez, E. P. Thi, J. M. Silverman, C. C. de Oliveira, S. L. Svensson, A. Vanden Hoek, E. M. Sánchez, N. E. Reiner, E. C. Gaynor, E. L.

- G. Pryzdial, E. M. Conway, E. Orrantia, F. Ruiz, Y. Av-Gay, and H. Bach, "Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles.," *Nanomedicine*, vol. 8, no. 3, pp. 328–36, Apr. 2012.
- [24] A. Tao, P. Sinsermsuksakul, and P. Yang, "Polyhedral silver nanocrystals with distinct scattering signatures.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 45, no. 28, pp. 4597–601, Jul. 2006.
- [25] C. Lee and D. Meisel, "Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols'," vol. 60439, no. 50 mL, pp. 3391–3395, 1982.
- [26] I. Sondi, D. V Goia, and E. Matijević, "Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 260, no. 1, pp. 75–81, Apr. 2003.
- [27] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, and M. a El-Sayed, *Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes.*, vol. 105, no. 4. 2005, pp. 1025–102.
- [28] B. L. Cushing, V. L. Kolesnichenko, and C. J. O'Connor, "Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles.," *Chem. Rev.*, vol. 104, no. 9, pp. 3893–946, Sep. 2004.
- [29] L. M. Liz-marz, "Nanometals :," no. February, pp. 26–31, 2004.
- [30] M. Maillard, P. Huang, and L. Brus, "Silver Nanodisk Growth by Surface Plasmon Enhanced Photoreduction of Adsorbed [Ag + ]," *Nano Lett.*, vol. 3, no. 11, pp. 1611–1615, Nov. 2003.
- [31] K. M. M. Abou El-Nour, A. Eftaiha, A. Al-Warthan, and R. a. a. Ammar, "Synthesis and applications of silver nanoparticles," *Arab. J. Chem.*, vol. 3, no. 3, pp. 135–140, Jul. 2010.
- [32] Y. a Krutyakov, a a Kudrinskiy, a Y. Olenin, and G. V Lisichkin, "Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects," *Russ. Chem. Rev.*, vol. 77, no. 3, pp. 233–257, Mar. 2008.
- [33] V. V Dandekar, H. E. Cramer, E. N. Lee, M. H. Griep, and S. P. Karna, "Chemical vs . Sonochemical Synthesis and Characterization of Silver , Gold , and Hybrid Nanoparticles," 2011.
- [34] K. Chaloupka, Y. Malam, and A. M. Seifalian, "Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications.," *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 11, pp. 580–8, Nov. 2010.

- [35] N. M. Huang, H. N. Lim, S. Radiman, P. S. Khiew, W. S. Chiu, R. Hashim, and C. H. Chia, "Sucrose ester micellar-mediated synthesis of Ag nanoparticles and the antibacterial properties," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 353, no. 1, pp. 69–76, Jan. 2010.
- [36] G. Von White, P. Kerscher, R. M. Brown, J. D. Morella, W. McAllister, D. Dean, and C. L. Kitchens, "Green Synthesis of Robust, Biocompatible Silver Nanoparticles Using Garlic Extract," *J. Nanomater.*, vol. 2012, pp. 1–12, 2012.
- [37] E. Filippo, A. Serra, A. Buccolieri, and D. Manno, "Green synthesis of silver nanoparticles with sucrose and maltose: Morphological and structural characterization," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 356, no. 6–8, pp. 344–350, Mar. 2010.
- [38] M. Darroudi, M. Bin Ahmad, A. H. Abdullah, and N. A. Ibrahim, "Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 569–74, Jan. 2011.
- [39] N. N. Mallikarjuna and R. S. Varma, "Microwave-Assisted Shape-Controlled Bulk Synthesis of Noble 2007," 2007.
- [40] C. He, T. Sasaki, H. Usui, Y. Shimizu, and N. Koshizaki, "Fabrication of ZnO nanoparticles by pulsed laser ablation in aqueous media and pH-dependent particle size: An approach to study the mechanism of enhanced green photoluminescence," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 191, no. 1, pp. 66–73, Sep. 2007.
- [41] C. Ruiqun, "Synthesis of Zinc oxide nanostructures by wet oxidation process," University of Auckland, 2011.
- [42] P. Chandrasekaran, G. Viruthagiri, and N. Srinivasan, "The effect of various capping agents on the surface modifications of sol–gel synthesised ZnO nanoparticles," *J. Alloys Compd.*, vol. 540, pp. 89–93, Nov. 2012.
- [43] F. Rataboul, "Synthesis and characterization of monodisperse zinc and zinc oxide nanoparticles from the organometallic precursor [ Zn ( C 6 H 11 ) 2 ]," vol. 644, pp. 307–312, 2002.
- [44] H. O. W. Maw, "Infrared spectroscopy of Zinc oxide and Magnesium nanostructures," Washing State University, 2007.
- [45] A. Dakhlaoui, M. Jendoubi, L. S. Smiri, A. Kanaev, and N. Jouini, "Synthesis, characterization and optical properties of ZnO nanoparticles with controlled size and morphology," *J. Cryst. Growth*, vol. 311, no. 16, pp. 3989–3996, Aug. 2009.

- [46] A. Panacek, L. Kvítek, R. Pucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizúrova, V. K. Sharma, T. Nevecna, and R. Zboril, "Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 33, pp. 16248–53, Aug. 2006.
- [47] O. Yamamoto, "Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide," vol. 3, no. April 2000, pp. 643–646, 2001.
- [48] A. R. Shahverdi, A. Fakhimi, H. R. Shahverdi, and S. Minaian, "Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*," *Nanomedicine*, vol. 3, no. 2, pp. 168–71, Jun. 2007.
- [49] R. Brayner, R. Ferrari-Iliou, N. Brivois, S. Djediat, M. F. Benedetti, and F. Fiévet, "Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium.," *Nano Lett.*, vol. 6, no. 4, pp. 866–70, Apr. 2006.
- [50] a. S. Reddy, C.-Y. Chen, S. C. Baker, C.-C. Chen, J.-S. Jean, C.-W. Fan, H.-R. Chen, and J.-C. Wang, "Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: A biosurfactant as stabilizing agent," *Mater. Lett.*, vol. 63, no. 15, pp. 1227–1230, Jun. 2009.
- [51] N. Jones, B. Ray, K. T. Ranjit, and A. C. Manna, "Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms.," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 279, no. 1, pp. 71–6, Mar. 2008.
- [52] I. Sondi and B. Salopek-Sondi, "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 275, no. 1, pp. 177–82, Jul. 2004.
- [53] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramírez, and M. J. Yacaman, "The bactericidal effect of silver nanoparticles.," *Nanotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 2346–53, Oct. 2005.
- [54] O. Choi, K. K. Deng, N.-J. Kim, L. Ross, R. Y. Surampalli, and Z. Hu, "The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth.," *Water Res.*, vol. 42, no. 12, pp. 3066–74, Jun. 2008.
- [55] N. V. Ayala-Núñez, H. H. Lara Villegas, L. Carmen Ixtepan Turrent, and C. Rodríguez Padilla, "Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale Does Matter," *NanoBiotechnology*, vol. 5, no. 1–4, pp. 2–9, Sep. 2009.
- [56] S. K. Rastogi, V. J. Rutledge, C. Gibson, D. a Newcombe, J. R. Branen, and a L. Branen, "Ag colloids and Ag clusters over EDAPTMS-coated silica

- nanoparticles: synthesis, characterization, and antibacterial activity against *Escherichia coli*,” *Nanomedicine*, vol. 7, no. 3, pp. 305–14, Jun. 2011.
- [57] M. Moritz and M. Geszke-moritz, “The newest achievements in synthesis , immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles,” vol. 228, pp. 596–613, 2013.
- [58] C. Pinto Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, and F. Veiga, “Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles.,” *Nanomedicine*, vol. 2, no. 1, pp. 8–21, Mar. 2006.
- [59] J. Wu, T. Kong, K. W. K. Yeung, H. C. Shum, K. M. C. Cheung, L. Wang, and M. K. T. To, “Fabrication and characterization of monodisperse PLGA-alginate core-shell microspheres with monodisperse size and homogeneous shells for controlled drug release.,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 7, pp. 7410–9, Jul. 2013.
- [60] S. Hirsjärvi, *Preparation and Characterization of Poly ( Lactic Acid ) Nanoparticles*. 2008.
- [61] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, “Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, Jan. 2010.
- [62] T. G. Park, “controlled release Degradation of poly ( o , L-lactic acid ) microspheres : effect of molecular weight,” vol. 30, pp. 161–173, 1994.
- [63] A. Belbella, C. Vauthier, H. Fessi, and J. Devissaguet, “journal of In vitro degradation of nanospheres from poly ( D , L-lactides ) of different molecular weights and polydispersities,” vol. 5133, no. 95, pp. 0–7, 1996.
- [64] K. Makino, M. Arakawa, and T. Kondo, “Preparation and in vitro degradation properties of polylactide microcapsules,” *Chem. Pharm. Bull.*, 1985.
- [65] S. Kamei, Y. Inoue, H. Okada, Y. Ogawa, and H. Toguchi, “New method for analysis of biodegradable polyesters by high- pe ~ o ~ ance liquid chromatography after alkali hydrolysis,” vol. 13, no. 13, 1992.
- [66] G. Spenlehauer, M. Vert, J. P. Benoit, and A. Boddaert, “poly ( D , L lactide / glycolide ) type microspheres made by solvent evaporation method,” vol. 10, pp. 557–563, 1989.
- [67] R. Rorer, I. De Biopharmacie, R. Aron, and A. Cedex, “Fate of C radiolabeled poly ( DL-lactic acid ) nanoparticles following oral administration to rats ”, vol. 1, pp. 233–239, 1993.

- [68] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, and V. Pr at, "PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications.," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 505–22, Jul. 2012.
- [69] H. K. Makadia and S. J. Siegel, "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier.," *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 3, pp. 1377–1397, Sep. 2011.
- [70] M. L. Houchin and E. M. Topp, "Physical Properties of PLGA Films During Polymer Degradation," vol. 114, pp. 2848–2854, 2009.
- [71] K. Okuyama, K. Noguchi, M. Kanenari, T. Egawa, K. Osawa, and K. Ogawa, "Structural diversity of chitosan and its complexes," vol. 41, pp. 237–247, 2000.
- [72] I. Aranaz, M. Meng bar, R. Harris, I. Pa os, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, and  . Heras, "Functional Characterization of Chitin and Chitosan," pp. 203–230, 2009.
- [73] L. Illium, "Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient," *Pharm. Res.*, 1998.
- [74] X. Z. Shu and K. J. Zhu, "A novel approach to prepare tripolyphosphate / chitosan complex beads for controlled release drug delivery," vol. 201, pp. 51–58, 2000.
- [75] R. Harris, "Universidad Complutense de Madrid," 2010.
- [76] M. Bivas-Benita, S. Romeijn, H. E. Junginger, and G. Borchard, "PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 58, no. 1, pp. 1–6, Jul. 2004.
- [77] B. N. Fredriksen and J. Grip, "PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).," *Vaccine*, vol. 30, no. 3, pp. 656–67, Jan. 2012.
- [78] K. Van Butsele, M. Morille, C. Passirani, P. Legras, J. P. Benoit, S. K. Varshney, R. Jérôme, and C. Jérôme, "Stealth properties of poly(ethylene oxide)-based triblock copolymer micelles: a prerequisite for a pH-triggered targeting system.," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 10, pp. 3700–7, Oct. 2011.
- [79] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, "Poly- -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review.," *J. Control. Release*, vol. 158, no. 1, pp. 15–33, Feb. 2012.

- [80] M. Rajan and V. Raj, "Formation and characterization of chitosan-poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-gelatin nanoparticles: a novel biosystem for controlled drug delivery.," *Carbohydr. Polym.*, vol. 98, no. 1, pp. 951–8, Oct. 2013.
- [81] F. Rancan, D. Papakostas, S. Hadam, S. Hackbarth, T. Delair, C. Primard, B. Verrier, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, and A. Vogt, "Investigation of poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles as drug delivery systems for local dermatotherapy.," *Pharm. Res.*, vol. 26, no. 8, pp. 2027–36, Aug. 2009.
- [82] C. Engineering, "Preparation of PLA and PLGA nanoparticles by binary organic solvent diffusion method," vol. 10, no. 3, pp. 202–206, 2003.
- [83] T. Ishihara, M. Takahashi, M. Higaki, and Y. Mizushima, "Efficient encapsulation of a water-soluble corticosteroid in biodegradable nanoparticles.," *Int. J. Pharm.*, vol. 365, no. 1–2, pp. 200–5, Jan. 2009.
- [84] C. Rouzes, M. Leonard, a Durand, and E. Dellacherie, "Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 32, no. 2, pp. 125–135, Oct. 2003.
- [85] C. E. Mora-Huertas, H. Fessi, and a Elaissari, "Polymer-based nanocapsules for drug delivery.," *Int. J. Pharm.*, vol. 385, no. 1–2, pp. 113–42, Jan. 2010.
- [86] I. D. Rosca, F. Watari, and M. Uo, "Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation.," *J. Control. Release*, vol. 99, no. 2, pp. 271–80, Sep. 2004.
- [87] N. Ahmed, M. Michelin-Jamois, H. Fessi, and A. Elaissari, "Modified double emulsion process as a new route to prepare submicron biodegradable magnetic/polylactide particles for in vivo theranostics," *Soft Matter*, vol. 8, no. 8, p. 2554, 2012.
- [88] M. L. Hans and A. M. Lowman, "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting," vol. 6, no. September, pp. 319–327, 2002.
- [89] M. C. Venier-Julienne and J. P. Benoît, "Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers.," *Pharm. Acta Helv.*, vol. 71, no. 2, pp. 121–8, Jul. 1996.
- [90] S. Galindo-rodriguez, E. Alle, H. Fessi, and E. Doelker, "Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out , Nanoprecipitation Methods," vol. 21, no. 8, pp. 1428–1439, 2004.
- [91] F. R. Formiga and E. Ansorena, "2. Nanosistemas a base de poliésteres," pp. 41–101.

- [92] A. Rampino, M. Borgogna, P. Blasi, B. Bellich, and A. Cesàro, "Chitosan nanoparticles : Preparation , size evolution and stability," *Int. J. Pharm.*, vol. 455, no. 1–2, pp. 219–228, 2013.
- [93] S. R. Harris, E. J. Feil, M. T. G. Holden, M. a Quail, E. K. Nickerson, N. Chantratita, S. Gardete, A. Tavares, N. Day, J. a Lindsay, J. D. Edgeworth, H. de Lencastre, J. Parkhill, S. J. Peacock, and S. D. Bentley, "Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread.," *Science*, vol. 327, no. 5964, pp. 469–74, Jan. 2010.
- [94] N. V. Ayala-Núñez, "NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO MICROBICIDAS : ACTIVIDAD Y MECANISMOS DE ACCIÓN CONTRA LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA ( VIH ) Y DIFERENTES BACTERIAS RESISTENTES A INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA ( VIH ) Y DIFERENTES," 2010.
- [95] M. E. Velázquez-meza, M. C, and V. Me, "Surgimiento y diseminación de Staphylococcus aureus meticilinorresistente," vol. 47, no. 5, pp. 381–387, 2005.
- [96] J. Bustos-Martinez, A. Hamdan-Partida, and M. Gutierrez-Cardenas, "Staphylococcus aureus : la reemergencia de un patógeno," *Rev. Biomed.*, vol. 17, no. 4, pp. 287–305, 2006.
- [97] N. H. Mann, "The potential of phages to prevent MRSA infections," vol. 159, pp. 400–405, 2008.
- [98] W. W. Ñ, C. Cuny, I. Klare, U. Nu, B. Strommenger, and G. Werner, "Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens," vol. 298, pp. 365–377, 2008.
- [99] C. A. Alvarez, N. Yomayusa, L. Leal, and J. Moreno, "Nosocomial infections caused by resistant Staphylococcus aureus in," pp. 315–318, 2010.
- [100] D. Lozano, L. Díaz, M. Echeverry, S. Pineda, and S. Máttar, "Staphylococcus aureus resistentes a meticilina ( SARM ) positivos para PVL aislados en individuos sanos de Montería-Córdoba Introducción Materiales y métodos Tipo de estudio , localización , población," vol. 1352, pp. 159–165, 2010.
- [101] L. E. Cowen, J. B. Anderson, and L. M. Kohn, "E VOLUTION OF D RUG R ESISTANCE IN," 2002.
- [102] E. Cantón, Á. Viudes, U. D. B. Experimental, C. De Investigación, D. E. L. G. Candida, E. Estados, D. Candida, G. Candida, D. E. Cantón, H. Universitario, L. Fe, A. Campanar, C. La, and C. Figura, "Infección sistémica nosocomial por levaduras," pp. 51–55, 2001.

- [103] M. Martínez, J. L. López-Ribot, W. R. Kirkpatrick, S. P. Bachmann, S. Perea, M. T. Ruesga, and T. F. Patterson, "Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis.," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 49, no. 3, pp. 515–24, Mar. 2002.
- [104] C. Ajenjo, A. Aquevedo, A. M. Guzmá, H. P. Poggi, M. Calvo, C. Castillo, E. L. C, M. Andresen, H. Jaime, M. Sharp, and M. C. A. Henríquez, "Perfil epidemiológico de la candidiasis invasora en unidades de pacientes críticos en un hospital universitario," *Rev Chil Infect*, vol. 28, no. 2, pp. 118–122, 2011.
- [105] C. Gomez, "Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol *Candida yeast 's* resistance to fluconazol," *Infectio*, pp. 172–180, 2010.
- [106] O. S. Oluwafemi, Y. Lucwaba, A. Gura, M. Masabeya, V. Ncapayi, O. O. Olujimi, and S. P. Songca, "A facile completely 'green' size tunable synthesis of maltose-reduced silver nanoparticles without the use of any accelerator.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 102, pp. 718–23, Feb. 2013.
- [107] J. M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, and T. Nagai, "Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method.," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 25, no. 4, pp. 471–6, Apr. 1999.
- [108] Y. Li, Y. Pei, X. Zhang, Z. Gu, Z. Zhou, W. Yuan, J. Zhou, J. Zhu, and X. Gao, "PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats.," *J. Control. Release*, vol. 71, no. 2, pp. 203–11, Apr. 2001.
- [109] N. Csaba, M. Köping-höggård, and M. J. Alonso, "Ionically crosslinked chitosan / tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery," vol. 382, pp. 205–214, 2009.
- [110] M. M. Stevanović, S. D. Škapin, I. Bračko, M. Milenković, J. Petković, M. Filipič, and D. P. Uskoković, "Poly(lactide-co-glycolide)/silver nanoparticles: Synthesis, characterization, antimicrobial activity, cytotoxicity assessment and ROS-inducing potential," *Polymer (Guildf)*, vol. 53, no. 14, pp. 2818–2828, Jun. 2012.
- [111] T. Ahmad, I. a Wani, N. Manzoor, J. Ahmed, and A. M. Asiri, "Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 107, pp. 227–34, Jul. 2013.
- [112] I. Aiad, M. M. El-Sukkary, E. a. Soliman, M. Y. El-Awady, and S. M. Shaban, "In situ and green synthesis of silver nanoparticles and their biological activity," *J. Ind. Eng. Chem.*, Dec. 2013.

- [113] F. Martinez-Gutierrez, P. L. Olive, A. Banuelos, E. Orrantia, N. Nino, E. M. Sanchez, F. Ruiz, H. Bach, and Y. Av-Gay, "Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles.," *Nanomedicine*, vol. 6, no. 5, pp. 681–8, Oct. 2010.
- [114] D. Paredes, "ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE Escherichia coli Y Staphylococcus aureus," Universidad Industrial de Santander, 2011.
- [115] D. Paredes, C. Ortiz, and R. Torres, "Synthesis , characterization , and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against Escherichia coli O157 : H7 and methicillin- resistant Staphylococcus aureus ( MRSA )," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, pp. 1717–1729, 2014.
- [116] Q. Yuan, S. Hein, and R. D. K. Misra, "New generation of chitosan-encapsulated ZnO quantum dots loaded with drug: synthesis, characterization and in vitro drug delivery response.," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2732–9, Jul. 2010.
- [117] M. Stevanović, I. Bračko, M. Milenković, N. Filipović, J. Nunić, M. Filipič, and D. P. Uskoković, "Multifunctional PLGA particles containing poly(L-glutamic acid)-capped silver nanoparticles and ascorbic acid with simultaneous antioxidative and prolonged antimicrobial activity.," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 1, pp. 151–62, Jan. 2014.
- [118] E. Fortunati, L. Latterini, S. Rinaldi, J. M. Kenny, and I. Armentano, "PLGA/Ag nanocomposites: in vitro degradation study and silver ion release.," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 22, no. 12, pp. 2735–44, Dec. 2011.
- [119] A. Henglein and M. Giersig, "Formation of Colloidal Silver Nanoparticles : Capping Action of Citrate," vol. 46556, no. 2, pp. 9533–9539, 1999.
- [120] V. K. Sharma, R. a Yngard, and Y. Lin, "Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities.," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 145, no. 1–2, pp. 83–96, Jan. 2009.
- [121] P. Mulvaney, L. M. Liz-Marzán, M. Giersig, and T. Ung, "Silica encapsulation of quantum dots and metal clusters," *J. Mater. Chem.*, vol. 10, no. 6, pp. 1259–1270, 2000.
- [122] S. K. Mehta, S. Chaudhary, and M. Gradzielski, "Time dependence of nucleation and growth of silver nanoparticles generated by sugar reduction in micellar media.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 343, no. 2, pp. 447–53, Mar. 2010.

- [123] C. Faure, A. Derre, W. Neri, C. De Recherche, P. Pascal, A. V, and A. Schweitzer, "Spontaneous Formation of Silver Nanoparticles in Multilamellar Vesicles," pp. 4738–4746, 2003.
- [124] M. Darroudi, M. Bin Ahmad, A. H. Abdullah, and N. A. Ibrahim, "Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 569–74, Jan. 2011.
- [125] D. K. Bhui, H. Bar, P. Sarkar, G. P. Sahoo, S. P. De, and A. Misra, "Synthesis and UV–vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution," *J. Mol. Liq.*, vol. 145, no. 1, pp. 33–37, Mar. 2009.
- [126] T. Dadosh, "Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size," *Mater. Lett.*, vol. 63, no. 26, pp. 2236–2238, Oct. 2009.
- [127] V. K. Sharma, R. a Yngard, and Y. Lin, "Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities.," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 145, no. 1–2, pp. 83–96, Jan. 2009.
- [128] E. Filippo, A. Serra, A. Buccolieri, and D. Manno, "Green synthesis of silver nanoparticles with sucrose and maltose: Morphological and structural characterization," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 356, no. 6–8, pp. 344–350, Mar. 2010.
- [129] Z. Khan, S. A. Al-Thabaiti, F. M. Al-Nowaiser, A. Y. Obaid, A. O. Al-Youbi, and M. A. Malik, "Kinetics of silver nanoparticle growth in aqueous polymer solutions," *Arab. J. Chem.*, vol. 5, no. 4, pp. 453–459, Oct. 2012.
- [130] A. M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P. T. Kalaichelvan, and R. Venketesan, "Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria.," *Nanomedicine*, vol. 6, no. 1, pp. 103–9, Feb. 2010.
- [131] M. Stevanović, I. Bračko, M. Milenković, N. Filipović, J. Nunić, M. Filipič, and D. P. Uskoković, "Multifunctional PLGA particles containing poly(L-glutamic acid)-capped silver nanoparticles and ascorbic acid with simultaneous antioxidative and prolonged antimicrobial activity.," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 1, pp. 151–62, Jan. 2014.
- [132] Z. Hu, G. Oskam, and P. C. Searson, "Influence of solvent on the growth of ZnO nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 263, no. 2, pp. 454–460, Jul. 2003.
- [133] Y. Wang, X. Jiang, and Y. Xia, "A Solution-Phase , Precursor Route to Polycrystalline SnO 2 Nanowires That Can Be Used for Gas Sensing under Ambient Conditions," pp. 16176–16177, 2003.

- [134] L. Poul, S. Ammar, N. Jouini, and F. Fie, "Metastable solid solutions in the system ZnO CoO : synthesis by hydrolysis in polyol medium and study of the morphological characteristics," vol. 3, pp. 31–42, 2001.
- [135] B. W. Chieng and Y. Y. Loo, "Synthesis of ZnO nanoparticles by modified polyol method," *Mater. Lett.*, vol. 73, pp. 78–82, Apr. 2012.
- [136] Y. Khan, S. K. Durrani, M. Mehmood, J. Ahmad, M. R. Khan, and S. Firdous, "Low temperature synthesis of fluorescent ZnO nanoparticles," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 5, pp. 1756–1761, Dec. 2010.
- [137] K. S. Suganthi and K. S. Rajan, "Temperature induced changes in ZnO–water nanofluid: Zeta potential, size distribution and viscosity profiles," *Int. J. Heat Mass Transf.*, vol. 55, no. 25–26, pp. 7969–7980, Dec. 2012.
- [138] N. Talebian, S. M. Amininezhad, and M. Doudi, "Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties.," *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 120, pp. 66–73, Mar. 2013.
- [139] Y. Xie, R. Ye, and H. Liu, "Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 279, no. 1–3, pp. 175–178, May 2006.
- [140] M. S. Tokumoto, V. Briois, C. V Santilli, and S. H. Pulcinelli, "Preparation of ZnO Nanoparticles : Structural Study," pp. 547–551, 2003.
- [141] M. M. Ba-Abbad, A. A. H. Kadhum, A. Bakar Mohamad, M. S. Takriff, and K. Sopian, "The effect of process parameters on the size of ZnO nanoparticles synthesized via the sol–gel technique," *J. Alloys Compd.*, vol. 550, pp. 63–70, Feb. 2013.
- [142] a. Petica, S. Gavrilu, M. Lungu, N. Buruntea, and C. Panzaru, "Colloidal silver solutions with antimicrobial properties," *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 152, no. 1–3, pp. 22–27, Aug. 2008.
- [143] R. Y. Hong, J. H. Li, L. L. Chen, D. Q. Liu, H. Z. Li, Y. Zheng, and J. Ding, "Synthesis, surface modification and photocatalytic property of ZnO nanoparticles," *Powder Technol.*, vol. 189, no. 3, pp. 426–432, Feb. 2009.
- [144] F. Raimondi, G. G. Scherer, R. Kötz, and A. Wokaun, "Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 44, no. 15, pp. 2190–209, Apr. 2005.
- [145] P. K. Stoimenov, R. L. Klinger, G. L. Marchin, and K. J. Klabunde, "Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents," no. 13, pp. 6679–6686, 2002.

- [146] F. M. Walsh and S. G. B. Amyes, "Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens.," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 7, no. 5, pp. 439–44, Oct. 2004.
- [147] C. Jamora, M. a Theodoraki, V. Malhotra, and E. a Theodorakis, "Investigation of the biological mode of action of clerocidin using whole cell assays," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 9, no. 6, pp. 1365–1370, Jun. 2001.
- [148] H. Y. Song, K. K. Ko, I. H. Oh, and B. T. Lee, "Fabrication of Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Mechanisms," vol. 11, no. page 58, p. 2262, 2006.
- [149] T. Hamouda and J. R. Baker, "Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 89, no. 3, pp. 397–403, Sep. 2000.
- [150] M. Guzman, J. Dille, and S. Godet, "Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria.," *Nanomedicine*, vol. 8, no. 1, pp. 37–45, Jan. 2012.
- [151] S. Roy, N. Barua, A. K. Buragohain, and G. a. Ahmed, "Study of ZnO nanoparticles: Antibacterial property and light depolarization property using light scattering tool," *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.*, vol. 118, pp. 8–13, Mar. 2013.
- [152] R. K. Dutta, B. P. Nenavathu, M. K. Gangishetty, and a V. R. Reddy, "Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 94, pp. 143–50, Jun. 2012.
- [153] M. Guzman, J. Dille, and S. Godet, "Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 8, no. 1, pp. 37–45, 2012.
- [154] N. M. Huang, H. N. Lim, S. Radiman, P. S. Khiew, W. S. Chiu, R. Hashim, and C. H. Chia, "Sucrose ester micellar-mediated synthesis of Ag nanoparticles and the antibacterial properties," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 353, no. 1, pp. 69–76, Jan. 2010.
- [155] M. Premanathan, K. Karthikeyan, K. Jeyasubramanian, and G. Manivannan, "Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation.," *Nanomedicine*, vol. 7, no. 2, pp. 184–92, Apr. 2011.
- [156] D. Sharma, J. Rajput, B. S. Kaith, M. Kaur, and S. Sharma, "Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties," *Thin Solid Films*, vol. 519, no. 3, pp. 1224–1229, Nov. 2010.

- [157] A. Nasrollahi, K. Pourshamsian, and P. Mansourkiaee, "Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi," vol. 1, no. 3, pp. 233–239, 2011.
- [158] C. Jayaseelan, a A. Rahuman, a V. Kirthi, S. Marimuthu, T. Santhoshkumar, a Bagavan, K. Gaurav, L. Karthik, and K. V. B. Rao, "Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi.," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 90, pp. 78–84, May 2012.
- [159] A. Panáček, M. Kolár, R. Vecerová, R. Pucek, J. Soukupová, V. Krystof, P. Hamal, R. Zboril, and L. Kvítek, "Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp.," *Biomaterials*, vol. 30, no. 31, pp. 6333–40, Oct. 2009.
- [160] G. Zhao and S. E. Stevens, "Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion," vol. 11, no. 1993, pp. 27–32, 1998.
- [161] W. S. Cheow and K. Hadinoto, "Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 370, no. 1–3, pp. 79–86, Nov. 2010.
- [162] O. Boussif, F. Lezoualch, M. Zanta, M. Mergny, D. Schermant, B. Demeneix, and J. Behr, "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine," *proc natl acad sci.*, vol. 92, no. August, pp. 7297–7301, 1995.
- [163] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, and H. Ni, "Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 90, pp. 21–7, Feb. 2012.
- [164] S. Govindan, E. A. K. Nivethaa, R. Saravanan, V. Narayanan, and A. Stephen, "Synthesis and characterization of chitosan–silver nanocomposite," 2012.
- [165] W. S. Cheow and K. Hadinoto, "Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 370, no. 1–3, pp. 79–86, Nov. 2010.
- [166] J. S. Suk, S. Lai, Y.-Y. Wang, L. Ensign, P. Zeitlin, M. Boyle, and J. Hanes, "The penetration of fresh undiluted sputum expectorated by cystic fibrosis patients by non-adhesive polymer nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 30, no. 13, pp. 2591–2597, 2009.

- [167] P. Rogueda and D. Traini, "The nanoscale in pulmonary delivery . Part 1 : deposition , fate , toxicology and effects," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 4, pp. 595–606, 2007.
- [168] S. Liufu, H. Xiao, and Y. Li, "Investigation of PEG adsorption on the surface of zinc oxide nanoparticles," *Powder Technol.*, vol. 145, no. 1, pp. 20–24, Jul. 2004.
- [169] H. Chen, Y. Ding, and C. Tan, "Rheological behaviour of nanofluids," *New J. Phys.*, vol. 9, no. 10, pp. 367–367, Oct. 2007.
- [170] Y. Yamagata, M. Misaki, T. Kurokawa, K. Taira, and S. Takada, "Preparation of a copoly (dl-lactic/glycolic acid)-zinc oxide complex and its utilization to microcapsules containing recombinant human growth hormone.," *Int. J. Pharm.*, vol. 251, no. 1–2, pp. 133–41, Jan. 2003.
- [171] K. Shamel, M. Bin Ahmad, W. M. Z. W. Yunus, N. A. Ibrahim, R. A. Rahman, M. Jokar, and M. Darroudi, "Silver/poly (lactic acid) nanocomposites: preparation, characterization, and antibacterial activity.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 5, pp. 573–9, Jan. 2010.
- [172] S. W. Ali, S. Rajendran, and M. Joshi, "Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester," *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 2, pp. 438–446, Jan. 2011.
- [173] D. K. Božanić, L. V. Trandafilović, A. S. Luyt, and V. Djoković, "'Green' synthesis and optical properties of silver–chitosan complexes and nanocomposites," *React. Funct. Polym.*, vol. 70, no. 11, pp. 869–873, Nov. 2010.
- [174] D. Wei, W. Sun, W. Qian, Y. Ye, and X. Ma, "The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity.," *Carbohydr. Res.*, vol. 344, no. 17, pp. 2375–82, Nov. 2009.
- [175] M. Potara, E. Jakab, A. Damert, O. Popescu, V. Canpean, and S. Astilean, "Synergistic antibacterial activity of chitosan – silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*," vol. 135101, 2011.
- [176] S. W. Ali, S. Rajendran, and M. Joshi, "Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester," *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 2, pp. 438–446, 2011.
- [177] S. Prior, C. Gamazo, J. M. Irache, H. P. Merkle, and B. Gander, "Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating *Brucella* infections.," *Int. J. Pharm.*, vol. 196, no. 1, pp. 115–25, Feb. 2000.

- [178] G. Wang, B. Yu, Y. Wu, B. Huang, Y. Yuan, and C. S. Liu, "Controlled preparation and antitumor efficacy of vitamin E TPGS-functionalized PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel.," *Int. J. Pharm.*, vol. 446, no. 1–2, pp. 24–33, Mar. 2013.
- [179] X. R. Song, Z. Cai, Y. Zheng, G. He, F. Y. Cui, D. Q. Gong, S. X. Hou, S. J. Xiong, X. J. Lei, and Y. Q. Wei, "Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of vincristine and verapamil in PLGA nanoparticles.," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 37, no. 3–4, pp. 300–5, Jun. 2009.
- [180] A. J. Huh and Y. J. Kwon, "'Nanoantibiotics': a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era.," *J. Control. Release*, vol. 156, no. 2, pp. 128–45, Dec. 2011.
- [181] A. Kugel, S. Stafslie, and B. J. Chisholm, "Antimicrobial coatings produced by 'tethering' biocides to the coating matrix: A comprehensive review," *Prog. Org. Coatings*, vol. 72, no. 3, pp. 222–252, Nov. 2011.
- [182] L. A. Shelef, "Antimicrobial Effects of Lactates : A Review," *J. Food Prot.*, vol. 57, no. 5, 1994.
- [183] L.-H. Li, J.-C. Deng, H.-R. Deng, Z.-L. Liu, and X.-L. Li, "Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films," *Chem. Eng. J.*, vol. 160, no. 1, pp. 378–382, May 2010.
- [184] L. Kvitek, M. Vanickova, A. Panacek, J. Soukupova, M. Dittrich, E. Valentova, R. Prucek, M. Bancirova, D. Milde, R. Zboril, and R. J. P. C. B, "Initial Study on the Toxicity of Silver Nanoparticles ( NPs ) against *Paramecium caudatum*," pp. 4296–4300, 2010.
- [185] P. V Asharani, G. Low, K. Mun, M. P. Hande, and S. Valiyaveetil, "Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver," vol. 3, no. 2, pp. 279–290, 2009.
- [186] S. Arora, J. Jain, J. M. Rajwade, and K. M. Paknikar, "Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies.," *Toxicol. Lett.*, vol. 179, no. 2, pp. 93–100, Jul. 2008.
- [187] T. C. Long, N. Saleh, R. D. Tilton, and V. Gregory, "Titanium Dioxide ( P25 ) Produces Reactive Oxygen Species in Implications for Nanoparticle," vol. 40, no. 14, 2006.
- [188] J. Lovrić, S. J. Cho, F. M. Winnik, and D. Maysinger, "Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death.," *Chem. Biol.*, vol. 12, no. 11, pp. 1227–34, Nov. 2005.

- [189] L. Calderon, "Quitosano y Colágeno : Un binomio con funcionalidad en Biomedicina , Farmacia y Cosmética," Universidad Complutense de Madrid, 2013.
- [190] L. C. Muñoz, E. L. Lima, R. E. Harris, M. Ángeles, and L. Mengíbar, *Chemical Properties of Chitosan as a Marine Cosmeceutical*. 2005, pp. 39–50.
- [191] S. N. Rothstein and S. R. Little, "A 'tool box' for rational design of degradable controlled release formulations," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 1, p. 29, 2011.
- [192] V. Singh, S. Singh, S. Das, A. Kumar, W. T. Self, and S. Seal, "A facile synthesis of PLGA encapsulated cerium oxide nanoparticles: release kinetics and biological activity.," *Nanoscale*, vol. 4, no. 8, pp. 2597–605, Apr. 2012.
- [193] S. Freiberg and X. X. Zhu, "Polymer microspheres for controlled drug release.," *Int. J. Pharm.*, vol. 282, no. 1–2, pp. 1–18, Sep. 2004.
- [194] L. Li and S. P. Schwendeman, "Mapping neutral microclimate pH in PLGA microspheres.," *J. Control. Release*, vol. 101, no. 1–3, pp. 163–73, Jan. 2005.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### CÁLCULO DE PORCENTAJE DE INHIBICIÓN BACTERIANA

Al realizar la cinética de crecimiento bacteriano en presencia de AgNPs, se midió la absorbancia cada hora durante 8 horas a 595nm. El porcentaje de inhibición bacteriana se realizó como lo indica la siguiente ecuación:

$$Y = 100 - \frac{(A_f - A_0) * 100}{A_{cf} - A_{co}}$$

Donde:

**A<sub>f</sub>**= Absorbancia al tiempo donde la bacteria se encuentre en fase exponencial en presencia de las AgNPs.

**A<sub>0</sub>**= Absorbancia inicial de la bacteria en presencia de las AgNPs.

**A<sub>cf</sub>**= Absorbancia al tiempo donde la bacteria se encuentre en fase exponencial en ausencia de las AgNPs.

**A<sub>co</sub>**= Absorbancia inicial de la bacteria en ausencia de las AgNPs.

## ANEXO B

### CÁLCULO DE PORCENTAJE DE ENCAPSULACIÓN

Al realizar la encapsulación de nanopartículas metálicas en los tres polímeros biodegradables empleados, se determinó el porcentaje de encapsulación de cada nanocompuesto obtenido. El cálculo del porcentaje de encapsulación se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%E = \frac{mg\ NPs_e}{mg\ NPs_o} * 100$$

Donde:

$\%E$  = porcentaje de encapsulación de la nanopartícula metálica en la matriz del polímero.

$NPs_e$  = Masa de nanopartículas metálicas encapsuladas en la matriz del polímero.

$NPs_o$  = Masa de nanopartículas metálicas iniciales adicionadas en la síntesis del nanocompuesto.

## ANEXO C

### CÁLCULO DE PORCENTAJE DE CARGA

Al realizar la encapsulación de nanopartículas metálicas en los tres polímeros biodegradables empleados, se determinó el porcentaje de carga de cada nanocompuesto obtenido. El cálculo del porcentaje de carga se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%C = \frac{mg\ NPs_e}{mg\ P} * 100$$

Donde:

$\%C$  = Porcentaje de carga de nanopartículas metálicas en la matriz del polímero.

$NPs_e$  = Masa de nanopartículas metálicas encapsuladas en la matriz del polímero.

$P$  = Masa de polímero inicial empleado en la síntesis de nanocompuestos.