



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS  
DE PLATA Y DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS, PARA LA  
CREACIÓN DE UN DISPOSITIVO ANTIBACTERIAL OBTENIDO  
MEDIANTE PRINTRÓNICA, EVALUADO EN *Escherichia coli* Y  
*Staphylococcus aureus*.

AUTORAS: BARRERA PAREDES, NICOLE ESTEFANÍA Y  
GUERRERO ZAMBRANO, LIZETH GUERRERO

DIRECTOR: DEBUT, ALEXIS PhD.

SANGOLQUÍ

2017



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, **“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS, PARA LA CREACIÓN DE UN DISPOSITIVO ANTIBACTERIAL OBTENIDO MEDIANTE PRINTRÓNICA, EVALUADO EN *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*”** realizado por las señoritas **NICOLE ESTEFANÍA BARRERA PAREDES** y **LIZETH ALEJANDRA GUERRERO ZAMBRANO**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a las señoritas **NICOLE ESTEFANÍA BARRERA PAREDES** y **LIZETH ALEJANDRA GUERRERO ZAMBRANO** para que lo sustenten públicamente.

Sangolquí, 31 de Julio del 2017

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Alexis Debut Ph.D.

**DIRECTOR**



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Nosotras, **NICOLE ESTEFANÍA BARRERA PAREDES** con cédula de identidad N° 171802692-3 y **LIZETH ALEJANDRA GUERRERO ZAMBRANO**, con cédula de identidad N° 171611315-2, declaramos que este trabajo de titulación "**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS, PARA LA CREACIÓN DE UN DISPOSITIVO ANTIBACTERIAL OBTENIDO MEDIANTE PRINTRÓNICA, EVALUADO EN *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus***" ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaramos que este trabajo es de nuestra autoría, en virtud de ello nos declaramos responsables del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 31 de Julio del 2017

Nicoles Estefanía Barrera Paredes  
C.C. 171802692-3

Lizeth Alejandra Guerrero Zambrano  
C.C. 171611315-2



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

Nosotras, **NICOLE ESTEFANÍA BARRERA PAREDES** y **LIZETH ALEJANDRA GUERRERO ZAMBRANO**, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de Titulación **“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS, PARA LA CREACIÓN DE UN DISPOSITIVO ANTIBACTERIAL OBTENIDO MEDIANTE PRINTRÓNICA, EVALUADO EN *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*”** cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 31 de Julio del 2017

Nicoles Estefanía Barrera Paredes

C.C. 171802692-3

Lizeth Alejandra Guerrero Zambrano

C.C. 171611315-2

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedicamos primeramente a Dios, que nos ha acompañado y bendecido a lo largo de nuestras vidas. A mis padres Eduardo y Jenny y a mi hermano Juan José, y a mis padres Armando y Marisol, quienes con su amor, su gran sacrificio y su indispensable apoyo han sido nuestra guía para ser cada vez mejores seres humanos, capaces de afrontar cada reto que se nos presente en nuestras vidas. Nuestras familias fueron la inspiración que necesitábamos para llegar a ser quienes somos ahora, y son la motivación que necesitamos cada día para superarnos y conquistar cada sueño y meta que vendrán en el camino.

También dedicamos nuestro esfuerzo a nuestros profesores, quienes han sido el pilar fundamental de nuestro conocimiento y han inspirado en nosotras una huella de humildad, perseverancia e incondicionalidad en cada paso que hemos dado.

A nuestros amigos y colegas: Eri, Carlita, Ambar, Caro, Rommel, Eve, Wlady, Diego A., Diego V., Caro V., Alexis F., Alexis O., Gaby, David, Sunito, Caro M., Joyce y André, y a novio Carlos Eduardo, quienes estuvieron presentes en cada momento con palabras de aliento, cariño, travesuras y bullying, creando momentos inolvidables, los cuales siempre estarán presentes en cada latido de nuestros corazones.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por brindarnos su amor, darnos fortaleza y enseñarnos que con humildad y perseverancia los sueños se pueden tocar con las manos.

Agradecemos a nuestras familias quienes nos mostraron que rendirse no es la opción para alcanzar el éxito, no solo en la etapa universitaria, sino durante toda nuestra vida.

A los familiares y amigos presentes en cada momento, que con su granito de arena hicieron que nuestro camino esté lleno de alegrías y cariño.

A Alexis Debut Ph.D. y a Carlos Arroyo Ph.D., quienes nos apoyaron e alentaron para que nuestra investigación comience a dar pasos gigantes.

A Petrus Santa Cruz quien supo darnos su confianza y apoyo para realizar esta investigación, y quien nos ha brindado su amistad y protección incondicional, durante nuestra estancia en Brasil.

A Norma Gusmão, que nos brindó su apoyo fundamental para culminar nuestra investigación.

Al Laboratorio de Nanodispositivos Fotônicos LANDFOTON y al CENCINAT, por permitirnos trabajar en sus instalaciones.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	CAPÍTULO I.....	1
	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2	JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER .....	2
1.3	OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	4
2	CAPÍTULO II.....	5
	MARCO TEÓRICO.....	5
2.1	NANOPARTÍCULAS DE PLATA .....	5
2.1.1	Síntesis de nanopartículas de plata .....	6
2.1.2	Caracterización de Ag-NPs .....	10
2.1.3	Mecanismo antibacterial de las Ag-NPs.....	20
2.2	COMPÓSITOS POLIMÉRICOS.....	21
2.2.1	Compósitos poliméricos con Ag-NPs.....	23
2.2.2	Mecanismo de acción antimicrobiana de los compósitos poliméricos con Ag-NPs .....	24
2.3	ANÁLISIS ECOTÓXICO DEL SOPORTE DE IMPRESIÓN .....	26
2.3.1	<i>Artemia franciscana</i> .....	27
2.4	IMPRESIÓN DE FLUIDOS.....	30
2.5	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO .....	36
2.5.1	<i>Escherichia coli</i> .....	38
2.5.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	40
2.5.3	Método de difusión en agar con discos de Kirby-Bauer.....	43
2.5.3.1	Coefficiente de difusión de nanopartículas de plata en el medio de cultivo .....	44
3	CAPÍTULO III .....	46
	MATERIALES Y MÉTODOS .....	46
3.1	PARTICIPANTES .....	46
3.2	ZONA DE ESTUDIO .....	46
3.3	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	47
3.4	MATERIALES Y REACTIVOS .....	47
3.5	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	51
3.5.1	Método químico.....	51
3.5.2	Método de irradiación por microondas.....	52
3.6	CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS.....	53
3.6.1	Análisis por espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-VIS) .....	53

3.6.2	Análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) .....	53
3.6.3	Análisis por Difracción de Rayos X (XRD).....	54
3.6.4	Análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido (STEM) y de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) .....	54
3.7	ANÁLISIS ECOTÓXICO DEL POLÍMERO POLIVINILBUTIRAL Y DEL SOPORTE DE IMPRESIÓN.....	55
3.7.1	Preparación del polímero por evaporación.....	55
3.7.2	Eclosión de <i>Artemia franciscana</i> .....	56
3.7.3	Test ecotóxico en <i>Artemia franciscana</i> .....	57
3.8	IMPRESIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS Y DE LOS NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS .....	58
3.8.1	Análisis de afinidad solvente de impresión - material de impresión .....	58
3.8.2	Fijación de parámetros e impresión de nanopartículas sintetizadas mediante el método químico. ....	59
3.9	ANÁLISIS DEL EFECTO BACTERICIDA DE LOS DISPOSITIVOS IMPRESOS EN <i>Escherichia coli</i> Y <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	66
3.9.1	Preparación de los dispositivos impresos .....	66
3.9.2	Preparación del estándar 0.5 del nefelómetro de McFarland .....	68
3.9.3	Preparación de los inóculos bacterianos .....	69
3.9.4	Medición de la viscosidad aparente del medio de cultivo Mueller-Hinton – Agar .....	70
3.9.5	Test de inhibición bacteriana.....	71
3.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	71
3.10.1	Supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> .....	71
3.10.2	Test de inhibición bacteriana.....	74
3.11	HIPÓTESIS.....	77
3.11.1	Hipótesis para la Supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> .....	77
3.11.2	Hipótesis para la Inhibición bacteriana .....	77
3.12	OPERATIVIDAD DE LAS VARIABLES.....	78
4	CAPÍTULO IV .....	79
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	79
4.1	NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS .....	79
4.1.1	Caracterización de nanopartículas .....	80
4.2	ANÁLISIS ECOTÓXICO EN <i>Artemia franciscana</i> .....	94
4.2.1	Mortalidad .....	94
4.2.2	Análisis estadístico .....	97
4.3	AFINIDAD SOLVENTE – MATERIAL DE IMPRESIÓN NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR SÍNTESIS QUÍMICA.....	100



4.4	CURVA DE CALIBRACION WAVEFORM PARA LA IMPRESIÓN .....	101
4.5	ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO .....	104
4.5.1	Halos de inhibición.....	104
4.5.2	Análisis estadístico .....	110
4.6	RELACIÓN ENTRE EL HALO DE INHIBICIÓN Y EL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN.....	114
5	CONCLUSIONES.....	116
6	RECOMENDACIONES .....	118
7	BIBLIOGRAFÍA .....	119

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Taxonomía de <i>Artemia Franciscana</i> .....	28
Tabla 2.	Parámetros recomendados para la impresión.....	31
Tabla 3.	Taxonomía de <i>Escherichia coli</i> .....	39
Tabla 4.	Taxonomía de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	41
Tabla 5.	Ubicación del sitio experimental .....	46
Tabla 6.	Aporte de LANDFOTON (materiales, equipos y reactivos). .....	47
Tabla 7.	Aporte de CENCINAT (materiales, equipos y reactivos).....	49
Tabla 8.	Relaciones de concentración solvente – material de impresión, con respecto a las Ag-NPs (Q) (obtenidas por método químico y Ag-NPs (M) (obtenidas por irradiación microondas).....	58
Tabla 9.	Relaciones de concentración solvente - PVB .....	59
Tabla 10.	Distribución de discos para cada tratamiento con las bacterias seleccionadas .....	67
Tabla 11.	Concentraciones obtenidas de medio de cultivo .....	70
Tabla 12.	Tratamientos en la fase de supervivencia en <i>Artemia franciscana</i> .....	72
Tabla 13.	Tratamientos en la fase de inhibición bacteriana .....	75
Tabla 14.	Operatividad de Variables.....	78
Tabla 15.	Espectros UV-VIS obtenidos en la síntesis de Ag-NPs por el método químico... ..	80
Tabla 16.	Espectros UV-vis obtenidos en la síntesis de Ag-NPs por irradiación microondas .....	82
Tabla 17.	Relación entre la posición del pico máximo de absorción y el tamaño aproximado de nanopartículas formadas.....	83
Tabla 18.	Mediciones de la viscosidad dinámica del medio de cultivo Mueller-Hinton preparado con agar. ....	85
Tabla 19.	Coeficientes de difusión de las Ag-NPs sintetizadas en el medio de cultivo Mueller-Hinton .....	88
Tabla 20.	Radios atómicos y estructuras cristalinas de 16 metales.....	89
Tabla 21.	Mortalidad de <i>A. franciscana</i> con AC en diferentes concentraciones .....	94
Tabla 22.	Mortalidad de <i>A. franciscana</i> con PVB en diferentes concentraciones .....	96
Tabla 23.	Análisis de varianza ANOVA del diseño factorial 2X3 de la supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> .....	98
Tabla 24.	Ajustes de control de los cuatro segmentos para la elaboración de la curva de calibración para la impresión de Ag-NPs (Q). .....	102
Tabla 25.	Ajustes de control de los cuatro segmentos para la elaboración de la curva de calibración para la impresión de Ag-NPs (M) / PVB.....	103
Tabla 26.	Efecto bactericida de los coloides Ag-NPs (Q) y Ag-NPs (M) en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	105
Tabla 27.	Medición del halo de inhibición de Ag-NPs (Q) en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	108
Tabla 28.	Medición del halo de inhibición de Ag-NPs (M) / PVB en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .. ..	108
Tabla 29.	Análisis de varianza ANOVA del diseño factorial 2X3 de la Inhibición bacteriana frente a Ag-NPs (Q).....	110
Tabla 30.	Análisis de varianza ANOVA del diseño factorial 2X3 de la Inhibición bacteriana frente a Ag-NPs (M) / PVB. ....	112
Tabla 31.	Relación entre el halo de inhibición y el coeficiente de difusión para Ag-NPs (Q) y para Ag-NPs (M) / PVB. ....	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes formas de Ag-NPs dependiendo del agente reductor y el agente estabilizante utilizados. ....	7
Figura 2. Mecanismo de formación de nanopartículas de plata a partir de la reducción química en disolución de la sal AgNO <sub>3</sub> . ....	8
Figura 3. Esquema del espectro de luz visible. ....	10
Figura 4. Esquema de fluctuaciones de intensidad según el tamaño de las partículas. a. Partículas grandes, b. Partículas pequeñas.....	11
Figura 5. Estructura cristalina cúbica centrada en las caras FCC, representación de la celdilla unitaria.....	13
Figura 6. Celdilla unitaria de un sistema cristalino cúbico, con los ejes de coordenadas $x$ , $y$ y $z$ , longitudes de aristas $a$ , $b$ y $c$ y ángulos interaxiales ( $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ ). ....	14
Figura 7. Direcciones [100], [110] y [111] en una celdilla unitaria.....	15
Figura 8. Difracción de rayos X por planos cristalográficos (A-A' y B-B'). ....	16
Figura 9. Cañón de electrones del microscopio electrónico ..... 17	17
Figura 10. Microscopio electrónico de transmisión y sus partes..... 18	18
Figura 11. Mecanismo de actividad bactericida de las Ag-NPs en bacterias ..... 21	21
Figura 12. Preparación <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> de compósitos poliméricos con nanopartículas metálicas ..... 23	23
Figura 13. Mecanismo antibacterial de los compósitos poliméricos con Ag-NPs en matrices termoplásticas. .... 25	25
Figura 14. Estructura química del acetato de celulosa ..... 26	26
Figura 15. <i>Artemia franciscana</i> , A. nauplio (48 horas); B. Artemia adulta. .... 30	30
Figura 16. Ejemplos de materiales imprimibles mediante impresoras DoD ..... 32	32
Figura 17. Actuador piezoeléctrico del eyector de fluido de la impresora ..... 33	33
Figura 18. Formación de gotas en una impresora DoD. A. Goteo de fluidos newtonianos. B. Goteo de fluidos no newtonianos ..... 35	35
Figura 19. Clasificación de las bacterias según su forma y sus asociaciones. .... 37	37
Figura 20. Diferencias entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas en su pared celular ..... 38	38
Figura 21. <i>E. coli</i> en Tinción Gram ..... 39	39
Figura 22. <i>S. aureus</i> en Tinción Gram..... 42	42
Figura 23. Radio hidrodinámico determinado por DLS ..... 45	45
Figura 24. Síntesis de nanopartículas de plata por método químico..... 52	52
Figura 25. Síntesis de nanopartículas de plata por irradiación microondas. .... 53	53
Figura 26. Preparación de la muestra para el análisis por Difracción de Rayos X. .... 54	54
Figura 27. Preparación del polímero por evaporación. .... 55	55
Figura 28. Proceso realizado para la eclosión de <i>Artemia franciscana</i> . .... 56	56
Figura 29. Proceso realizado para el test ecotóxico del acetato de celulosa y del polímero PVB en <i>Artemia franciscana</i> . .... 57	57
Figura 30. Selección del Patrón de Impresión ..... 60	60
Figura 31. Herramienta Load/Unload Substrate ..... 61	61
Figura 32. Herramienta Print Set-up ..... 62	62
Figura 33. Fijación la frecuencia máxima de goteo y el control de la vibración de los actuadores piezoeléctricos..... 63	63

Figura 34. Opción Cleaning Cycles .....	64
Figura 35. Herramienta Drop Watcher .....	65
Figura 36. Resumen del proceso de impresión .....	66
Figura 37. Obtención mediante perforación de los discos con material impreso. ....	68
Figura 38. Preparación del estándar 0.5 del nefelómetro de McFarland que equivale a 1.5 x 10 <sup>9</sup> UFC/mL.....	68
Figura 39. Preparación de los inóculos bacterianos según el estándar 0.5 del nefelómetro de McFarland que equivale a 1.5 x 10 <sup>9</sup> UFC/mL.....	69
Figura 40. Medición de la viscosidad aparente del medio de cultivo Mueller-Hinton - Agar.....	70
Figura 41. Test de inhibición bacteriana en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	71
Figura 42. Síntesis de Ag-NPs, A. Por método químico. B. Por microondas.....	79
Figura 43. Espectro UV-VIS de la síntesis de Ag-NPs por el método químico. ....	81
Figura 44. Espectro UV-VIS de la síntesis de Ag-NPs por irradiación microondas. ....	82
Figura 45. Análisis de DLS para nanopartículas de ambas síntesis, A. Ag-NPs (Q). B. Ag-NPs (M).....	84
Figura 46. Relación entre la concentración del medio de cultivo Mueller-Hinton y la viscosidad dinámica del medio usado para la siembra bacteriana. ....	86
Figura 47. Relación entre la concentración del agar en el medio de cultivo usado para la siembra bacteriana y su viscosidad dinámica.....	87
Figura 48. Análisis XRD para Ag-NPs (Q) .....	90
Figura 49. Análisis XRD para Ag-NPs (M).....	91
Figura 50. Imágenes de TEM / STEM para ambos métodos de síntesis. A. TEM de Ag-NPs (Q). B. STEM de Ag-NPs (Q). C. TEM de Ag-NPs (M). D. STEM de Ag-NPs (M).....	92
Figura 51. Histograma de distribución de Ag-NPs (Q) obtenido por el Software NanoSize™. ....	93
Figura 52. Histograma de distribución de Ag-NPs (M) obtenido por el Software NanoSize™. ....	94
Figura 53. Relación de la supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> y el tipo y concentración de sustrato. ....	99
Figura 54. Ag-NPs (Q) con etanol. A. relación 1:1 (Ag-NPs (Q) / Etanol) al instante de la mezcla. B. relación 1:1 (Ag-NPs (Q) / Etanol) al día siguiente de la mezcla. ....	100
Figura 55. Ag-NPs (Q) con etilenglicol. A. relación 1:1 (Ag-NPs (Q) / Etilenglicol) al día 7. B. relación 1:1 (Ag-NPs (Q) / Etilenglicol) al día 14.....	101
Figura 56. Curva de calibración para Ag-NPs (Q).....	103
Figura 57. Curva de calibración para Ag-NPs (M) / PVB .....	104
Figura 58. Efecto bactericida de los coloides en <i>E. coli</i> . A. Ag-NPs (Q). B. Ag-NPs (M). ....	105
Figura 59. Efecto bactericida de coloides en <i>S. aureus</i> A. Ag-NPs (Q) B. Ag-NPs (M).....	105
Figura 60. Efecto bactericida de Ag-NPs (Q) en <i>E. coli</i> . A. Inhibición con A5. B. Inhibición con A15 y A30.....	106
Figura 61. Efecto bactericida de Ag-NPs (M) / PVB en <i>E. coli</i> . A. Inhibición con ACP5. B. Inhibición con ACP15 y ACP30 .....	106
Figura 62. Efecto bactericida de Ag-NPs (Q) en <i>S. aureus</i> . A. Inhibición con A5. B. Inhibición con A15 y A30.....	107
Figura 63. Efecto bactericida de Ag-NPs (M) / PVB en <i>S. aureus</i> . A. Inhibición con	

ACP5. B. Inhibición con ACP15 y ACP30 .....	107
Figura 64. Relación entre el número de capas impresas y los halos de inhibición generados al poner en contacto el dispositivo con Ag-NPs (Q) sobre los microorganismos.....	111
Figura 65. Relación entre el número de capas impresas y los halos de inhibición generados al poner en contacto el dispositivo con Ag-NPs (M) / PVB sobre los microorganismos. ....	113

**ABREVIATURAS**

**Ag-NPs:** Nanopartículas de plata

**Ag-NPs (Q):** Nanopartículas de plata sintetizadas por método químico

**Ag-NPs (M):** Nanopartículas de plata sintetizadas por irradiación de microondas

**Ag-NPs (M) / PVB:** Nanocompuestos poliméricos formados por nanopartículas de plata sintetizadas por irradiación microondas y polivinil butiral.

**UV-VIS:** Ultraviolet-visible Spectroscopy / Espectroscopía Ultravioleta-Visible

**TEM:** Transmission electron microscopy / Microscopía Electrónica de Transmisión

**XRD:** X-Ray Diffraction / Difracción de Rayos X

**DLS:** Dynamic light scattering / Dispersión Dinámica de Luz

**DoD:** Drop on Demand

**DMP™:** Dimatix Materials Printer™

**STEM:** Scanning transmission electron microscopy / Microscopía electrónica de transmisión y barrido

**PVP:** Polivinilpirrolidona

**PVA:** Polivinil Alcohol

**PVB:** Polivinil Butiral

**S.U.:** Sin Unidades

## RESUMEN

Las nanopartículas de plata (Ag-NPs) son conocidas por su eficiente actividad bactericida y son ampliamente usadas en la industria. Este estudio pretende producir un fluido complejo imprimible que contenga estas Ag-NPs, y para ello se describe su síntesis utilizando métodos químicos e irradiación por microondas, para obtener un tamaño promedio de partículas monodispersas de 20 nanómetros. Las propiedades estructurales y morfológicas de las nanopartículas sintetizadas se caracterizaron por UV-VIS, STEM, TEM, DLS y XRD. Esta investigación tiene como objetivo crear dispositivos antibacteriales usando Printrónica, una tecnología innovadora que imprime fluidos funcionales utilizando los principios de la microfluídica. Los fluidos de impresión utilizados fueron Ag-NPs y nanocompuestos poliméricos con polivinil butiral (Ag-NPs / PVB). *Artemia franciscana*, un microcrustáceo, se utilizó para el análisis ecotóxico del soporte de impresión y PVB, y el método Kirby-Bauer para determinar el efecto antibacterial en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados demuestran que el dispositivo impreso con Ag-NPs coloidales muestra inhibición bacteriana, lo que sugiere que su fabricación puede ser potencialmente utilizada en aplicaciones ambientales, médicas e industriales.

### PALABRAS CLAVE

- **NANOPARTÍCULAS DE PLATA**
- **NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS**
- **PRINTRÓNICA**
- **NANODISPOSITIVO**
- **EFEECTO ANTIBACTERIAL**

## ABSTRACT

Silver nanoparticles (Ag-NPs) are known for their efficient bactericidal activity and are widely used in industry. This study intends to produce a printable complex fluid containing Ag-NPs that were obtained using chemical methods and microwave irradiation, to get an average size of monodisperse particles of 20 nanometers. The structural and morphological properties of the synthesized nanoparticles are characterized by UV-VIS, STEM, TEM, DLS and XRD. This research aims to create antibacterial devices using Printronics, an innovative technology that prints functional fluids using the principles of microfluidics. The printing fluids, were colloidal Ag-NPs and polymeric nanocomposites with polyvinyl butyral (Ag-NPs / PVB). *Artemia franciscana*, a microcrustacean, was used for ecotoxic analysis of the printing support and PVB, and the Kirby-Bauer method to determine the antibacterial effect in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results demonstrate that the device printed with colloidal Ag-NPs shows bacterial inhibition, suggesting that their manufacture can potentially be used in environmental, medical and industrial applications.

### KEYWORDS:

- SILVER NANOPARTICLES
- POLYMERIC NANOCOMPOSITES
- PRINTRONICS
- NANODEVICES
- ANTIBACTERIAL EFFECT



# 1 CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La plata es un metal que ha sido utilizado ampliamente desde hace miles de años como agente desinfectante en higiene y medicina. En el siglo XIX se estableció que las sales de plata actuaban como agentes antimicrobianos eficientes y se ha determinado que la plata desarrolla poca o escasa resistencia bacteriana (Ip et al., 2006), debido a lo cual su utilización se ha convertido en un potencial de investigación en las últimas décadas (Ayala, 2010).

Las nanopartículas de plata (Ag-NPs) presentan una mayor actividad bactericida en comparación con otros metales como el oro o el cobre (Flores, 2014). Varios estudios han evidenciado las propiedades antibacteriales de Ag-NPs, indicando una inhibición favorable a medida que su concentración aumenta. (Paredes, 2011; Rojas et al., 2015).

La introducción de las Ag-NPs en matrices poliméricas ha tenido gran éxito, ya que se ha evaluado sus propiedades bactericidas en combinación con varios polímeros como la celulosa (Li et al., 2011), el quitosano (Freire et al., 2016; Malegowd et al., 2016) y PVP y PVA (Eisa et al., 2012; Yu et al., 2006), generando óptimos resultados. Las Ag-NPs y los compósitos poliméricos han sido utilizados actualmente en empaques de alimentos, obteniéndose excelentes resultados en su función (Camacho et al., 2011; Sergio et al., 2015).

En material hospitalario, los compósitos con Ag-NPs han sido utilizados en resinas dentales (Padovani, 2015) y en una amplia gama de material hospitalario como filtros de respiradores, catéteres o sprays de limpieza (Aláez, 2015).

En los últimos años, la nanotecnología ha tenido una fuerte repercusión en la industria con la elaboración de nuevos productos que contiene nanomateriales (Souza, 2015). Una de las técnicas con mayor relevancia es la impresión de nanomateriales mediante la línea de

impresoras DoD (Drop on Demand), específicamente Dimatix Materials Printer™ (DMP™), la cual permite la impresión de fluidos imprimibles (como Ag-NPs y compósitos poliméricos con Ag-NPs), para desarrollo y creación de nuevos dispositivos en diferentes áreas con electrónica y medicina (Delgado, 2009). La impresión de nanomateriales engloba una serie de requisitos para generar un dispositivo final que pueda ser replicable y evaluado, debido al control que se mantiene mediante diferentes parámetros de impresión (Souza, 2015).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER

La bionanotecnología es una rama multidisciplinar de la biotecnología que permite la creación de nuevos dispositivos como una solución para mejorar la calidad de vida de los seres humanos (Lechuga, 2006). La vida diaria de los seres humanos se desenvuelve en un ambiente contaminado con agentes bacterianos que llegan a ser perjudiciales para la salud, causando infecciones y/o alterando la esterilidad de productos, generando su deterioro (Armendáriz, 2012).

Las bacterias son los organismos más abundantes en el planeta, y pueden llegar a afectar diferentes productos importantes de comercialización incluyendo los alimentos industrializados, como enlatados o Tetra Pak®, y materiales hospitalarios, como catéteres o jeringas, por lo que su crecimiento y multiplicación es una amenaza para el ser humano (Bello, 2012).

Las bacterias que se utilizan comúnmente para el control bacteriológico son dos, la primera es *Escherichia coli*, una bacteria Gram negativa que se utiliza como un indicador común de contaminación fecal en agua y alimentos industrializados (FAO, 2016). La segunda es *Staphylococcus aureus* que es un indicador de contaminación que proviene de vías orales, nasales o de la piel y es considerada como una de las principales bacterias Gram positivas que están implicadas en la transmisión de enfermedades de igual forma por agua y alimentos (Zendejas et al., 2014). Estos dos microorganismos son considerados cepas inoñas para el hombre (Güerri, 2002). Son representativos de un gran espectro bacteriano, y se encuentran

fácilmente en contacto con el hombre, lo que las convierte en blancos de estudio importantes en la aplicación de agentes bactericidas (Feng, 2010).

Las infecciones adquiridas en hospitales son muy frecuentes y se calcula que entre 15 y 30% de las bacterias nosocomiales son adquiridos por el uso de algunos dispositivos como los catéteres. Este tipo de contaminaciones tiene una importante morbilidad y una mortalidad no despreciable, siendo la causa más frecuente que obliga a la eliminación de cualquier tipo de dispositivo (Ferrer et al., 2014). Los estafilococos (Gram positivos), como *S. aureus*, producen las infecciones más frecuentes relacionadas al uso de dispositivos hospitalarios, llegando a causar más del 65% del total de infecciones causadas por bacterias. Los bacilos Gram negativos como *E. coli*, se considera que causa un 45.1% de bacteriemias a nivel mundial en instituciones de salud (Cordero et al., 2002).

Debido a la presencia de bacterias perjudiciales en agua, alimentos y material médico, la industria ha visto la necesidad de generar soluciones que aseguren la esterilidad de los productos y la prevención de infecciones, una de éstas soluciones es la elaboración de dispositivos compuestos de Ag-NPs y películas poliméricas con Ag-NPs realizadas químicamente y a gran escala, para contrarrestar el crecimiento microbiano (Delgado, 2009).

La printrónica permite desarrollar tecnologías de producción de dispositivos basadas en fluidos imprimibles, por lo tanto se transforma en un área de investigación sumamente útil en el campo de la bionanotecnología (Yamada, 2016). Las impresoras DoD han permitido la creación de varios dispositivos elaborados con nanomateriales como sensores de gas (Kim et al., 2009), sensores electrónicos (Tortorich & Choi, 2013) y nanodosímetros de UV para evitar cáncer de piel (Souza et al., 2015). Actualmente, la impresión de Ag-NPs y de compósitos poliméricos con Ag-NPs, en impresoras DMP™, es una de las técnicas que se ha utilizado para el desarrollo de nuevos dispositivos antibacterianos que sean replicables y evaluados (Delgado, 2009; Souza, 2015).

### 1.3 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

#### 1.3.1.1 Objetivo general del proyecto

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata y nanocompuestos poliméricos, para crear un dispositivo antibacterial mediante printrónica y evaluarlo en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

#### 1.3.1.2 Objetivos específicos

- Obtener y estabilizar nanopartículas de plata mediante método químico e irradiación por microondas.
- Evaluar la ecotoxicidad mediante la mortalidad de *Artemia franciscana* al contacto con el sustrato y con el polímero.
- Establecer los parámetros de impresión de los fluidos para que éstos puedan ser replicables y evaluados.
- Obtener dispositivos antibacteriales mediante la impresión con microfluídica.
- Determinar el efecto bactericida mediante medición del halo de inhibición en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, por el método de difusión en agar con discos de Kirby-Bauer.

## 2 CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 NANOPARTÍCULAS DE PLATA

La plata ha sido utilizada ampliamente desde hace miles de años en la humanidad, con aplicaciones en joyería, utensilios, fotografía, explosivos, desinfección y la más importante en medicina. Desde la antigüedad se ha usado la plata para la curación de heridas y tratamiento de enfermedades, ya que actúa como un agente antimicrobiano eficiente, pero con la aparición de los antibióticos su utilización disminuyó (Monge, 2008).

Los antibióticos son sustancias químicas que se usan como bactericidas, y que utilizados correctamente son efectivos en su función. A medida que los antibióticos se han ido utilizando, los microorganismos han producido una resistencia a éstos debido a su incorrecta administración, por lo que el control de gérmenes se ha vuelto más difícil (FDA, 2007). La plata desarrolla poca o escasa resistencia bacteriana (Ip et al., 2006), debido a lo cual su utilización se ha convertido en un potencial de investigación en las últimas décadas (Ayala, 2010).

Las NPs son partículas coloidales sólidas situadas en el rango nanométrico, entre 1 y 100 nm (Sifontes et al., 2010), y presentan propiedades completamente diferentes en comparación a los mismos materiales a mayor escala, como por ejemplo modificaciones en su luminiscencia, su conductividad y actividad catalítica. Las NPs poseen una mayor relación de superficie-volumen y por tanto una mayor superficie de contacto con el entorno, lo cual permite una mejor interacción entre el medio de acción y las NPs (Ávalos et al., 2013). Las propiedades de las NPs son dependientes de la morfología y el tamaño que adoptan una vez terminada la síntesis y se considera que la más mínima variación en el sistema de reacción puede llegar a generar cambios significativos en sus características (Argüello, 2016).

Actualmente, las nanopartículas de plata se han convertido en una de las industrias de mayor crecimiento de la nanotecnología, debido a su fuerte actividad bactericida con amplio espectro en comparación con otros metales (Flores, 2014), su baja toxicidad, escasos efectos secundarios en humanos y tiene el potencial para ser utilizadas solas o en combinación con polímeros (Ayala, 2010).

El interés que se ha generado por las especies químicas de tamaño nanométrico es uno de los mayores trabajos de la investigación actualmente, debido a que las características que presentan han permitido encontrar nuevas alternativas para la aplicación de la plata como biomarcadores de células, recubrimientos para quemaduras y heridas e incluso control viral (Camacho, 2013).

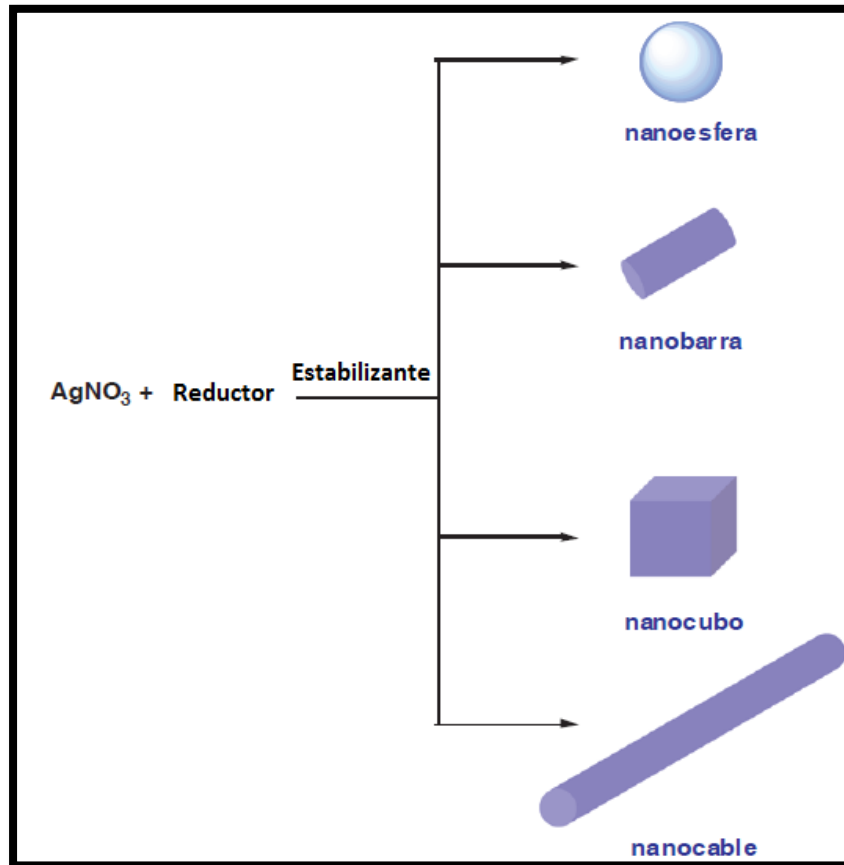
El desarrollo de las nanopartículas es un área de interés científico que ha generado un sin número de investigaciones, en las cuales se ha logrado combinar las NPs con diferentes compuestos y de esta manera generar mejores propiedades de las que tienen, ambos componentes por separado (Camacho, 2013).

### **2.1.1 Síntesis de nanopartículas de plata**

Los métodos de síntesis de nanopartículas pueden clasificarse en dos tipos: top-down o bottom-up, (Gómez, 2013). Top-down consiste en disminuir las dimensiones de los materiales a escala nanométrica a través de fragmentación o desgaste, mientras que bottom-up consiste en la construcción de nanopartículas a partir de átomos o moléculas en solución (Flores, 2014). La síntesis de nanopartículas en disolución coloidal es un método bottom-up que demanda el empleo de procesos que permitan un control sobre el tamaño, la forma, la dispersión y estabilidad de las nanopartículas (Gómez, 2013).

Para realizar la síntesis de nanopartículas se debe tomar en cuenta que es necesario el empleo de tres componentes importantes: el precursor metálico, el agente reductor y el agente estabilizante. En función del método de síntesis que se utiliza, se puede obtener

una gran variedad de formas de nanopartículas desde esferas hasta estructuras más complejas como los nanocables (Ayala, 2010).



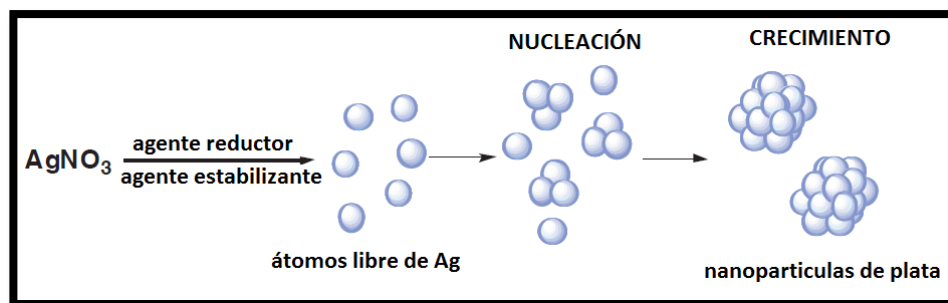
**Figura 1. Diferentes formas de Ag-NPs dependiendo del agente reductor y el agente estabilizante utilizados.**

Fuente: (Monge, 2009).

El mecanismo de formación de disoluciones coloidales a partir de reducción de iones de plata consiste en dos etapas que son: nucleación y crecimiento. La primera etapa comienza con la reducción de la sal metálica al átomo metálico cerovalente mediante choques. Los átomos actúan como centros de nucleación para la posterior formación de acumulaciones de átomos o clúster que se mantienen creciendo de acuerdo al suministro de átomos, para que de esta manera se forme la nanopartícula (Rodríguez, 2007).

El objetivo de la nucleación es llegar a la formación de núcleos, con un número mínimo de átomos, llamado núcleo crítico. El núcleo crítico es el clúster más pequeño

pero estable en las condiciones experimentales de síntesis, a partir del cual comienza el crecimiento. Cuando el clúster no llega al núcleo crítico, éste se puede dividir en sus átomos y formar nuevos racimos o ser parte del crecimiento de clústeres ya formados (Slistan, 2005).



**Figura 2. Mecanismo de formación de nanopartículas de plata a partir de la reducción química en disolución de la sal  $\text{AgNO}_3$ .**

Fuente: (Monge, 2009).

Para la formación de NPs por nucleación, es importante generar la sobresaturación de especies en crecimiento a través de reacciones químicas *in situ* que permitan la transformación de reactivos altamente solubles en otros menos solubles. Termodinámicamente, se puede afirmar que una disolución sobresaturada tiene una elevada energía libre de Gibbs (Viudez, 2011). La nucleación implica la unión de dos o más átomos hasta llegar a formar el núcleo crítico, a partir del cual el proceso de crecimiento va acompañado de una disminución de la energía libre de Gibbs, por lo tanto, la nucleación necesita una alta energía de activación, mientras que el crecimiento una baja energía de activación. La velocidad relativa de ambas etapas definen el tamaño y la forma de las NPs (Slistan, 2005; Monge, 2008).

A lo largo del tiempo, se han descrito un gran número de reacciones químicas que permiten la síntesis de NPs a través de la reducción de una sal de plata, que generalmente es nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), el cual puede ser reducido por una serie de compuestos como citrato de sodio, borohidruro de sodio, N-N-dimetilformamida (DMF), polioles, entre otros (Monge, 2008).



La síntesis química de NPs es ampliamente utilizada debido a sus ventajas, ya que permite producir materiales nanoestructurados de forma directa y generar cantidades importantes de producto final (Šileikaitė, 2009). Al mismo tiempo se puede ajustar los parámetros de reacción como temperatura, tiempo de reacción y concentración de reactivos para sintetizar tamaños uniformes a escala nanométrica y formas de distribución homogénea según se requiera (Šileikaitė, 2006).

Existe una gran variedad de métodos químicos para la síntesis de nanopartículas de plata, sin embargo los más utilizados son el método de Lee-Meisel y el método de Creighton (Monge, 2008). El primero se desarrolla a partir de una variación del método de Turkevich que es usado para la síntesis de nanopartículas de oro, usando ácido cloráurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) como precursor metálico y citrato de sodio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ) como agente reductor, sin embargo Lee-Meisel utiliza nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) para obtener nanopartículas de plata (Lee & Meisel, 1982). Por otro lado el método de Creighton se fundamenta en el uso de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) como agente reductor de la sal metálica  $\text{AgNO}_3$  (Creighton et al., 1979).

Por otra parte en la última década, la síntesis de nanopartículas por irradiación de microondas ha sido considerada como una de las mejores alternativas, ya que es una técnica bottom-up rápida, uniforme y efectiva, con respecto a métodos top-down como la molienda. Esta técnica permite la generación de un ambiente homogéneo para la nucleación y el crecimiento de Ag-NPs, debido a que el incremento rápido de la temperatura logra la aceleración de la velocidad de reducción de los iones metálicos, y además reduce las fluctuaciones de temperatura en el medio de reacción (Zanella, 2012; Sifontes et al., 2010).

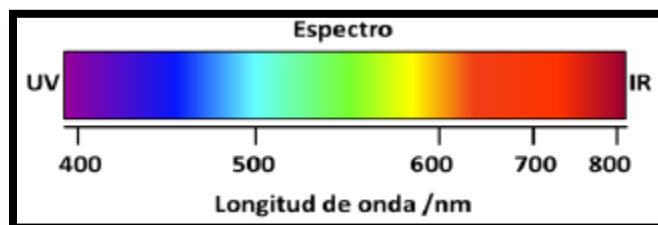
Para mantener la estabilidad de las nanopartículas, es necesaria la utilización de agentes estabilizantes, los que inmediatamente envuelven las NPs de moléculas estabilizadoras que se absorben en la superficie de la partícula y de esta manera previenen el crecimiento continuo y la aglomeración (Rodríguez, 2007).

## 2.1.2 Caracterización de Ag-NPs

### 2.1.2.1 Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-VIS)

La espectroscopía UV-VIS es una de las técnicas más utilizada para realizar análisis químico. La medición del rango de longitud de onda entre el visible y el ultravioleta permiten realizar la caracterización de materiales, debido a la información cualitativa y cuantitativa que refleja sobre diversas especies inorgánicas y orgánicas (Flores, 2014).

El rango de longitudes de onda ( $\lambda$ ) para luz ultravioleta que se utilizan en la práctica va desde 190 a 380 nm y el rango de longitudes de onda de luz visible se encuentra entre 400 y 800 nm. Por lo tanto, el principio de la espectroscopía UV-VIS involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible para un molécula en un rango de  $\lambda$  entre 190 y 800 nm (Flores, 2014).



**Figura 3. Esquema del espectro de luz visible.**

**Fuente: (Flores, 2014).**

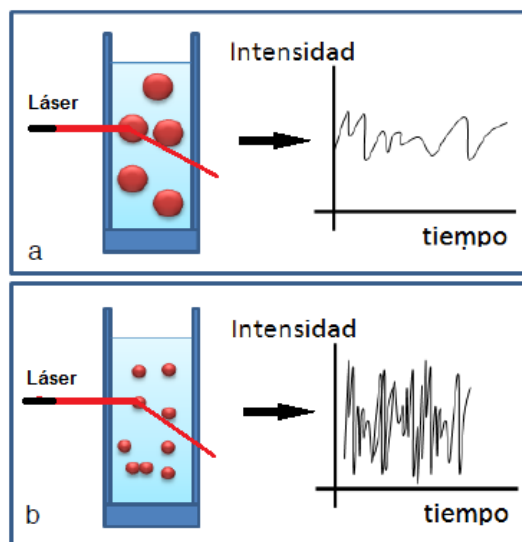
Esta técnica se utiliza para la caracterización de nanomateriales, ya que permite conocer si el proceso de síntesis ha dado como resultado la formación de nanopartículas. Los espectros de absorción de luz de nanopartículas metálicas se generan por las resonancias del plasmón superficial, las cuales son originadas por la radiación electromagnética que produce la oscilación de los electrones. La posición y forma del pico de absorción son dependientes de algunos factores como el tamaño, la forma y la dispersión de los tamaños de las NPs, además de las sustancias absorbidas en la superficie de estas partículas (Aguilar, 2009).

El pico de absorción se desplaza hacia la derecha (longitudes de onda mayores), a medida que el tamaño de las NPs aumenta. El pico de las Ag-NPs esféricas de menos

a 5 nm se ubica en 400 nm, mientras que Ag-NPs de 20 nm presentan un pico en 420 nm (Aguilar, 2009).

### 2.1.2.2 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz es una técnica físico-química usada para determinar la distribución del tamaño de las partículas en suspensión según la variación de la intensidad de dispersión en un periodo de tiempo. Estas fluctuaciones permiten medir los coeficientes de difusión de las partículas que se mueven bajo un régimen Browniano. El movimiento Browniano es el movimiento aleatorio de las partículas dado por el constante choque con las moléculas del solvente, como consecuencia de este movimiento las posiciones de las partículas difieren constantemente provocando variaciones en las condiciones de interferencia e intensidad de dispersión. Las partículas pequeñas se mueven rápidamente, lo que genera una aceleración en la variación de intensidad de dispersión, mientras que las partículas grandes se mueven lentamente, provocando variaciones más lentas (Cuadros et al., 2014; Guzmán, 2015).



**Figura 4. Esquema de fluctuaciones de intensidad según el tamaño de las partículas. a. Partículas grandes, b. Partículas pequeñas**

Fuente: (Guzmán, 2015).

El equipo de DLS calcula el radio hidrodinámico el cual incluye el diámetro de partícula junto con todas las estructuras que se encuentren en su superficie, que generalmente es la cobertura del estabilizante o iones absorbidos en la superficie.

### 2.1.2.3 Difracción de Rayos X (XRD)

Los Rayos X son una radiación electromagnética de longitud de onda corta ( $\lambda \sim 1,5\text{\AA}$ ) e invisible al ojo humano. La difracción de Rayos X es una de las técnicas de caracterización más potentes y es comúnmente utilizada para analizar la estructura de cristales (Domínguez, 2011; Mazuelas, 2002). Los rayos X interactúan con los electrones que forman la muestra, cuando la radiación alcanza a un electrón cargado, éste se convierte en una fuente de radiación electromagnética secundaria dispersada que forma un ángulo de incidencia (habitualmente  $2\theta$ ) que representa la intensidad de la radiación y que da lugar al difractograma (Domínguez, 2011). Cada difractograma es propio para cada cristal y esta técnica nos permite obtener información cualitativa como cuantitativa de materiales sólidos cristalinos como la estructura de los cristales y la posición de los átomos en la red del material analizado. La cristalinidad de la muestra se determina por la anchura del pico del difractograma, este disminuye cuando aumenta la cristalinidad (tamaño del cristal), (Domínguez, 2011).

La red cristalina no se deforma, por lo que el tamaño del cristal se puede estimar con la ecuación de Debye-Scherrer para muestras en polvo, la cual establece que el tamaño del cristal es inversamente proporcional al ancho medio del pico máximo que se genera en la difracción y al coseno del ángulo del mismo pico, conforme a:

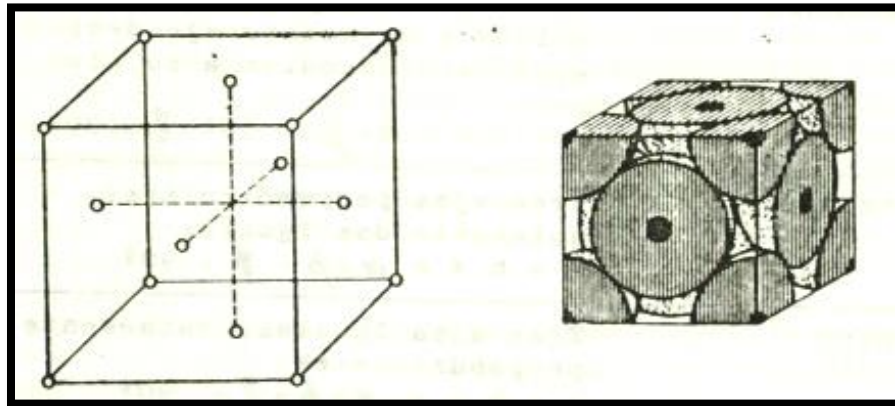
$$\beta = \frac{k\lambda}{A \cos \alpha_A}$$

donde,  $\beta$  es el tamaño del cristal,  $k$  es el factor de forma del cristal cuyo valor es 1,  $\lambda$  es la longitud de onda de radiación utilizada,  $\alpha_A$  es el ángulo correspondiente con el

pico máximo y  $A$  es el ancho a la altura media del pico de difracción considerado para el cálculo (Ramón, 2007).

Todos los metales en estado sólido poseen una estructura cristalina, que se debe a las posiciones relativamente fijas de los átomos, tomando una forma estable ordenándose a lo largo de las tres dimensiones, constituyendo una red tridimensional donde su unidad más pequeña que presenta la simetría del cristal se llama celdilla unitaria, y cada uno de los metales rígidos posee una específica (UANL, s.f.).

Por lo general, los metales forman cristales en sistemas cúbicos o hexagonales, formando redes tridimensionales como: cúbica centrada en el cuerpo (BCC), cúbica centrada en las caras (FCC) y hexagonal compacta (HC). La cristalografía de algunos metales como plata, aluminio, oro, platino, cobre y hierro gamma se presenta en forma red centrada en las caras, por lo que su celdilla unitaria está conformada de 4 átomos como se encuentra en la Figura 5 (UANL, s.f.).



**Figura 5. Estructura cristalina cúbica centrada en las caras FCC, representación de la celdilla unitaria.**

**Fuente: (Callister, 2007).**

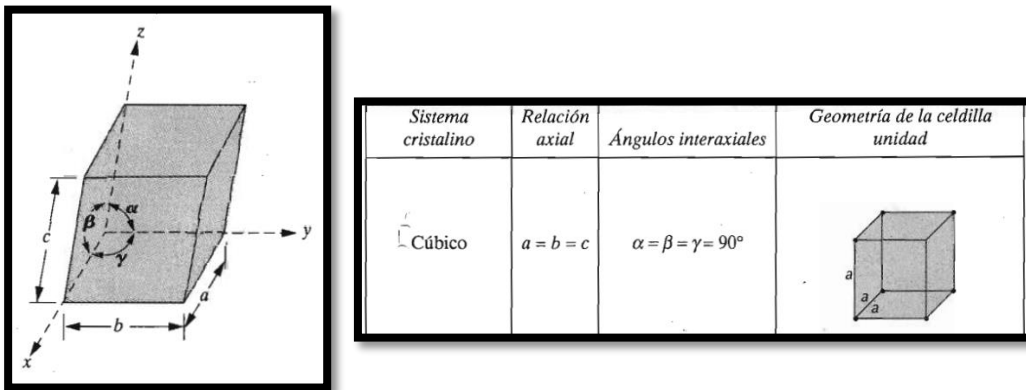
La geometría de la estructura cristalina FCC, indica la ubicación de los átomos en los vértices del cubo y en los centros de todas las caras del cubo. La longitud entre los centros

de dos átomos del cubo se denomina arista y se encuentra relacionado con el radio atómico mediante la siguiente ecuación:

$$a = 2R\sqrt{2}$$

donde  $a$  es la arista y  $R$  el radio atómico (Callister, 2007).

En los planos cristalográficos se encuentran ordenados los átomos según la forma del cristal (UANL, s.f.). Las direcciones cristalográficas se determinan por un sistema de coordenadas, cuyos ejes son  $x$ ,  $y$  y  $z$ , las longitudes de las aristas  $a$ ,  $b$  y  $c$  y los ángulos interaxiales ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), tomando como referencia un vértice de la celdilla unitaria como indica la Figura 6, considerando que el sistema cristalino de la plata es cúbico (Callister, 2007).

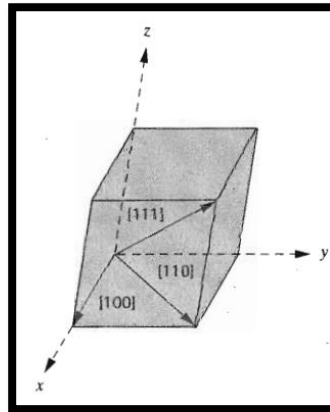


**Figura 6. Celdilla unitaria de un sistema cristalino cúbico, con los ejes de coordenadas  $x$ ,  $y$  y  $z$ , longitudes de aristas  $a$ ,  $b$  y  $c$  y ángulos interaxiales ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ).**

Fuente: (Callister, 2007).

Existe relaciones entre el conjunto de planos cristalográficos con los ejes de las celdillas unitarias, denominadas Índices de Miller  $h$ ,  $k$  y  $l$  (UANL, s.f.; Callister, 2007), y

como se muestra en la Figura 7 gracias a éstos se puede escribir las direcciones únicas [100], [110] y [111] para un sistema cristalino cúbico, así como otras direcciones de estructuras cristalinas particulares (Callister, 2007).



**Figura 7. Direcciones [100], [110] y [111] en una celda unitaria.**

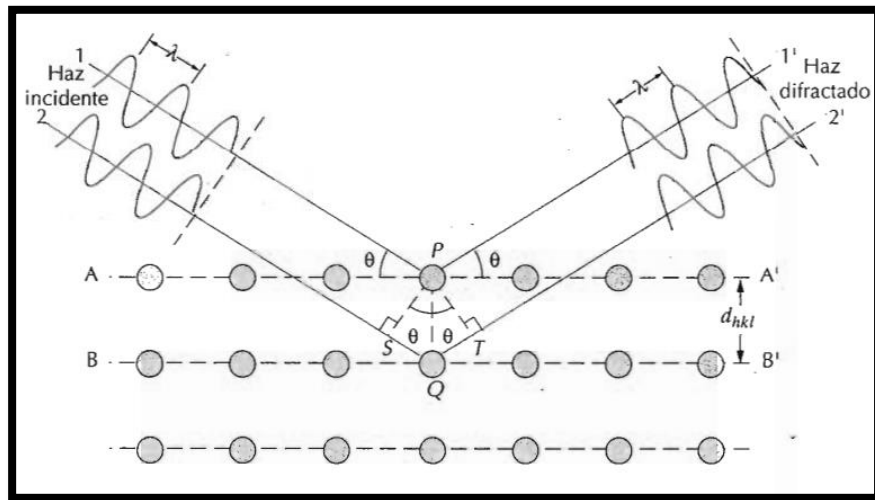
**Fuente: (Callister, 2007).**

XRD se ajusta a la ley de Bragg que permite estudiar la difracción de los rayos X sobre un cristal, mediante los ángulos que se forman por la dirección de los rayos difractados, determinando la estructura cristalina del material de análisis (Callister, 2007). La ley de Bragg se ajusta a la siguiente ecuación:

$$n\lambda = \overline{SQ} + \overline{QT} \quad o$$

$$n\lambda = d_{hkl}\text{sen}\theta + d_{hkl}\text{sen}\theta = 2d_{hkl}\text{sen}\theta$$

donde n es el orden de difracción, que puede ser un número entero siempre que  $\theta$  no exceda de  $1$ ,  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X,  $\theta$  es el ángulo entre los rayos incidentes S y los rayos reflejados T, y d es la distancia entre los planos cristalográficos A-A' y B-B' de los átomos P y Q ubicados en paralelo, como indica la Figura 8 (Callister, 2007).



**Figura 8. Difracción de rayos X por planos cristalográficos (A-A' y B-B').**

**Fuente: (Callister, 2007).**

Tomando en consideración que la magnitud de la distancia interplanar de átomos contiguos y paralelos  $d_{hkl}$  está función de los índices de Miller, y de la arista que es un parámetro de red, se puede determinar la siguiente ecuación que se ajusta a la ley de Bragg para estructuras cristalinas de simetría cúbica (Callister, 2007):

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}}$$

Con la ecuación anterior y demás parámetros descritos, el XRD calcula los ángulos que indican los conjuntos de planos de la estructura cristalina FCC, que corresponde a la plata y lo plasma en los difractogramas (Callister, 2007).



#### 2.1.2.4 Microscopía Electrónica de transmisión (TEM)

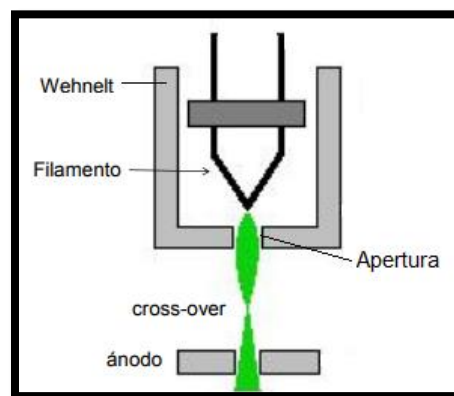
El microscopio electrónico de transmisión (TEM), está formado por tres componentes principales, lo cuales son: una columna óptica electrónica, un sistema de vacío y un sistema electrónico de control (Lux, s.f.).

Este microscopio es llamado de transmisión debido a que emite un haz de electrones que atraviesa la muestra observada para su posterior proyección sobre una pantalla fluorescente que se localiza al final de la trayectoria del flujo de electrones (Lux, s.f.).

Lo electrones necesitan un espacio con vacío para poder moverse a través del sistema de lentes electromagnéticas, el sistema óptico está compuesto por una lente condensadora, una lente del objetivo, una lente intermedia y una lente proyectiva (Lux, s.f.).

El microscopio cuenta con un cañón de electrones que genera la emisión del haz originada por un filamento de tungsteno (cátodo con una tensión de 50000 a 60000 voltios), que tiene forma de horquilla; dicho filamento se encuentra rodeado por una pantalla cilíndrica llamada cilindro de Wehnelt y está polarizada negativamente (con respecto al filamento) (Reimer, 1984).

La apertura circular que se encuentra debajo del filamento (Figura 9), y permite la formación de una imagen que se conoce como cross-over, debido a la polarización negativa y a la apertura que actúa como una lente electrostática produciendo una imagen de diámetro pequeño en un punto del cilindro de Wehnelt (Lux, s.f.; Williams & Carter, 2009).

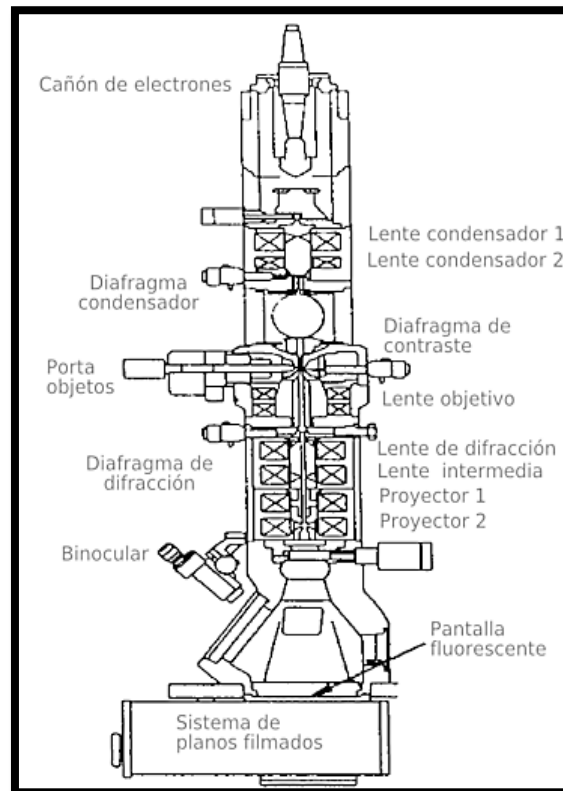


**Figura 9. Cañón de electrones del microscopio electrónico**

Fuente: (STTI, 2012).

Todos los lentes, con excepción de la proyectiva, poseen un diafragma que evita la dispersión de los haces luminosos que se desplazan en el vacío y además permite ajustar la luminosidad que depende del diámetro del diafragma y su localización dentro de la columna (Lux, s.f.). En la parte inferior de la columna se encuentra la pantalla fluorescente, la cual está recubierta de un material que permite ver la muestra como si fuera su sombra reflejada sobre una superficie; bajo dicha pantalla se encuentra una placa fotográfica, la que registra la imagen para ser posteriormente revelada, impresa e interpretada (Lux, s.f.; Williams & Carter, 2009).

Este microscopio permite la formación de una imagen en dos dimensiones con una alta resolución (de 0.1 nm o menos), y además puede proporcionar el patrón de difracción de los electrones de la muestra lo que ayuda a la identificación de la estructura. Las muestras que desean ser observadas generalmente deben poseer un espesor menor a 200 nm (Aguilar, 2009; Flores, 2014).



**Figura 10. Microscopio electrónico de transmisión y sus partes**

Fuente: (STTI, 2012).

### 2.1.2.5 Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido (STEM)

El microscopio electrónico de transmisión y barrido (STEM) se ha desarrollado a partir de una combinación de características de dos microscopios, el TEM y microscopio electrónico de barrido (SEM) (Tanaka, 2017). Dichas características que están incluidas son:

#### **TEM**

1. La imagen se genera por la transmisión de electrones a través de la muestra.
2. Para la formación de la imagen se utilizan lentes convexos
3. Utiliza una dispersión elástica de electrones
4. Produce un imagen única en dos dimensiones
5. Es necesaria una muestra muy delgada para que la transmisión de electrones pueda generarse.

#### **SEM**

1. La imagen es barrida o escaneada por una sonda de electrones, electrones secundarios son emitidos de la superficie de la estructura de la muestra para obtener así la imagen.
2. La sonda de electrones posee una energía menor a 50 eV.
3. Muestras gruesas son observadas mediante un mecanismo de reflexión.

En el STEM, debido al haz de electrones transmitidos, se puede obtener una imagen de campo claro similares a las obtenidas en TEM mediante la reciprocidad del teorema de óptica en el cual la fuente de electrones y el detector pueden arreglarse inversamente para de ésta manera obtener la misma intensidad en la imagen (Tanaka, 2017). Además el contraste de difracción de las imágenes y la estructura de la imagen obtenida en TEM es muy similar en STEM (William & Carter, 2009; Tanaka, 2017).

El campo oscuro de STEM adopta un contraste de amplitud de los electrones difractados para obtener una función del ángulo difractado y el azimut utilizando detectores localizados en el espacio recíproco de  $(\mu, \nu)$ , además la intensidad de la imagen está

directamente relacionada con la sección de barrido o escaneo cruzado de átomos y columnas atómicas (Tanaka, 2017).

STEM presenta una serie de ventajas, esto se debe a que usa varios tipos de señales emitidas por la muestra, como la dispersión inelástica de electrones, los electrones secundarios, características de Rayos-X, cátodo de luminiscencia y la corriente del haz de electrones, para la obtención de imágenes en dos dimensiones con alta resolución (Tanaka, 2017).

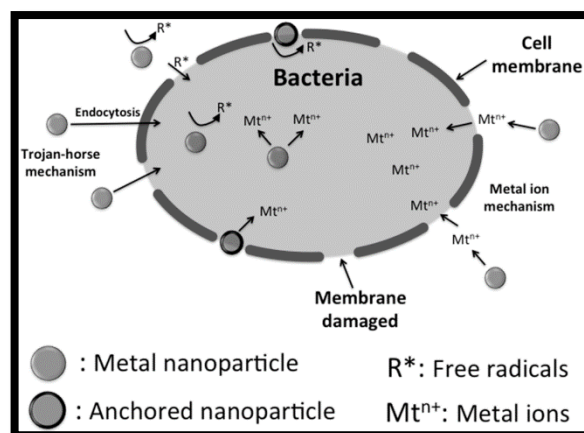
### **2.1.3 Mecanismo antibacterial de las Ag-NPs**

El mecanismo antibacterial de las Ag-NPs aún no está claramente descrito, pero está considerado como un proceso multi-factor, multi-ruta y multi-blanco (Hong et al., 2016). Existen algunas teorías mediante las cuales se puede explicar el mecanismo de acción antibacterial de las Ag-NPs, una de ellas sugiere que las Ag-NPs, son capaces de anclarse en la membrana celular de las bacterias e interaccionan con sus moléculas causando daño en la integridad y permeabilidad de la membrana logrando fugas de los contenidos intracelulares y posteriormente la muerte celular (Prabhu et al., 2012). Otra teoría menciona que la formación de radicales libres por las Ag-NPs es uno de los responsables de la muerte celular, ya algunos estudios realizados, indican la formación de dichos radicales cuando las nanopartículas están en contacto con las bacterias. Los radicales libres pueden causar daños en la membrana celular, provocando que se haga porosa y llevándola a la muerte (Prabhu et al., 2012).

La aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas como efecto secundario debido a los cambios en la membrana y en la actividad metabólica celular por las Ag-NPs, se considera otro mecanismo para la muerte de las células, ya que los ROS no solo causan daños en la membrana celular sino que reaccionan con proteínas funcionales y con el ADN, lo que interfiere con su duplicación y el metabolismo (Hong et al., 2016). Otra propuesta, es la liberación de iones de plata de las nanopartículas, los cuales interaccionan con los grupos tiol de enzimas vitales, inactivándolas e inhibiendo algunas funciones, lo que

causa daños en la célula. Una última teoría sugiere que existe una tendencia natural de una reacción ácido-base, ya que las células están formadas principalmente por fósforo y azufre, que son consideradas como bases débiles, mientras que la plata está considerada como un ácido débil, provocando la reacción y generando la muerte celular (Prabhu et al., 2012).

El mecanismo de acción de las Ag-NPs es complejo, debido a que las características físicas y químicas pueden influenciar su actividad antibacterial, éstas características incluyen el tamaño, la forma, el recubrimiento y la carga superficial. En relación al tamaño, mientras más pequeñas sean las NPs, mejor es su poder bactericida. El recubrimiento superficial puede reducir la liberación de iones de plata, lo que controla su efecto antibacterial. La forma de las Ag-NPs también influye, ya que se ha podido demostrar que las NPs triangulares truncadas presentan el mayor poder antibacterial, seguidas de las nanoesferas y posteriormente los nanobastones (Hong et al., 2016).



**Figura 11. Mecanismo de actividad bactericida de las Ag-NPs en bacterias**

**Fuente: (Palza, 2015).**

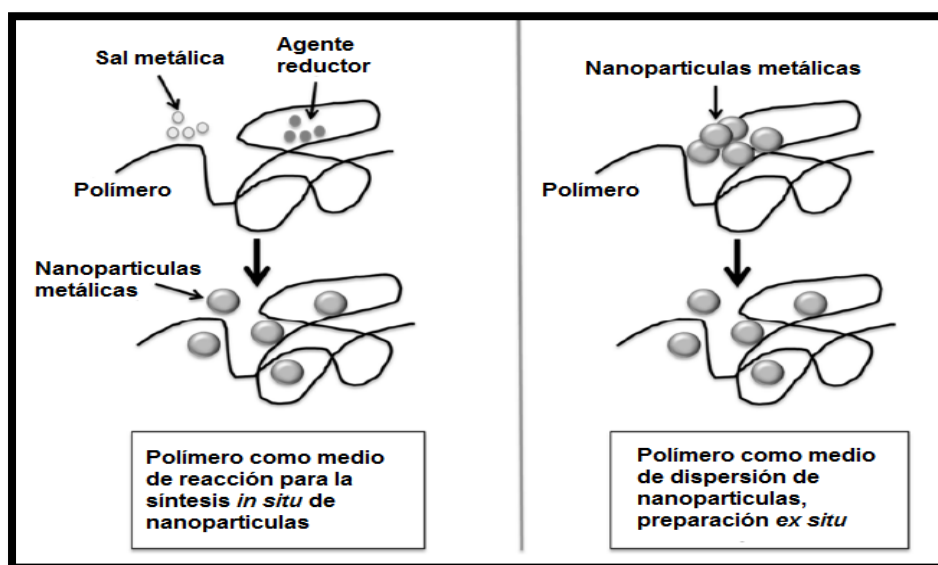
## 2.2 COMPÓSITOS POLIMÉRICOS

Los compósitos son materiales naturales o sintéticos que están formados por dos o más componentes, los cuales la mayoría de veces difieren en su composición química y/o física, y que como objetivo se unen para generar un nuevo material con mejores propiedades

que las que tendría cada uno por separado (Forestieri, 2013). En su mayoría los materiales compósitos están fabricados a partir de dos elementos: el material base llamado matriz, y una carga que está dispersa en dicho material. La matriz es conocida como la fase continua y la carga como la fase dispersa, ambas tienen una interface que las separa, pero a pesar de ello tienen una gran capacidad de adhesión. La matriz tiene el propósito de proteger a la carga del ambiente externo, evitando su deterioro; mientras que la rigidez y resistencia están dadas por la carga ya que está formada de partículas. Las propiedades del compósito dependen de las características de la carga (cantidad, tamaño, forma y distribución), y de las características de la matriz (Fontoura, 2009).

La ciencia de los materiales procura la interacción de nuevas tecnologías en función del avance de los materiales y su perfeccionamiento, por lo que la introducción de la nanotecnología encaja perfectamente para el desarrollo de nuevos materiales con propiedades superiores. Los nanocompósitos son materiales en los cuales su fase dispersa está constituida por partículas en la escala nanométrica, y las características que proporcionan son totalmente diferentes en comparación con los compósitos poliméricos convencionales. Los nanocompósitos ofrecen una mejora en las propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas, térmicas y médicas, en comparación con los microcompósitos, ya que los primeros precisan de poco volumen de carga para alterar significativamente las propiedades (Fontoura, 2009).

La preparación de los compósitos poliméricos con cargas metálicas está dividida en dos enfoques: el primero, *in situ* en el cual se utiliza la matriz polimérica como medio de reacción; y el segundo, *ex situ* en donde la nanopartícula se sintetiza antes de ser incorporada a la matriz polimérica como se muestra en la Figura 12. La preparación *in situ* se utiliza principalmente para nanocompósitos de hidrogel, en cual se mejora la estabilidad y la dispersión del metal. La preparación *ex situ* se utiliza para compuestos termoplásticos, donde la matriz mejora la dispersión de las nanopartículas (Palza, 2015).



**Figura 12. Preparación *in situ* y *ex situ* de compósitos poliméricos con nanopartículas metálicas**

Fuente: (Palza, 2015).

Los nanocompósitos emergen como una alternativa para modificar las propiedades eléctricas, ópticas y bactericidas de las NPs. En este contexto, la industria ha visto la necesidad de combatir a las bacterias para evitar su proliferación principalmente en hospitales y en la industria alimenticia. Los polímeros antimicrobianos son altamente demandados como una estrategia para evitar posibles infecciones en los consumidores, de esta forma la adición directa del agente antibacteriano en los polímeros ha recibido considerable atención, ya que la incorporación de nanopartículas en matrices de polímeros podría ser la vía más rápida para tomar ventaja comercial y mejorar la calidad de vida de los humanos (Palza, 2015).

### 2.2.1 Compósitos poliméricos con Ag-NPs

Las Ag-NPs son la carga más utilizada, cuando se trata obtener una acción antibacterial ya que la plata presenta una actividad antibacterial contra 650 tipos de bacterias (Li et al., 2011). Se ha desarrollado una extensa investigación de compósitos de hidrogel con nanopartículas de plata, donde se ha obtenido óptimos resultados en inhibición bacteriana.

Además, las dispersiones de Ag-NPs en poliéster, lana o algodón, ha generado la capacidad de obtener tejidos antibacteriales para aplicaciones biomédicas (Palza, 2015).

Existen una gran cantidad de polímeros que se han utilizado como matriz de NPs, en ambos tipos de preparación, como la celulosa, el polivinil alcohol (PVA), el quitosano, poli (etilenglicol-dimetacrilato-co-acrilonitrilo), entre otros, con excelentes resultados en su acción antibacterial y fungicida, en este contexto podemos evidenciar que la actividad de las Ag-NPs se mantiene a pesar de estar dispersas en polímeros (Palza, 2015).

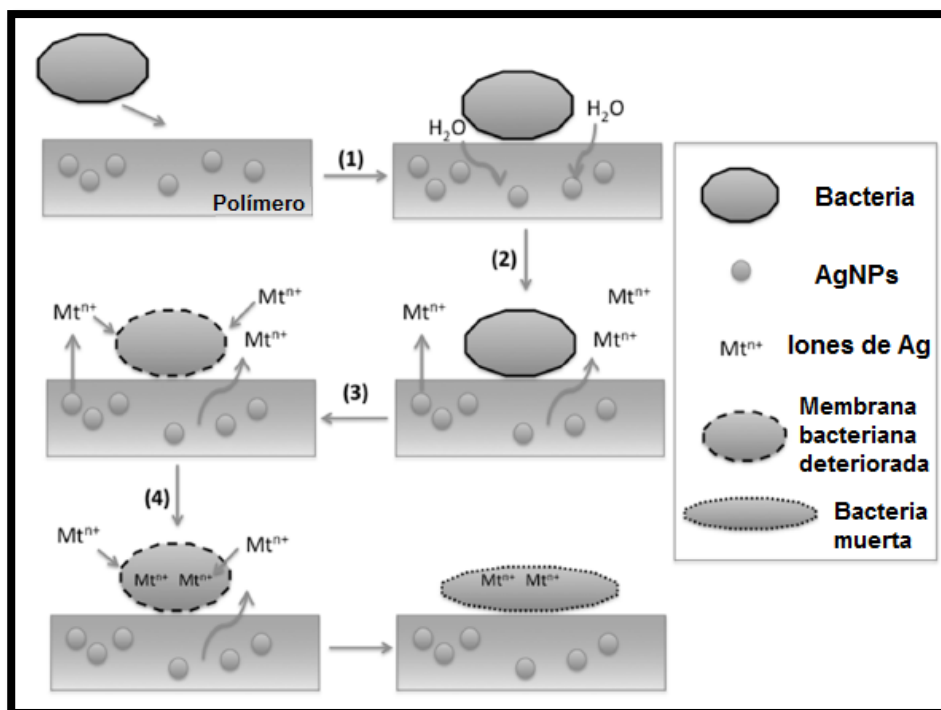
### **2.2.2 Mecanismo de acción antimicrobiana de los compósitos poliméricos con Ag-NPs**

Los polímeros antibacterianos han sido ampliamente estudiados últimamente, ya que la incorporación de material biocida (Ag-NPs) en polímeros ha presentado una importante acción antibacteriana (Beltrán, 2013). Los mecanismos de acción de dichos compósitos son tan similares como los mecanismos propios del agente, pero la ruta exacta dependerá de las características específicas del polímero utilizado, ya sea hidrogel o termoplásticos (Palza 2015). Varios estudios realizados en compósitos con polímeros termoplásticos, han podido confirmar la hipótesis de la liberación de iones de plata de las nanopartículas mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), siendo este el principal mecanismo mediante el cual se presenta la acción antibacterial. Sin embargo, cuando nos referimos a hidrogeles, el principal mecanismo que se ha podido señalar es la liberación de las partículas (Palza, 2015).

Los mecanismos de nanocompósitos a base de polímeros termoplásticos o polímeros duros, representan el sistema de acción más complejo. Mediante estudios realizados con XPS se ha podido notar que las NPs que se encuentran presentes, no están en la superficie del polímero, sino incrustadas dentro del él. En este contexto, el único mecanismo adecuado para la liberación de iones de plata, es la corrosión del metal. La corrosión es un fenómeno de óxido-reducción, en el cual se ven involucrados: el metal en cuestión, el agua y el entorno. La corrosión del metal ocurre debido a la difusión de moléculas de agua con oxígeno disuelto (procedentes del medio bacteriano), en la masa del polímero; incluso las matrices no-polares



permiten la difusión de agua a través de él. Una vez que el proceso de corrosión ha iniciado, la liberación de iones de plata comienza. Los iones se difunden por la matriz polimérica hasta liberarse y llegar a la célula bacteriana (Palza, 2015).



**Figura 13. Mecanismo antibacteriano de los compósitos poliméricos con Ag-NPs en matrices termoplásticas.**

Fuente: (Palza, 2015).

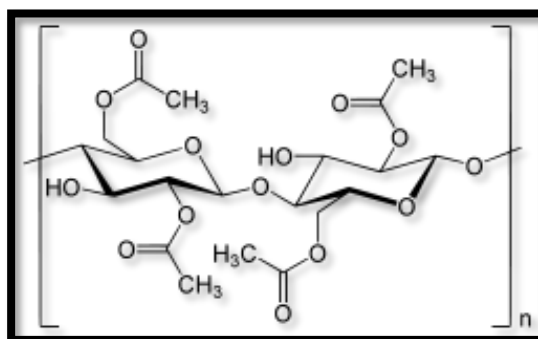
En los hidrogeles, el mecanismo bactericida es la liberación de las NPs de la matriz, debido a que los espacios entre sus redes son mucho mayores en comparación con los termoplásticos; además, la difusión de agua dentro y fuera de la matriz puede ser evitada debido a la naturaleza del hidrogel. Por lo tanto, los mecanismos de los hidrogeles se asemejan a los mecanismos propios de las nanopartículas puras (Palza, 2015).

### 2.3 ANÁLISIS ECOTÓXICO DEL SOPORTE DE IMPRESIÓN

Actualmente las investigaciones están encaminadas a la fabricación de productos que sean menos agresivos y contaminantes con el medio ambiente, por lo que la producción de materiales biodegradables es una tendencia actual (Armelin, 2002).

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza, debido a lo cual, sus derivados han sido investigados como potenciales materiales biodegradables. La celulosa como tal no es procesada con facilidad, pero las modificaciones químicas en su estructura altamente ordenada pueden convertirla en un material biodegradable; el acetato de celulosa (AC), es un ejemplo de un polímero natural modificado que se ha estudiado como biomaterial (Armelin, 2002).

El AC se prepara generalmente a partir de la celulosa natural, la cual se obtiene de fuentes maderables o de las fibras cortas de algodón ya que presentan un alto contenido de  $\alpha$ -celulosa (95% en peso o superior), mediante una reacción de acetilación con ácido acético (Pérez et al., 2013).



**Figura 14. Estructura química del acetato de celulosa**

**Fuente:** (Armelin, 2002).

El AC, es un éster de ácido acético que presenta una amplia gama de propiedades y aplicaciones. Es comúnmente utilizado como base para las películas fotográficas, realización de juguetes, filtros de cigarrillos, marcos de gafas, producción de membranas de separación, mango de herramientas, entre otros, dependiendo del grado de sustitución de grupos hidroxilo en la unidad monomérica de la glucosa (Pérez et al., 2013).

Los ésteres de celulosa están siendo revaluados como una fuente natural de termoplásticos biodegradables y generar biomateriales con ellos, ya que mediante estudios realizados se ha podido demostrar que pueden ser biodegradables y generar productos ambientalmente seguros (Pérez et al., 2013).

Las sustancias químicas que van a ser empleadas en alguna producción para su posterior uso, como el AC, deben ser evaluados previamente mediante bioensayos para confirmar la posible toxicidad que pueda generar sobre un ecosistema. Los efectos tóxicos que se evalúan generalmente son mortalidad, inmovilidad, alteración de comportamiento, entre otros; los cuales nos permiten observar si la sustancia química utilizada genera o no impactos ambientales (Bartolomé & Sánchez, 2007).

Uno de los organismos utilizados como biosensores de toxicidad es la *Artemia franciscana*, la cual es uno de los biomodelos que más se ha utilizado en etapas preliminares de investigaciones de nuevos productos desde 1982 (Sánchez & Neira, 2005).

### **2.3.1 *Artemia franciscana***

*Artemia franciscana* es un crustáceo pequeño que vive en ambientes acuáticos de elevada salinidad. Es un elemento fundamental en el conjunto del zooplacton, principalmente en ambientes de estuario, siendo un importante factor dentro de la cadena trófica. La *Artemia franciscana* se considera propia de agua salobres continentales y se encuentra en América del Norte, del Centro y Sudamérica. (Bartolomé & Sánchez, 2007).

**Tabla 1.****Taxonomía de *Artemia Franciscana***

<b>Taxonomía de <i>Artemia franciscana</i></b>	
<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Artrópoda
<b>Clase</b>	Crustacea
<b>Subclase</b>	Branquiopoda
<b>Orden</b>	Anostraca
<b>Familia</b>	Anostraca
<b>Género</b>	Artemia
<b>Especie</b>	<i>A. franciscana</i>

Fuente: (FAO, 1986).

Adaptada por Barrera & Guerrero, 2017

Distintos autores, como Persoone, Van de Vell, Van Steetegem y Nayer B (1989), han podido demostrar que dicho organismo se comporta como un biosensor de contaminación acuática en ambientes marinos, y como resultado se ha convertido en un elemento fundamental para los estudios de toxicidad. *Artemia franciscana* es un organismo que pueden adquirirse como huevos encapsulados, los cuales requieren de una posterior rehidratación en el laboratorio, y de esta manera se puede obtener poblaciones homogéneas de individuos muy capaces de ser utilizados en estudios de toxicidad, además de ser una alternativa poco costosa, fácil de cultivar, sencilla y rápida en comparación con peces (Bartolomé et al., 2007).

Las artemias son organismos de gran movilidad, poseen un aspecto translúcido y brillante, su color puede estar entre casi transparente hasta rojo intenso, lo que depende de la alimentación suministrada y el grado de oxigenación del agua en donde se encuentre. Son visibles y por ello fáciles de atrapar para realizar los ensayos de toxicidad (López, 1997).

*Artemia franciscana* ha sido utilizada en numerosos ensayos de toxicidad para medicamentos (Castro et al., 2009), contaminantes de agua como hidrocarburos (Rojo et al.,

2012), productos de limpieza (Bartolomé et al., 2007), algunos compuestos y elementos químicos (Hadjispyrou et al., 2001; Blust et al., 1991) e incluso para evidenciar la toxicidad de nanopartículas (Bergami et al., 2016).

El cultivo de artemias presenta varios parámetros críticos para obtener una óptima eclosión de sus huevos:

- **Temperatura:** la temperatura debe oscilar entre 25 y 30 °C ya que la eclosión por debajo de 25 °C se considera extremadamente lenta y por encima de los 30 °C el metabolismo de los quistes se detiene de forma irreversible (FAO, 1986).
- **Salinidad y pH:** el agua de mar es usada para su óptima eclosión, sin embargo la salinidad puede variar desde 35 hasta 170 g/L dependiendo de las condiciones de cada laboratorio (Castro et al., 2009). En relación al pH, se considera un rango recomendable de 8 a 10 para su eclosión (FAO, 1986).
- **Oxigenación:** se considera adecuada una oxigenación de 2 mg/L hasta la saturación de oxígeno para una óptima eclosión (FAO, 1986).
- **Iluminación:** la iluminación en las primeras horas de hidratación de los quistes, es esencial para lograr una máxima eclosión, por lo tanto es recomendable mantener una iluminación entre 1000 y 2000 lux en la superficie del agua (FAO, 1986).

El ciclo de vida de las artemias comienza con la eclosión del huevo que ha sido hidratado en el laboratorio, el primer estado larvario se conoce como nauplios, el cual se desarrolla dentro de 24 a 36 horas después de eclosión del huevo y miden de 300 a 400 micras. Las artemias adultas pueden llegar a medir entre 1 y 1.5 centímetros de largo (López, 1997).

La evaluación ecotóxica con *Artemia franciscana* consiste en la exposición de nauplios a la muestra durante 24 y/o 48 horas a diferentes concentraciones, y el análisis se realiza mediante la mortalidad de individuos en dicho periodo de exposición (Pimentel et al., 2010).



**Figura 15. *Artemia franciscana*, A. nauplio (48 horas); B. Artemia adulta.**

**Fuente: (Sánchez & Neira, 2005).**

## **2.4 IMPRESIÓN DE FLUIDOS**

El desarrollo de nuevos dispositivos con microfluídica se ha incrementado desde la década de 1980, pero actualmente las nuevas tecnologías de impresión DoD, específicamente DMP™ ha generado gran interés para el desarrollo de una serie de dispositivos con diferentes funciones (Fernández, 2011). DMP™ permiten el desenvolvimiento de productos innovadores en el campo de la nanotecnología mediante la microfluídica, para poder aprovechar las propiedades de materiales micro y nanométricos (Fernández, 2011).

La microfluídica es la ciencia que estudia los sistemas que permiten manipular cantidades muy pequeñas de fluido ( $10^{-9}$  a  $10^{-18}$  litros), estos sistemas emplean canales desde pocas a cientos de micras (Lapizco, 2008). La microfluídica es una ciencia multidisciplinar que engloba la Química, Física, Biología, Ciencias de los materiales, Biotecnología, Mecánica, entre otros; para la generación de dispositivos que contribuyan al mejoramiento de la calidad de vida de los humanos (Fernández, 2011).

Esta ciencia presenta una serie de ventajas como el bajo consumo de muestra y reactivos, una alta resolución y sensibilidad, bajo costo y tiempos de análisis cortos. Los sistemas de microfluídica poseen dos atributos que permiten el mejor control de los procesos: el pequeño tamaño y el flujo laminar. Los microcanales presentan un número de Reynolds

muy pequeño (generalmente menor a 100), lo que evita las turbulencias y permite un mejor manejo del fluido (Lapizco, 2008).

La impresión de fluidos requiere un método de preparación que permita controlar la generación de los materiales en escala nanométrica, lo cual se realiza gracias a efectos cuánticos asociados a las interacciones entre átomos, si no se mantiene este control en los materiales utilizados en la impresión así como en los parámetros recomendados, se puede generar cambios en los fluidos de interés (Souza, 2015). Para evitar estos daños se recomiendan los siguientes parámetros de impresión que garantizan la calidad y la reproductividad de la impresión:

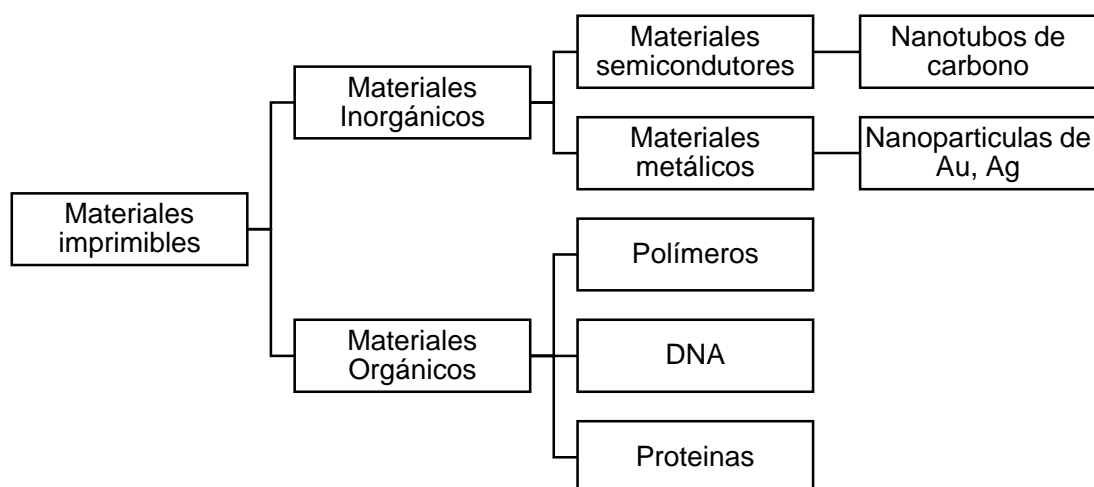
**Tabla 2.**  
**Parámetros recomendados para la impresión**

<b>Parámetro</b>	<b>Medida</b>
<b>Viscosidad</b>	0.01 – 0.012 Pa•s la temperatura de goteo
<b>Tensión superficial</b>	0.00028 – 0.00033 Newton a temperatura de goteo
<b>Baja volatilidad</b>	Puntos de ebullición sobre 100 °C
<b>Densidad</b>	Gravedad específica mayor a 1
<b>Gases disueltos</b>	Los fluidos no pueden tener altas concentraciones de gases disueltos
<b>Tamaño particular</b>	Partículas menores que 0.2 $\mu\text{m}$
<b>Acidez y alcalinidad</b>	Valores de pH entre 4 - 9

Fuente: (Souza, 2015).

Otros parámetros importantes para una óptima impresión son la solubilidad, la densidad y el punto de ebullición de los materiales y los solventes de impresión; además del volumen de la gota formada y la adherencia de esta al sustrato (Souza, 2015).

La tecnología de impresión DoD ha tenido muchos avances en la ciencia, debido a la gran variedad de materiales que pueden ser impresos para generar dispositivos con una gran variedad de aplicaciones (Souza, 2015).



**Figura 16. Ejemplos de materiales imprimibles mediante impresoras DoD**

**Fuente: (Souza, 2015).**

Actualmente, uno de los campos de investigación que más se encuentra en desarrollo es el uso de nanopartículas en nuevos dispositivos. Los materiales en nanoescala presentan un sin número de aplicaciones e innovaciones, involucrando nuevos materiales para varias industria como la textil y alimenticia con prendas y empaques con Ag-NPs por su función antibacterial y tecnologías de sensores como nanotubos de carbono para dosificar la radiación UV (López et al., 2016).

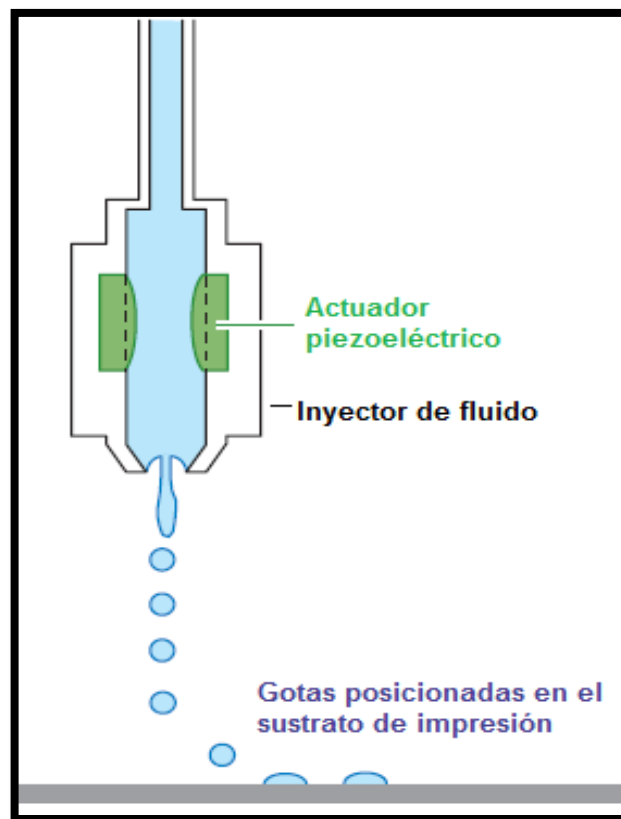
La impresión de fluidos que contienen nanopartículas necesitan tener algunas características como una buena dispersión y una buena solubilidad de NPs y compósitos poliméricos en el fluido de impresión, para lo cual se realiza un análisis de termodinámica, de solubilidad y de la interacción polímero-solvente, con la finalidad de determinar el mejor solvente para la impresión y de esta manera poder cumplir con los parámetros requeridos por la impresora (Souza, 2015).

En el mecanismo DoD el control de los parámetros físico-químicos del fluido es muy importante para la obtención de buenos goteos en el sustrato de impresión lo cual garantiza la presión, reproducibilidad y estabilidad del patrón de impresión (Souza, 2015). Además de los parámetros detallados con anterioridad, es importante definir el diferencial del potencial eléctrico (DPE) en los eyectores de impresión y conductividad eléctrica del fluido, que



afectará directamente a la frecuencia máxima y a los algoritmos de control como bases y decaimientos en la curva de calibración, que se construye para poder generar el goteo requerido y obtener la impresión deseada (Souza, 2015).

La formación de las gotas en el mecanismo DoD se genera mediante un pulso eléctrico suministrado a un actuador de tipo piezoeléctrico que transforma la energía eléctrica en energía mecánica, a través de cristales piezoeléctricos, como el cuarzo. El paso de corriente eléctrica provoca la expansión del cristal, causando el pulso de presión en la cavidad de eyector, lo que genera la expulsión del fluido en forma de goteo sin alterar las características del fluido, lo que no ocurriría si se utilizara un actuador térmico, que puede aglomerar y precipitar las nanopartículas presentes en fluido (Souza, 2015).



**Figura 17. Actuador piezoeléctrico del inyector de fluido de la impresora**

Fuente: (Souza, 2015).

El tamaño de las gotas dependerá del tamaño del eyector de impresión, pero es posible obtener un control de ajuste fino de goteo, además de un control de la velocidad de inyección de goteo por el impulso eléctrico administrado para formar las gotas. La expulsión inicial del fluido forma una columna líquida, la cual a medida que se extiende y actúa la tensión superficial, se produce la ruptura de la columna y la posterior formación de la gota como se muestra en la Figura 17.

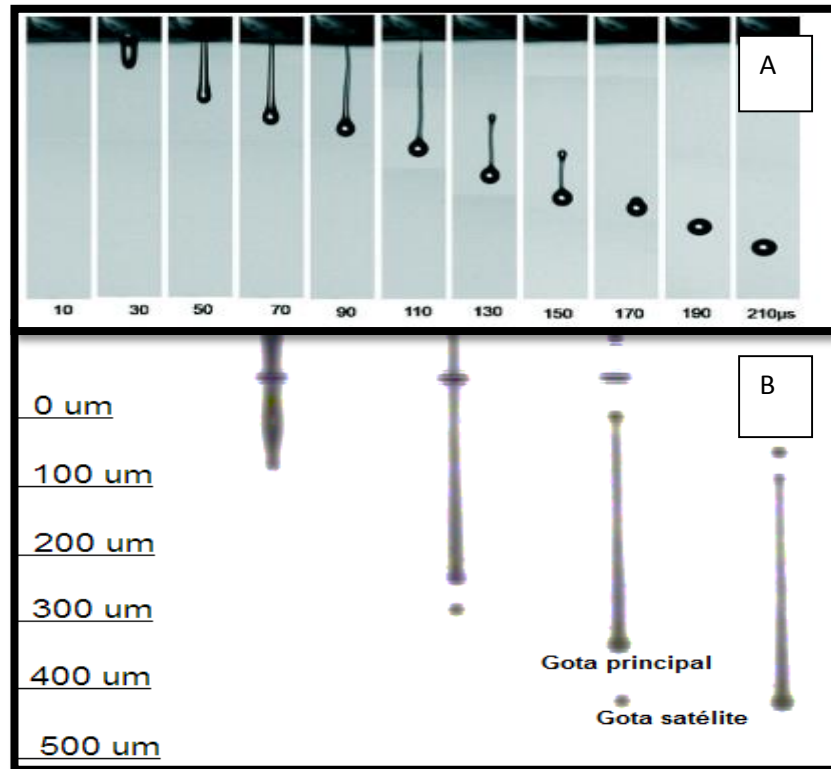
El comportamiento de los fluidos afecta la formación de la gota. Los fluidos pueden ser newtonianos o no-newtonianos. Los fluidos newtonianos son aquellos en los que su viscosidad no se ve afectada por la naturaleza fisicoquímica de ellos mismos, por lo tanto son independientes del esfuerzo cortante que pueda aplicarse sobre ellos. Su viscosidad variará en función de su presión y temperatura, de esta forma se considera que la viscosidad es una constante de la ley de Newton de la viscosidad (Martín et al., 2011).

$$\tau_{yx} = \mu \frac{dv_x}{dy}$$

Los fluidos no-newtonianos son aquellos que no cumplen con la ley de Newton de la viscosidad, por lo tanto la viscosidad de estos fluidos depende del valor del esfuerzo cortante y el gradiente de la velocidad, obteniendo una viscosidad aparente (Martín et al., 2011).

Se considera que los fluidos que se comportan como fluidos newtonianos generan solamente un gota. Sin embargo, la utilización de fluidos basados en soluciones de polímeros, dispersiones de elevada concentración o suspensiones coloidales se comportan como fluidos no newtonianos (Souza, 2015).

Los fluidos no newtonianos logran ser fluidos imprimibles mediante un control de parámetros de impresión, que da como resultado la generación de gotas satélites en conjunto con la gota principal, sin perjudicar la impresión (Souza, 2015).



**Figura 18. Formación de gotas en una impresora DoD. A. Goteo de fluidos newtonianos. B. Goteo de fluidos no newtonianos**

Fuente: (Souza, 2015).

El control de los parámetros de impresión se realiza a través de una interfaz de PC, manipulando los datos en la plataforma como la diferencia de potencial eléctrico, la frecuencia de salida del fluido y los ciclos de impresión que se desean. La impresora contiene una cámara digital que permite observar la formación de las gotas según los parámetros aplicados antes de realizar la impresión, y de esta manera asegurar la precisión y repetibilidad de la impresión (Souza, 2015).

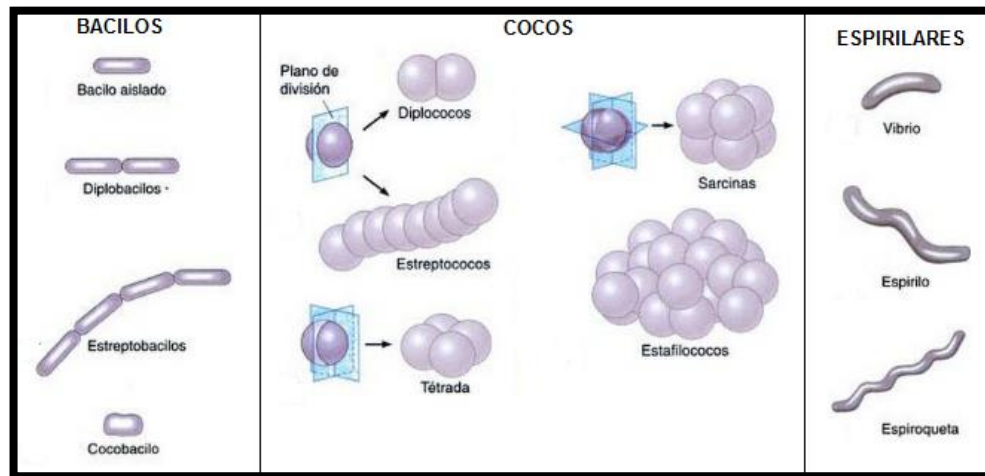
## 2.5 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

La microbiología es la ciencia que se encarga del estudio de organismos diminutos (entre 0.5 y 2  $\mu\text{m}$ ), que individualmente no son percibidos a simple vista, llamados microorganismos. Los microorganismos son seres vivos que incluyen a las bacterias, los hongos y mohos, los protozoos y las algas microscópicas. También se incluyen a los virus, que aun cuando no son entidades celulares, llevan material genético protegido por una envoltura proteica (Tortora et al., 2007).

Las bacterias forman parte de los microorganismos más estudiados y se caracterizan por ser células unicelulares cuyo material genético no posee una membrana nuclear especial por lo que pertenecen al reino procariota. Las bacterias son de tamaños y formas muy variables, la mayoría de ellas miden entre 0.2 y 2  $\mu\text{m}$  de diámetro y entre 2 y 8  $\mu\text{m}$  de largo. Estos microorganismos pueden clasificarse comúnmente según su forma en: bacilos (en forma de bastón), cocos (forma esférica u ovalada) y espirilares (formas curvas o espiraladas) (Tortora et al., 2007; Stanier et al., 1992).

Las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero siempre conservando su individualidad como célula. Los planos de división determinan las diferentes disposiciones de las bacterias. Las disposiciones de las bacterias en forma de cocos son: diplococos o estreptococos, que presentan un único plano de división. Si los planos de división son muchos, los cocos pueden agruparse en tétradas (dos planos), sarcinas (tres planos) o estafilococos (múltiples planos) (Pirez & Mota, 2008).

Aunque la mayoría de bacilos se observan como bastones aislados, estos pueden dividirse a través de sus ejes menores para formar diplobacilos (unidos en pares), y estreptobacilos (formación de cadenas). Otros bacilos pueden presentar otras formas como hebras de paja, otros con extremos afinados y los cocobacilos (bastones ovalados). Las bacterias espirilares presentan formas curvas como los vibriones, los espirilos y espiroquetas (Tortora et al., 2007).

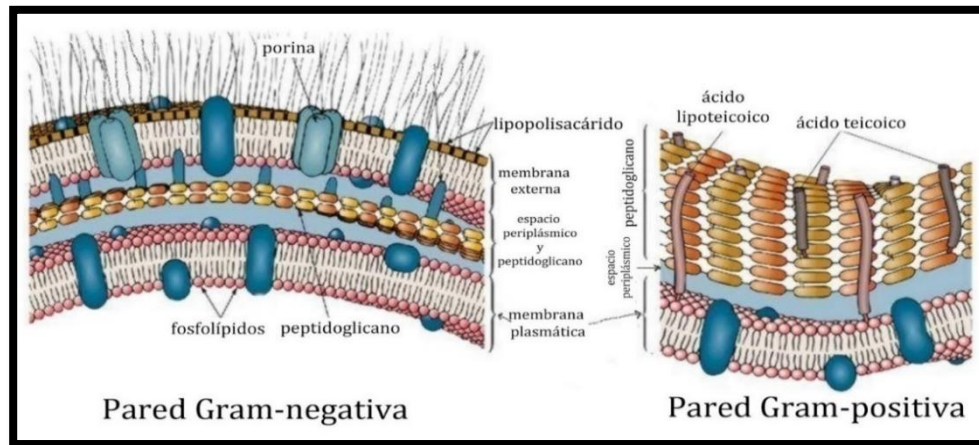


**Figura 19. Clasificación de las bacterias según su forma y sus asociaciones.**

**Fuente: (Tortora et al., 2007).**

Comúnmente las bacterias están agrupadas en dos grandes categorías según la estructura de su pared celular: bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Esta clasificación se realiza mediante la técnica de tinción Gram, la cual se basa en las diferencias de la estructura de la pared celular y en la forma en cómo reaccionan a diversos reactivos para que las bacterias puedan teñirse de violeta (Gram positivas) o rosado (Gram negativas). Las bacterias Gram positivas presentan una pared celular compuesta por varias capas de peptidoglucano, las cuales forman una estructura gruesa y rígida. Además su pared celular contiene ácidos teicoicos que regulan el movimiento de cationes al interior o exterior de la célula y son los responsables de la especificidad antigénica de la pared celular (Tortora et al., 2007).

Las bacterias Gram negativas poseen una o muy pocas capas de peptidoglucano, una membrana externa, un alta concentración de lipopolisacáridos y un espacio periplasmático con un elevada concentración de enzimas degradantes y proteínas de transporte. Además la pared celular de estas bacterias no presenta ácidos teicoicos lo que la hace más susceptible a ruptura mecánica. La membrana externa presenta un elevada carga negativa lo que dificulta la fagocitosis y el paso de ciertos antibióticos (Tortora et al., 2007).



**Figura 20. Diferencias entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas en su pared celular**

**Fuente: (Sánchez, 2006).**

Entre las bacterias, existen algunas que son perjudiciales para la salud y que deterioran productos de comercio con facilidad y rapidez, pero también existen bacterias beneficiosas que ayudan a la industria a obtener productos que mejoran la calidad de vida de los seres vivos. Aunque solo pocos microorganismos son patógenos, el conocimiento de cada uno de ellos es esencial para la medicina y otras ciencias e investigaciones relacionadas con la salud y los alimentos (Tortora et al., 2007).

### **2.5.1 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es la especie más representativa de los bacilos gramnegativos y se encuentra predominantemente en la microbiota del aparato digestivo en la mayoría de mamíferos y del hombre. Aunque la mayoría de cepas son inofensivas, algunas pueden llegar a causar una grave enfermedad a través del consumo de alimentos contaminado con esta bacteria, lo que la vuelve un blanco de estudio. Estas bacterias no generan esporas, la mayoría son móviles y la mayor parte de ellas fermentan lactosa (Gibert, 2010; Puerta & Mateos, 2010).

**Tabla 3.****Taxonomía de *Escherichia coli***

<i>Escherichia coli</i>	
<b>Dominio:</b>	Bacteria
<b>Filo:</b>	Proteobacteria
<b>Clase:</b>	Gammaproteobacteria
<b>Orden:</b>	Enterobacteriales
<b>Familia:</b>	Enterobacteriaceae
<b>Género:</b>	Escherichia
<b>Especie:</b>	<i>E. coli</i>

Fuente: (Gibert, 2010).

*E. coli* es la enterobacteria más importante debido a la virulencia que presenta, ya que genera patologías en los seres humanos. Su cubierta celular es de tipo didermo constituida de una membrana citoplasmática externa, formada por una capa de fosfolípidos con proteínas intercaladas, y sobre esta membrana se sitúa una capa fina de peptidoglicano. Entre ambas capas se encuentra el espacio periplásmico, y hacia la parte externa de la bacteria se encuentra una bicapa de fosfolípidos intercalada con lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas y porinas (Hernández, 2010).

**Figura 21. *E. coli* en Tinción Gram**

Fuente: (Barrera, 2014).

*E. coli* es un microorganismo patógeno que al estar presente en el tracto digestivo y al ser eliminado por las heces, se convierte en un indicador de contaminador fecal, permitiendo determinar la sanidad de aguas y de alimentos, así como control de estudios epidemiológicos (Larrea, 2013).

Esta bacteria flagelada es susceptible al efecto antibacterial de las nanopartículas metálicas, y con respecto a las nanopartículas de plata se ha evidenciado una inhibición inmediata y persistente de *E. coli*. Se ha podido determinar que las Ag-NPs influyen sobre las proteínas de membrana externa, la proteína periplásmica de unión al oligopéptido, también sobre la lipoproteína de unión a D-metionina y la subunidad S6 del ribosoma 30S. Además influye en el potencial de membrana generando casi una pérdida completa de potasio celular y agotan el contenido de ATP, debido a la demanda de energía requerida para la translocación de precursores de proteínas de membrana durante el contacto con las nanopartículas de plata (Lok, 2006).

Para el crecimiento de esta bacteria se requiere:

- 1. Medio de cultivo:** esta bacteria puede crecer en medio Agar Mueller-Hinton de forma óptima si es cultivada a partir de un inóculo puro, y de esta forma aplicar el método de difusión en disco Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).
- 2. Temperatura:** la temperatura óptima de crecimiento para esta bacteria es de 37 °C (Amro, 2000).
- 3. Tiempo de incubación:** se estima que el tiempo de incubación debe ser entre 18 y 24 horas (Larrea, 2013).

### 2.5.2 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* es una bacteria habitual en los seres humanos y animales en la flora normal del tracto respiratorio y la piel, se considera un representante de los cocos Gram positivos (Flores, 2014).



**Tabla 4.****Taxonomía de *Staphylococcus aureus***

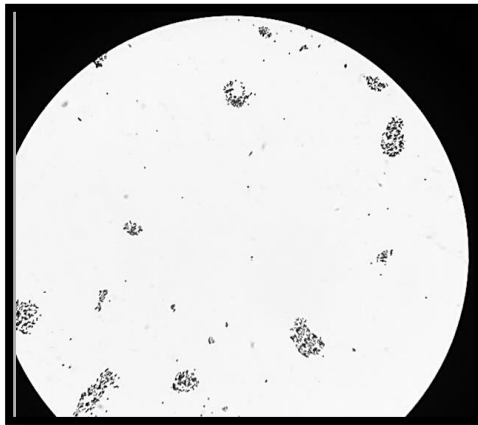
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<b>Dominio:</b>	Bacteria
<b>Filo:</b>	Firmicutes
<b>Clase:</b>	Bacilli
<b>Orden:</b>	Bacillales
<b>Familia:</b>	Staphylococcaceae
<b>Género:</b>	Staphylococcus
<b>Especie:</b>	<i>S. Aureus</i>

Fuente: (Gibert, 2010).

El estudio de *S. Aureus* es muy importante ya que se considera como la más virulenta de su especie, siendo la responsable de un amplio espectro de enfermedades que van desde infecciones cutáneas hasta infecciones graves que amenazan la vida. Este microorganismo posee pigmentación amarilla asociada a patologías como pústulas, neumonía, meningitis y artritis y es una de las causas principales de la formación de los focos infecciosos en implantes médicos (Flores, 2014).

*S. aureus* tienen 0.5 – 1 µm de diámetro, su pared celular está compuesta de peptidoglicanos, ácidos teicoicos o polisacáridos A, y proteínas de unión a la capa externa del peptidoglicano como: proteínas fijadoras de colágeno y de fibronectina, factor de agregación bacteriana y proteína A. En su estructura también posee una cápsula externa o glucocálix (Borraz, 2006).

La colonización de esta bacteria es más frecuente en un ambiente hospitalario, sobretodo en pacientes que reciben hemodiálisis, pacientes con diabetes tipo I, con lesiones cutáneas, infectados con VIH y en pacientes adictos a drogas por vía parenteral, por estos motivos es muy importante combatirla (Borraz, 2006).



**Figura 22. *S. aureus* en Tinción Gram**

**Fuente: (Barrera, 2014).**

Se ha evidenciado que *S. aureus* tiene una susceptibilidad a los efectos bactericidas de las Ag-NPs, ya que al ser una bacteria Gram positiva tiene una pared celular constituida por un heteropolímero que es un peptidoglicano llamado mureína, y también presenta ácidos teicoicos. La disposición de estas moléculas de pared celular forman una capa permeable, lo cual favorecería el ingreso del material nanoparticulado y se generaría así el efecto antibacteriano (Paredes, 2011).

Las condiciones adecuadas para su crecimiento son:

- 1. Medio de cultivo:** su crecimiento puede ser óptimo en medio Agar Mueller-Hinton cultivada a partir de un inóculo puro, con el fin de realizar análisis de difusión en disco (CLSI, 2014).
- 2. Temperatura:** la temperatura optima de crecimiento para esta bacteria es de 37 °C (Feng, 2000).
- 3. Tiempo de incubación:** se estima que el tiempo de incubación debe hasta 24 horas (Borraz, 2006).

### 2.5.3 Método de difusión en agar con discos de Kirby-Bauer

El método de difusión en agar con discos basado en el trabajo de Bauer, Kirby y sus colaboradores, es un método cualitativo que se ha caracterizado por ser fácilmente estandarizable y permitir el crecimiento de microorganismos no exigentes de rápido crecimiento. Este método es uno de los recomendados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para determinar la sensibilidad de bacterias a los antimicrobianos. Para la utilización de este método se necesita que el microorganismo de estudio, esté previamente aislado y puro (Taroco et al., 2008; García et al., 2000).

El antibiograma disco-placa consiste en colocar, directamente en la superficie del medio de cultivo inoculado previamente con el microorganismo de estudio, discos impregnados con el antimicrobiano. Una vez que el disco se ponga en contacto con la superficie húmeda del medio, este absorbe agua y de esta forma el agente antibacteriano se difunde en la superficie del medio alrededor del disco, teniendo una difusión de forma radial que va disminuyendo hacia la periferia del medio (Alvarado, 2012).

Trascurridas de 18 a 24 horas de incubación de la bacteria, los discos aparecerán rodeados de una zona sin crecimiento bacteriano, llamado halo de inhibición. El comportamiento del halo de inhibición se desarrolla por efecto de la concentración de la droga, sensibilidad bacteriana, coeficiente de difusión de la droga en el agar, tiempo y temperatura de incubación, pH, composición del medio, profundidad del medio en las placas y el tamaño del inóculo. La lectura del antibiograma se realiza mediante la medición de los halos de inhibición (Alvarado, 2012; García et al., 2000).

Este método se realiza generalmente en Agar Mueller – Hinton, que es un medio de cultivo aceptado por el comité de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para pruebas de susceptibilidad de rutina de bacterias, ya que se puede obtener una reproducibilidad adaptable lote a lote, posee una baja inhibición de antibióticos, y además el crecimiento bacteriano es satisfactorio para la mayoría de los patógenos, lo que ayuda a la estandarización entre los laboratorios (CLSI, 2014).

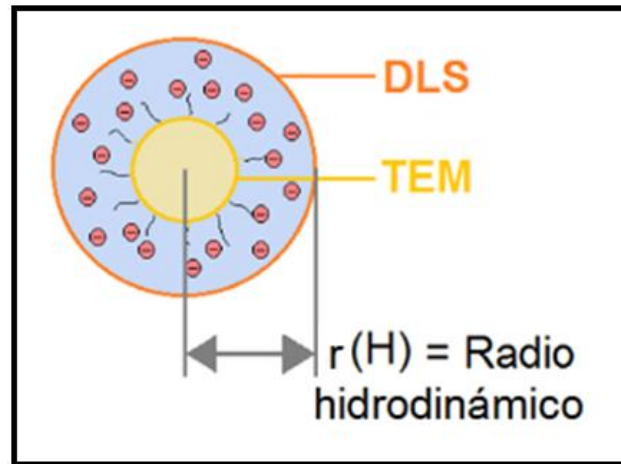
El inóculo se prepara según la escala de McFarland, la cual es una serie de estándares de turbidez que se utilizan como referencia para suspensiones bacteriológicas y así poder conocer el número de unidades formadoras de colonias que van a ser inoculadas, la escala se encuentra entre 0.5 hasta 10 UFC/mL. El patrón en la escala de McFarland para pruebas de sensibilidad antimicrobiana como difusión en disco, es de 0.5 (CLSI, 2014).

### **2.5.3.1 Coeficiente de difusión de nanopartículas de plata en el medio de cultivo**

La técnica de difusión en agar es el método que se utiliza comúnmente para cuantificar la capacidad antibacterial de los nanomateriales. Los resultados se basan en el modelo de difusión libre de antibióticos en el medio, los cuales generan halos de inhibición que pueden ser medidos. El coeficiente de difusión del antimicrobiano es muy importante para determinar su alcance en el medio. Actualmente no existe un coeficiente de difusión (D) de nanopartículas de plata que esté establecido, pero puede ser calculado con la siguiente ecuación:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d(H)}$$

donde  $d(H)$  es el diámetro hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión, k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y  $\eta$  la viscosidad dinámica. El diámetro hidrodinámico se calcula con equipo de DLS, ya que otros equipos como el TEM determina solo el diámetro de la partícula sin electrones o estructuras que estén en la superficie de la nanopartícula (Guzmán, 2015)



**Figura 23. Radio hidrodinámico determinado por DLS**

**Fuente: (Barrera & Guerrero, 2017).**

El medio de cultivo Mueller – Hinton se comporta como un fluido no-newtoniano reopéctico, en el cual aumenta su viscosidad con el tiempo y con la velocidad de deformación aplicada. Al aplicarse una fuerza, ésta conlleva a la formación de enlaces intermoleculares que generan el aumento de la viscosidad y al retirar esta fuerza se destruyen los enlaces y disminuye la viscosidad; por lo tanto la viscosidad del medio aplicada para encontrar D, será un viscosidad aparente (Cabrejos, 2011).

### 3 CAPÍTULO III

#### MATERIALES Y MÉTODOS

##### 3.1 PARTICIPANTES

El desarrollo del proyecto se realizó bajo la dirección de Petrus Santa Cruz D´ Amorim Ph.D. y Alexis Debut Ph.D. y con la colaboración de la Máster Carolina Mojica, el Lic. Felipe Souza y de Norma Buarque de Gusmão Ph.D.

##### 3.2 ZONA DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la Universidad Federal de Pernambuco UFPE - Brasil, en el Laboratorio LANDFOTON, Laboratorio de Nanodispositivos Fotônicos donde se realizan investigaciones para la producción de nanomateriales bioinspirados en mejorar la calidad de vida de los seres humanos, en colaboración con el laboratorio del Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

**Tabla 5.**

##### Ubicación del sitio experimental

<b>País</b>	<b>Brasil</b>
<b>Región</b>	Nordeste
<b>Estado</b>	Pernambuco
<b>Ciudad</b>	Recife
<b>Barrio</b>	Cidade Universitária
<b>Sitio</b>	UFPE, LANDFOTON
<b>CEP</b>	50670-901

Fuente: (Prefectura de Recife, 2017).

### 3.3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El desarrollo investigativo se inició con una revisión bibliográfica en el área de métodos de síntesis e inmovilización de nanopartículas y sus aplicaciones, también se analizó el tipo de sustrato de impresión que se utilizará junto con su análisis ecotóxico, así como los parámetros de impresión adecuados. Finalmente se consideró las especies bacterianas que se utilizarían para comprobar el efecto antibacteriano del dispositivo. Toda la revisión se realizó en bases de datos en inglés, español y portugués.

### 3.4 MATERIALES Y REACTIVOS

Se especifican los materiales, reactivos y equipos utilizados de la investigación. En la Tabla 6 y en la Tabla 7 se encuentra la contribución por parte de LANDFOTON, Laboratorio de Nanodispositivos Fotónicos de la Universidad Federal de Pernambuco UFPE y del Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales del Centro de Nanociencia y Nanotecnología CENCINAT.

**Tabla 6.**

**Aporte de LANDFOTON (materiales, equipos y reactivos).**

<b>MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS PROVISTOS POR LANDFOTON</b>		
<b>EQUIPOS</b>		
<b>Ítem</b>	<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>
<b>1</b>	Hot Plate	1
<b>2</b>	Microondas CEM Discover monomode	1
<b>3</b>	Termómetro automático	1
<b>4</b>	Luxímetro	1
<b>5</b>	Lámpara de luz blanca	1
<b>6</b>	Balanza analítica	1



7	Impresora Dimatix Materials Printer™	1
8	Espectrofotómetro UV-VIS	1
9	pHmetro	2
10	Cámara de flujo laminar vertical	2
11	Estufa	1
12	Incubadora	1
13	Escalímetro digital	1
14	Ultrasonido UNIQUE®	1
<b>MATERIALES</b>		
15	Matraz Erlenmeyer 50 mL	1
16	Balón 1000 mL	1
17	Pipeta 5 mL	1
18	Pipeta 10 mL	1
19	Agitador magnético	2
20	Tubo de ensayo 10 mL	5
21	Gradilla para tubos de ensayo	1
22	Espátula	5
23	Vidrio de reloj	2
24	Acetato de celulosa	
25	Placa de microtitulación de 24 pocillos	1
26	Pinza	2
27	Tijeras	2
28	Perforadora sacabocados	1
29	Caja petri plástica estéril	6
30	Botella 10 mL	6
31	Papel parafilm	
32	Papel aluminio	
33	Papel toalla	
34	Celda de cuarzo	1
35	Vaso precipitación 1000 mL	2





36	Piseta	2
37	Portaobjetos	2
38	Micropipeta 1000 mL	1
39	Micropipeta 100 mL	1
40	Caja de puntas para micropipeta 1000 mL	1
41	Caja de puntas para micropipeta 100 mL	1
<b>REACTIVOS</b>		
42	Nitrato de plata	
43	Citrato de sodio	
44	Borohidruro de sodio	
45	N,N-dimetilformamida	
46	Polivinilpirrolidona	
47	Etanol	
48	Etilenglicol	
49	Agua destilada	
50	Sal en grano	
51	Alcohol isopropílico	
52	Polivinilbutiral	
<b>MATERIAL BIOLÓGICO</b>		
53	Huevos de <i>Artemia franciscana</i>	
54	Cepa pura de <i>Escherichia coli</i>	
55	Cepa pura de <i>Staphylococcus aureus</i>	

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

**Tabla 7.**

**Aporte de CENCINAT (materiales, equipos y reactivos).**

<b>MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS PROVISTOS POR CENCINAT</b>		
<b>EQUIPOS</b>		
Ítem	Detalle	Cantidad



1	Hot Plate	2
2	Espectrofotómetro UV-VIS	1
3	Equipo de Rayos X PANalytical Empyrean	1
4	Equipo de Dispersión Dinámica de Luz HORIBA LB-550 Dynamic Light Scattering Nanoparticle Size Analyzer	1
5	Microscopio Electrónico de Transmisión FEI-TECNAI G20 SPIRIT TWIN	1
6	Microscopio Electrónico de Transmisión y Barrido Tescan MIRA 3 FEG SEM	1
<b>MATERIALES</b>		
7	Papel parafilm	
8	Papel aluminio	
9	Papel toalla	
10	Celda de cuarzo	1
11	Piseta	1
12	Portaobjetos	2
13	Tubo Eppendorf 2 mL	16
14	Micropipeta 100 mL	1
15	Caja de puntas para micropipeta 100 mL	1
16	Filtro de 0,2 µm	2
17	Jeringa 10 mL	2
<b>REACTIVOS</b>		
18	Agua destilada	
19	N,N-dimetilformamida	

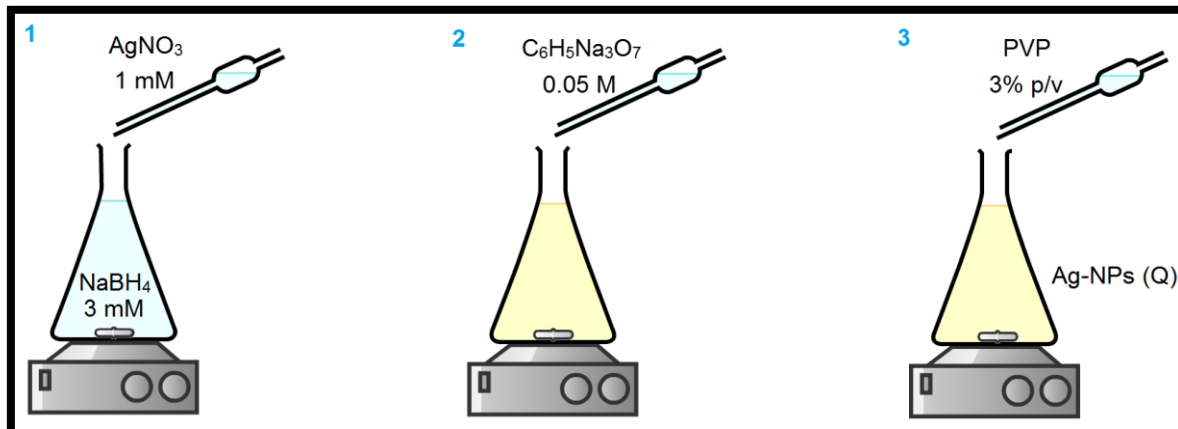
Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

## 3.5 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

### 3.5.1 Método químico

Para la síntesis de Ag-NPs (Q) en disolución coloidal se realizó una fusión entre el método de Lee-Meisel y el método de Creighton hasta estandarizar un nuevo protocolo. Como ya fue mencionado anteriormente, el método de Creighton permite la obtención de Ag-NPs mediante la reducción del  $\text{AgNO}_3$  con  $\text{NaBH}_4$ , y el método de Lee-Meisel usa como precursor metálico al  $\text{AgNO}_3$  y como agente reductor al  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ , sin embargo estos dos métodos por separado requieren mayor estabilidad, por lo que para este trabajo de investigación se utilizó  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor y  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  como agente estabilizante.

Siguiendo esta modificación se colocó en agitación constante 25 mL de  $\text{NaBH}_4$  3 mM (2.8 mg de  $\text{NaBH}_4$  en 25 mL de agua destilada) en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, a esta solución se adicionó 10 mL de  $\text{AgNO}_3$  1 mM (8.5 mg de  $\text{AgNO}_3$  en 50 mL de agua destilada) en una velocidad de una gota por segundo, y se observó el color amarillo característico de las Ag-NPs. Seguidamente se goteó a la misma velocidad 5 mL de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  0.05 M (0.32 g en 25 mL de agua destilada) para estabilizar las nanopartículas sintetizadas. Finalmente se añadió 200  $\mu\text{L}$  de PVP 3% p/v (0.75 g de PVP en 25 mL de agua destilada) como un agente estabilizante adicional, en velocidad de una gota por segundo como se muestra en la Figura 24. Toda la reacción se realizó a temperatura ambiente. El coloide obtenido se vertió en frascos ámbar de 10 mL cubiertos de papel aluminio para evitar la fotosensibilidad de la disolución coloidal.

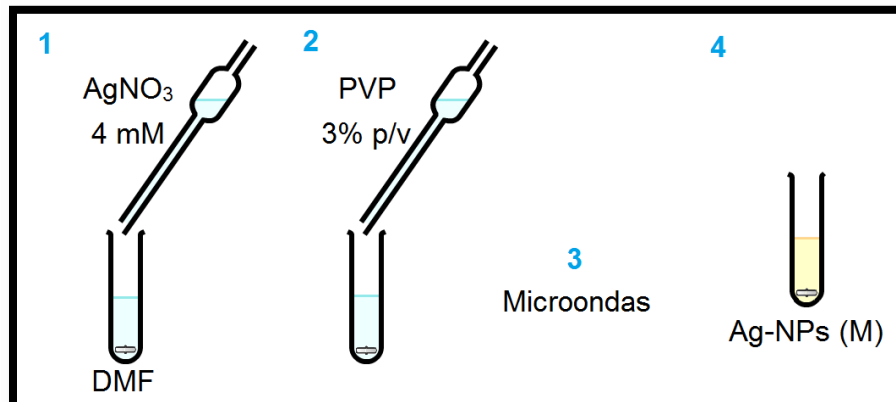


**Figura 24. Síntesis de nanopartículas de plata por método químico.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

### 3.5.2 Método de irradiación por microondas

En este método de síntesis se colocó 5 mL de DMF como agente reductor en un tubo de ensayo de 10 mL, se adicionó 1 mL de  $\text{AgNO}_3$  4 mM (17 mg de  $\text{AgNO}_3$  en 25 mL de agua destilada) como precursor metálico, y el agente estabilizante que se utilizó fue 200  $\mu\text{L}$  de PVP 3% p/v (0.75 g de PVP en 25 mL de agua destilada), como se resume en la Figura 25. La reacción de síntesis se realizó en el microondas CEM Discover monomode a una temperatura de 90 °C, con potencia de 150 W y presión de 250 Psi, por un tiempo de 30 segundos en agitación constante. El coloide de Ag-NPs (M) obtenido se vertió en frascos ámbar de 10 mL, previamente cubiertos con papel aluminio para evitar una reacción de fotosensibilidad y se los almacenó a temperatura ambiente.



**Figura 25. Síntesis de nanopartículas de plata por irradiación microondas.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

### 3.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS

#### 3.6.1 Análisis por espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-VIS)

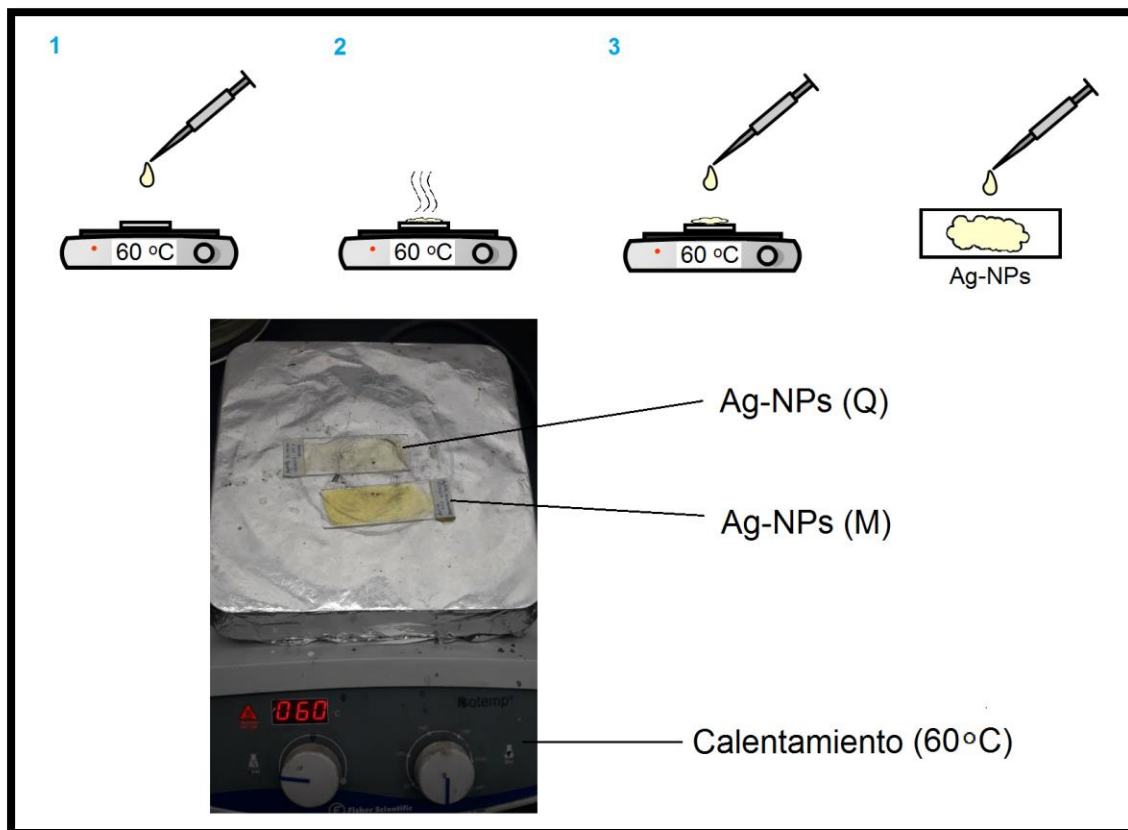
El análisis espectroscópico se realizó directamente de las muestras sin diluir de las nanopartículas obtenidas por síntesis química, y de las nanopartículas sintetizadas por irradiación de microondas.

#### 3.6.2 Análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

La Dispersión Dinámica de Luz se llevó a cabo en el equipo HORIBA LB-550 Dynamic Light Scattering Nanoparticle Size Analyzer, con las muestras filtradas con un filtro de  $0,2 \mu\text{m}$  para realizar el análisis del total nanopartículas y de hasta de 200 nm de tamaño.

### 3.6.3 Análisis por Difracción de Rayos X (XRD)

Este análisis se realizó en el equipo PANalytical Empyrean, a partir de las muestras filtradas colocando capas de muestra sobre placas portaobjetos, la adición de cada capa se realizó tras la evaporación del solvente de la capa anterior a temperatura de 60 °C como indica la Figura 26.



**Figura 26. Preparación de la muestra para el análisis por Difracción de Rayos X.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

### 3.6.4 Análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido (STEM) y de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

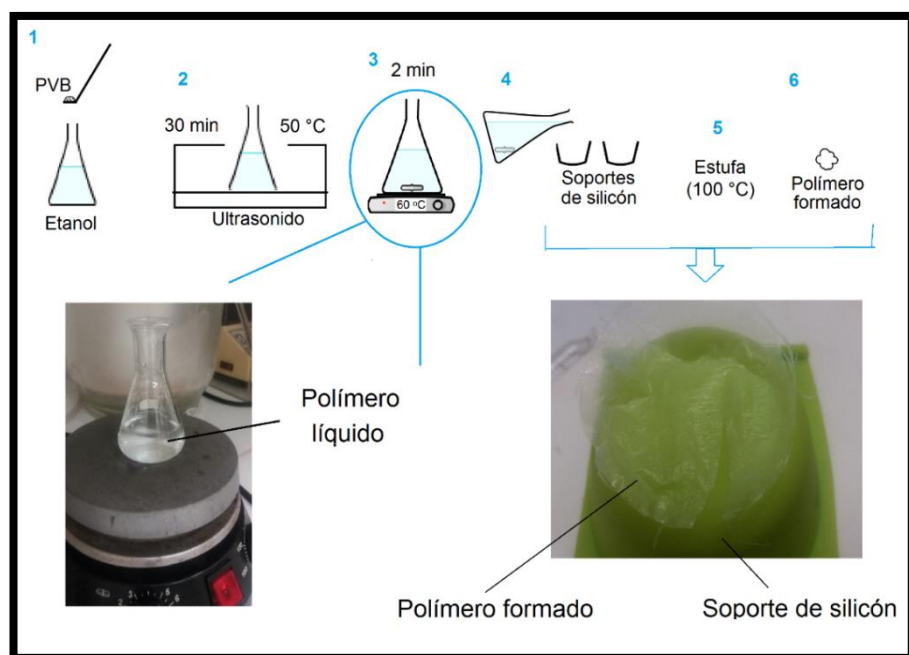
La evaluación microscópica de las nanopartículas obtenida en los equipos SEM Tescan MIRA 3 FEG SEM y TEM FEI-TECNAI G20 SPIRIT TWIN, también se realizó de las muestras filtradas con un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ , y se analizaron mediante el software de análisis

desarrollado por Carlos Arroyo Ph.D., Director del laboratorio de Caracterización de Nanomateriales del CENCINAT y profesor de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (Arroyo et al., 2016).

### 3.7 ANÁLISIS ECOTÓXICO DEL POLÍMERO POLIVINILBUTIRAL Y DEL SOPORTE DE IMPRESIÓN

#### 3.7.1 Preparación del polímero por evaporación

La matriz polimérica en los compósitos se realizó mediante la adición de 6 mg del polímero PVB en 10 mL de etanol en un matraz de 50 mL, e inmediatamente someter a la mezcla a ultrasonido UNIQUE® por 30 minutos a temperatura de 50 °C para su disolución. Posteriormente para agilizar la evaporación del solvente se colocó en agitación a 60 °C por 2 minutos, y se vertió la solución en soportes de silicón en la estufa a 100 °C, lo que generó la formación del polímero después de aproximadamente 5 h como se resume en la Figura 27.



**Figura 27. Preparación del polímero por evaporación.**

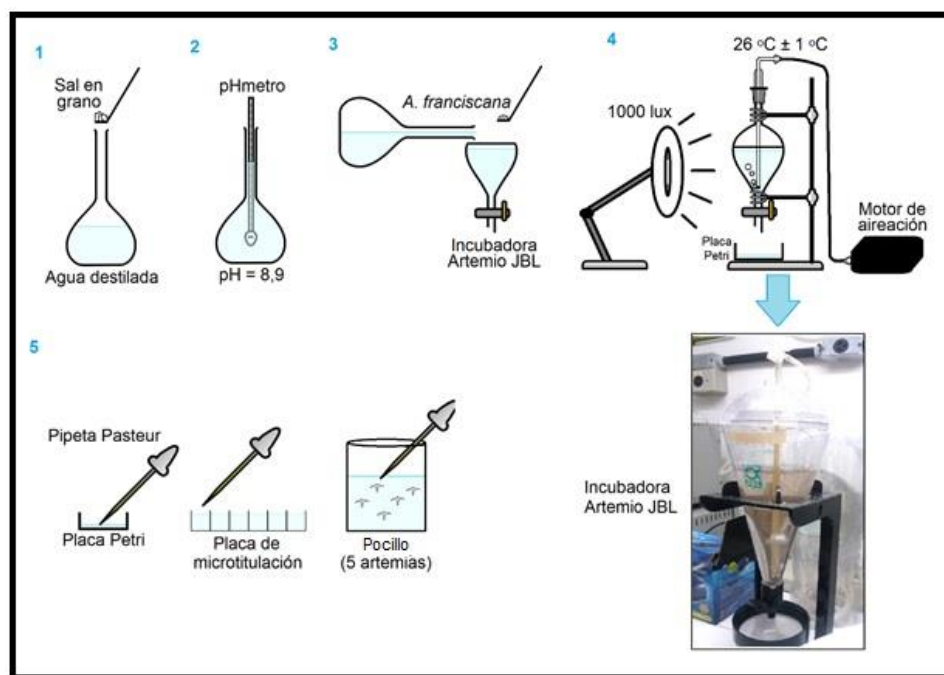
Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

### 3.7.2 Eclosión de *Artemia franciscana*

Se preparó agua salina al 35% de concentración, agregando 35 g de sal en grano en 1 L de agua destilada en un balón de 1000 mL, y se agitó manualmente con vigorosidad hasta conseguir la disolución de la sal. Se determinó un pH 8.9, valor que se encuentra dentro del rango óptimo para el crecimiento de los individuos.

En una incubadora Artemio JBL se adicionó 50 mg de huevos de *A. franciscana* en 500 mL de la solución salina preparada para iniciar su eclosión, manteniendo temperatura constante de  $26 \pm 1$  °C mediante aireación acondicionada, y con ayuda de una lámpara de luz blanca se expuso a los organismos vivos a 1000 lux de iluminación.

Todas las condiciones se conservaron por 48 horas, y al término de este tiempo se evidenció eclosión de los huevos de *A. franciscana*. Finalmente los individuos eclosionados se vertieron en placas Petri estériles, y se tomaron con una pipeta Pasteur para llevarlas a las placas de microtitulación, en cada pocillo se colocó 1 mL de solución salina y 5 artemias, como se resume en la Figura 28.



**Figura 28. Proceso realizado para la eclosión de *Artemia franciscana*.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017



### 3.7.3 Test ecotóxico en *Artemia franciscana*

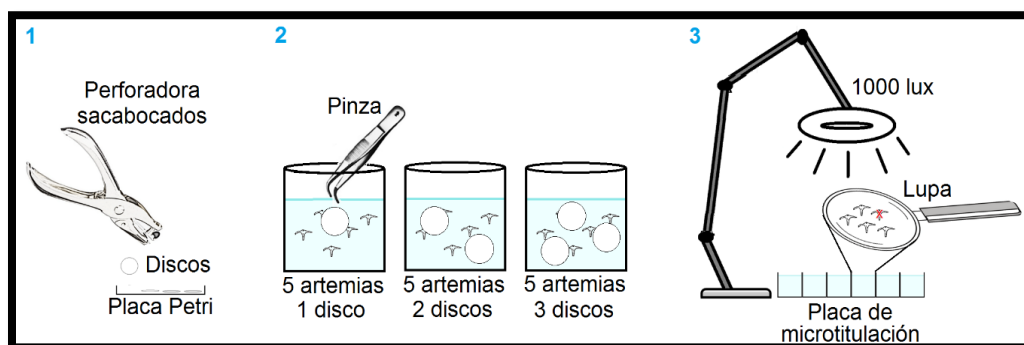
El análisis ecotóxico del soporte de impresión se realizó al exponerlo a *A. franciscana* viva. El test del AC (esterilizado con alcohol al 70%) y del polímero, se efectuó en función del tamaño y del peso del disco del material de análisis.

Los discos fueron obtenidos mediante una perforadora sacabocados estéril. Cada disco de AC tuvo un peso aproximado de 1 mg. Como se muestra en la Figura 29, se distribuyó 1, 2 y 3 discos con ayuda de una pinza estéril dentro los pocillos con 5 artemias en la placa de microtitulación. De la misma forma cada disco de polímero PVB pesó 0,4 mg aproximadamente, y se realizaron las mismas evaluaciones. Cada ensayo fue controlado por dos blancos, en los cuales solamente se colocó 5 artemias.

Se conservaron los mismos parámetros de la eclosión de *Artemia franciscana*:

- Concentración salina: 35%
- pH: 8.9
- Temperatura constante:  $26 \pm 1$  °C
- Iluminación: 1000 lux

La cuantificación de supervivencia y mortalidad de *Artemia franciscana* en contacto con el AC y PVB, se realizó mediante la cuantificación de organismos vivos y muertos con respecto a los individuos blanco durante 24 horas.



**Figura 29. Proceso realizado para el test ecotóxico del acetato de celulosa y del polímero PVB en *Artemia franciscana*.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

### 3.8 IMPRESIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS Y DE LOS NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS

#### 3.8.1 Análisis de afinidad solvente de impresión - material de impresión

Inicialmente se realizó pruebas de combinación de las nanopartículas sintetizadas por ambos métodos, con etanol y etilenglicol como solventes de impresión, para determinar la afinidad del solvente con las NPs al ponerlas en contacto directo, y así ver si la combinación de estos materiales es estable. Se realizó 7 diferentes relaciones de concentración solvente – material iniciando desde 1 mL de fluido, como se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8.**

**Relaciones de concentración solvente – material de impresión, con respecto a las Ag-NPs (Q) (obtenidas por método químico y Ag-NPs (M) (obtenidas por irradiación microondas)**

Solvente de impresión	Material de impresión	
	<i>Ag-NPs (Q)</i>	<i>Ag-NPs (M)</i>
<i>Etanol</i>	1:1	1:1
	1:2	1:2
	1:3	1:3
	2:1	2:1
	2:3	2:3
	3:1	3:1
	3:2	3:2
<i>Etilenglicol</i>	1:1	1:1
	1:2	1:2
	1:3	1:3
	2:1	2:1
	3:1	3:1
	2:3	2:3



	3:1	3:1
	3:2	3:2

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

La preparación del polímero se realizó con etanol, por lo tanto se observó la afinidad del solvente etilenglicol con el polímero PVB preparado como se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9.**

**Relaciones de concentración solvente - PVB**

	<b>Material de impresión</b>
<b>Solvente de impresión</b>	<i>PVB preparado en etanol</i>
<i>Etilenglicol</i>	1:1
	1:2
	1:3
	2:1
	3:1
	2:3
	3:1
	3:2

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

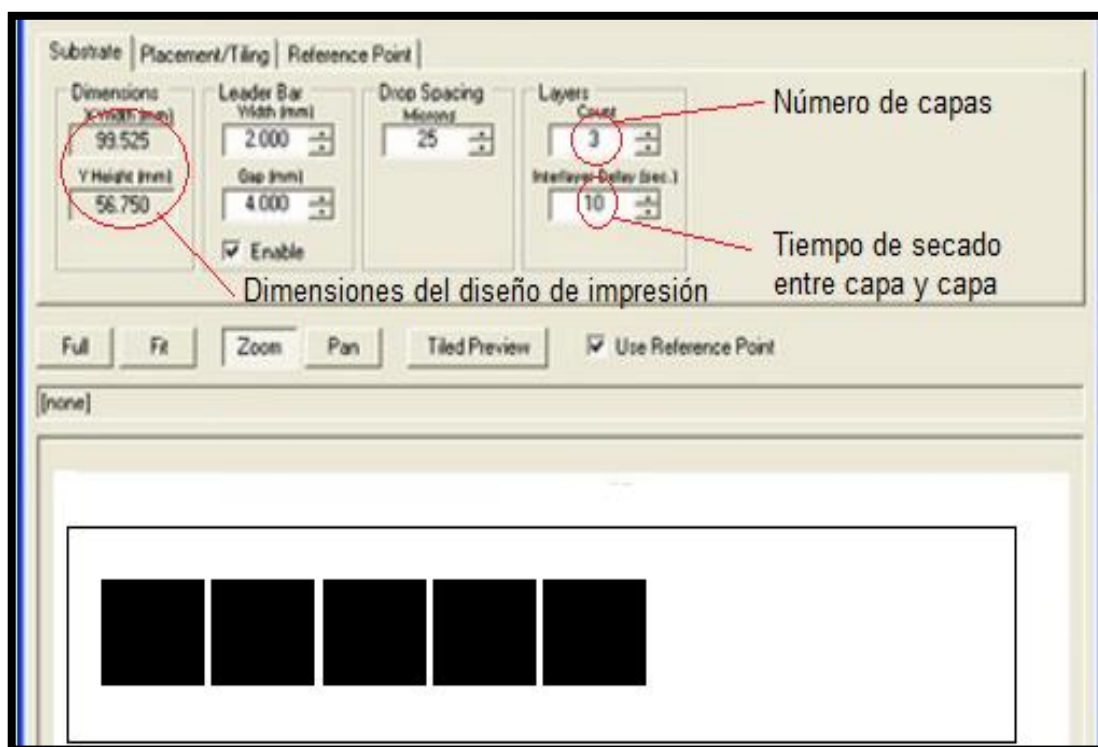
### **3.8.2 Fijación de parámetros e impresión de nanopartículas sintetizadas mediante el método químico.**

En la preparación previa a la impresión de Ag-NPs (Q) se ubicó el soporte de AC esterilizado con alcohol al 70% y se fijó a la superficie de la impresora con cinta adhesiva. A continuación se colocó 1.5 mL de la muestra filtrada en el cartucho y se limpió cuidadosamente la superficie de los eyectores del cartucho de impresión, con alcohol isopropílico usando una pipeta Pasteur. Finalmente utilizando el software Dimatix Drop Manager se aseguró el cartucho dentro de la impresora DMP™, mediante la herramienta

Replace Cartridge, y se realizó una primera limpieza de la superficie de los eyectores del cartucho de impresión, usando la almohadilla de limpieza Cleaning Pad.

Por otro lado, en la impresión de Ag-NPs (M) / PVB, tras la colocación del soporte de impresión esterilizado con alcohol al 70% y fijado a la superficie de la impresora con cinta adhesiva, se preparó una mezcla de concentración 1:1 entre el polímero PVB y las Ag-NPs (M) para formar el nanocompósito polimérico. Seguidamente se colocó 1.5 mL de la mezcla en el cartucho, y se limpió cuidadosamente la superficie de los eyectores como se menciona anteriormente con alcohol isopropílico con ayuda de una pipeta Pasteur.

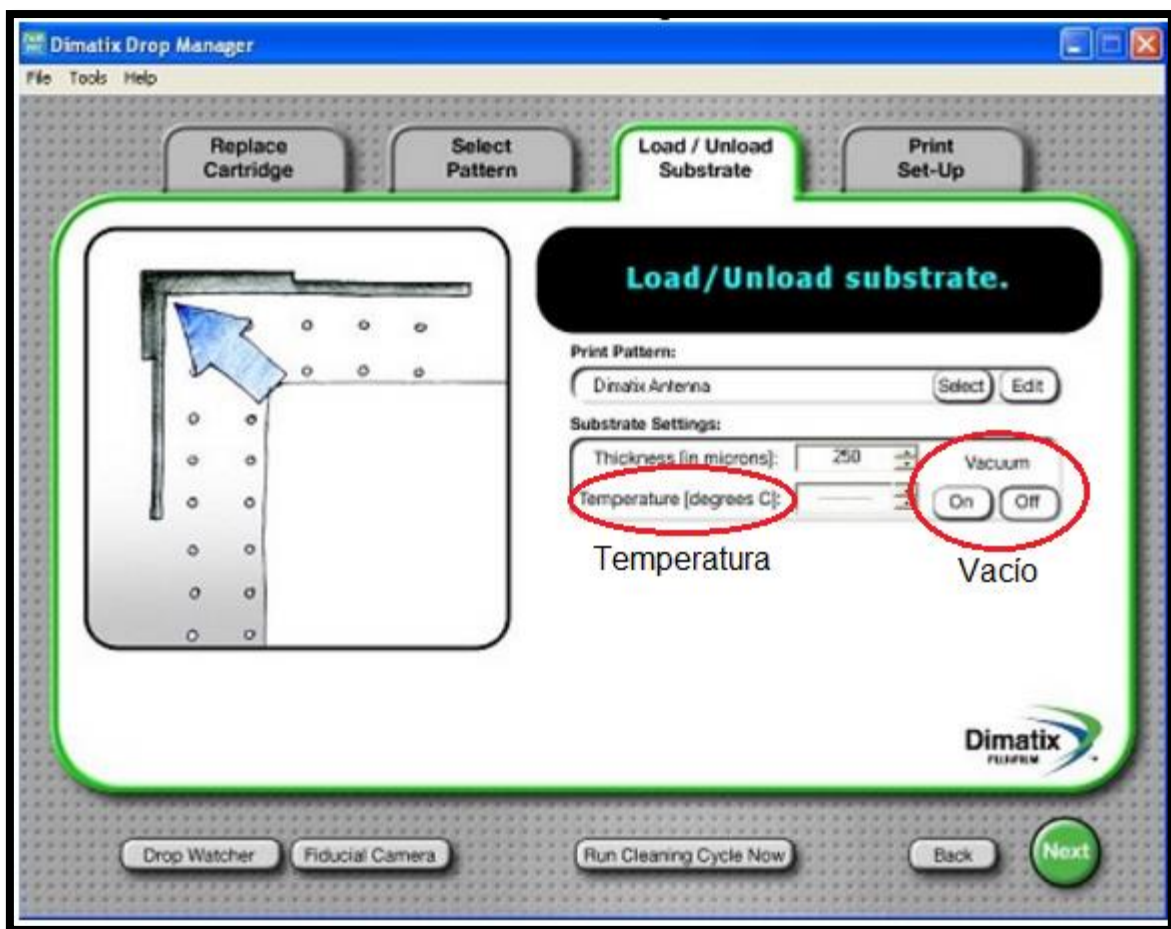
A continuación se seleccionó el patrón de impresión mediante la herramienta Select Pattern, donde se escogió el diseño de impresión en el cual se estableció tres números diferentes de capas: 5, 15 y 30 para ambos fluidos. Además el tiempo de secado designado entre cada capa que fue de 5 minutos, como indica la Figura 30.



**Figura 30. Selección del Patrón de Impresión**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

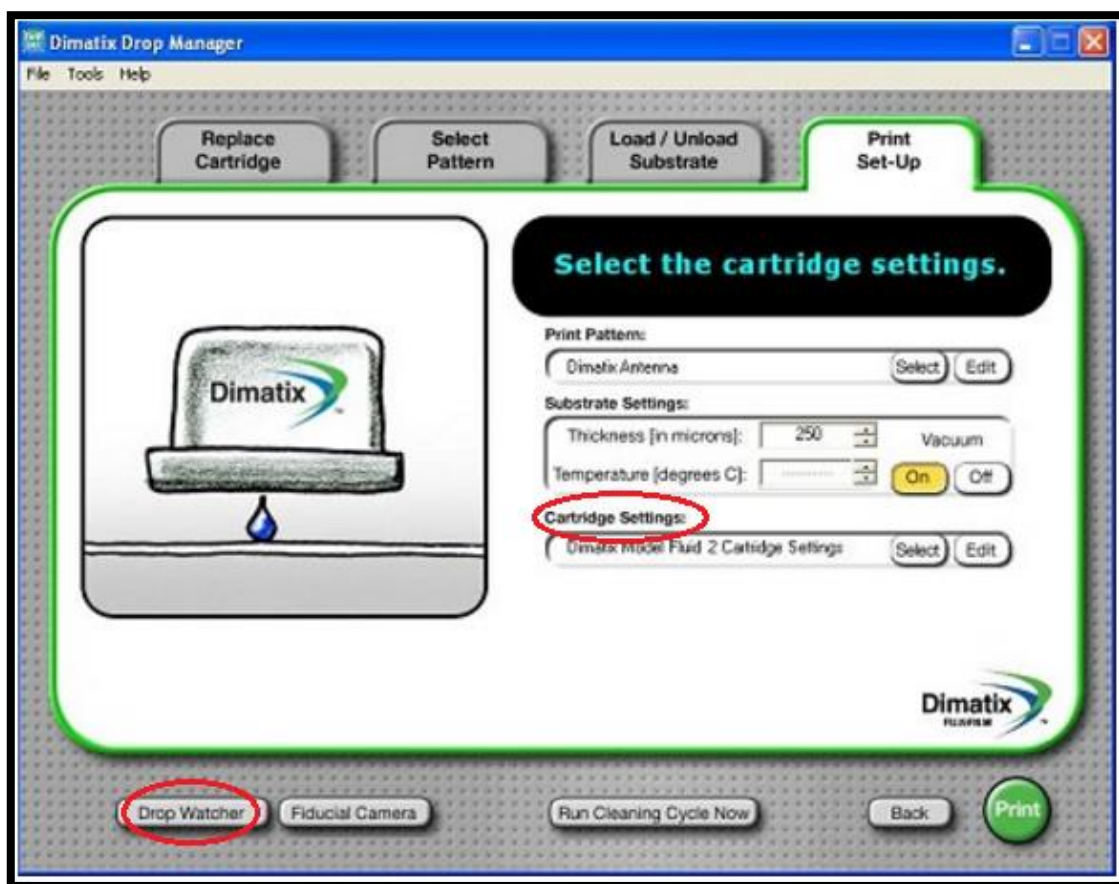
Posteriormente se ajustó la técnica al vacío en la herramienta Load/Unload Sustrate con la finalidad de evitar que el soporte de AC tenga movimiento durante la impresión, garantizando una mayor calidad del dispositivo impreso. En esta herramienta también se puede modificar la temperatura a usar durante el proceso, sin embargo la impresión se realizó a temperatura ambiente para evitar problemas de aglomeración de las Ag-NPs, como se resume en la Figura 31.



**Figura 31. Herramienta Load/Unload Sustrate**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

Los parámetros de impresión se establecieron con la herramienta Print Set-up, dentro de la cual se encuentran las opciones Cartridge Settings y Drop Watcher. En el interior de la primera está la herramienta Waveform que cuenta con la opción Firing Voltage, donde se fijó el diferencial de potencial eléctrico de 18 Volts (Ag-NPs (Q)) y 20 Volts (Ag-NPs (M) / PVB) para los 16 eyectores del cartucho de impresión y así obtener una correcta relación entre el volumen y forma de la gota sin turbulencia, como indica la Figura 32.



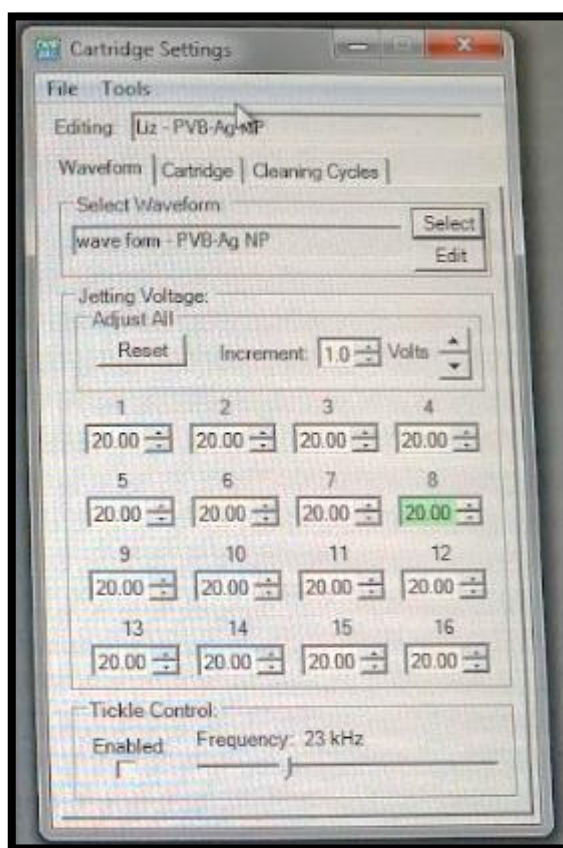
**Figura 32. Herramienta Print Set-up**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

La opción Select Waveform permite seleccionar una curva de calibración creada o editar una nueva curva de calibración, por lo tanto se editó por separado las nuevas curvas de calibración específica tanto para el fluido con Ag-NPs (Q) y para Ag-NPs (M) / PVB con la herramienta Waveform Editor, tomando en consideración:

1. Ajuste de la base del diferencial de potencial eléctrico del fluido sin flujo.
2. Ajuste de la base y pendientes de llenado de la antecámara de goteo.
3. Ajuste de la base y pendientes para el aumento del diferencial de potencial eléctrico que da inicio a la eyección del fluido.
4. Ajuste de la base y pendientes para la disminución controlada del diferencial de potencial eléctrico, que garantiza la formación de la gota con turbulencia mínima y la finalización de la eyección del fluido.

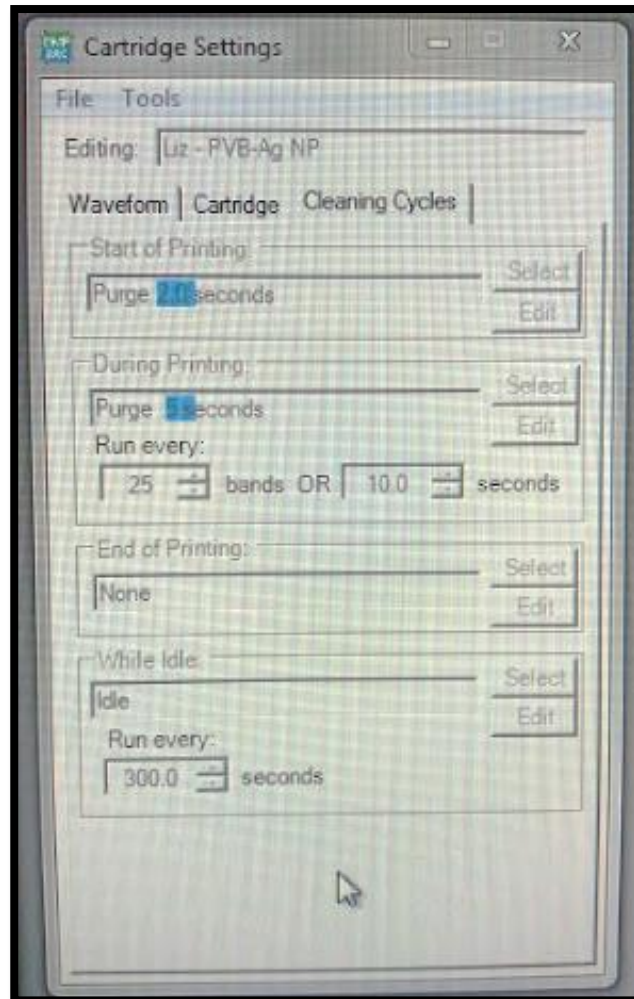
En esta herramienta también se fijó la frecuencia máxima de goteo de 23 kHz para el control de la vibración de los actuadores piezoeléctricos tanto para Ag-NPs (Q) y para Ag-NPs (M) / PVB, como se muestra en la Figura 33.



**Figura 33. Fijación la frecuencia máxima de goteo y el control de la vibración de los actuadores piezoeléctricos**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

Dentro de la herramienta Cartridge Settings también se encuentra la opción Cleaning Cycles, donde se programó una limpieza de la superficie de los eyectores del cartucho cada 10 segundos, con un tiempo de purga de 2 segundos como se muestra en la Figura 34.



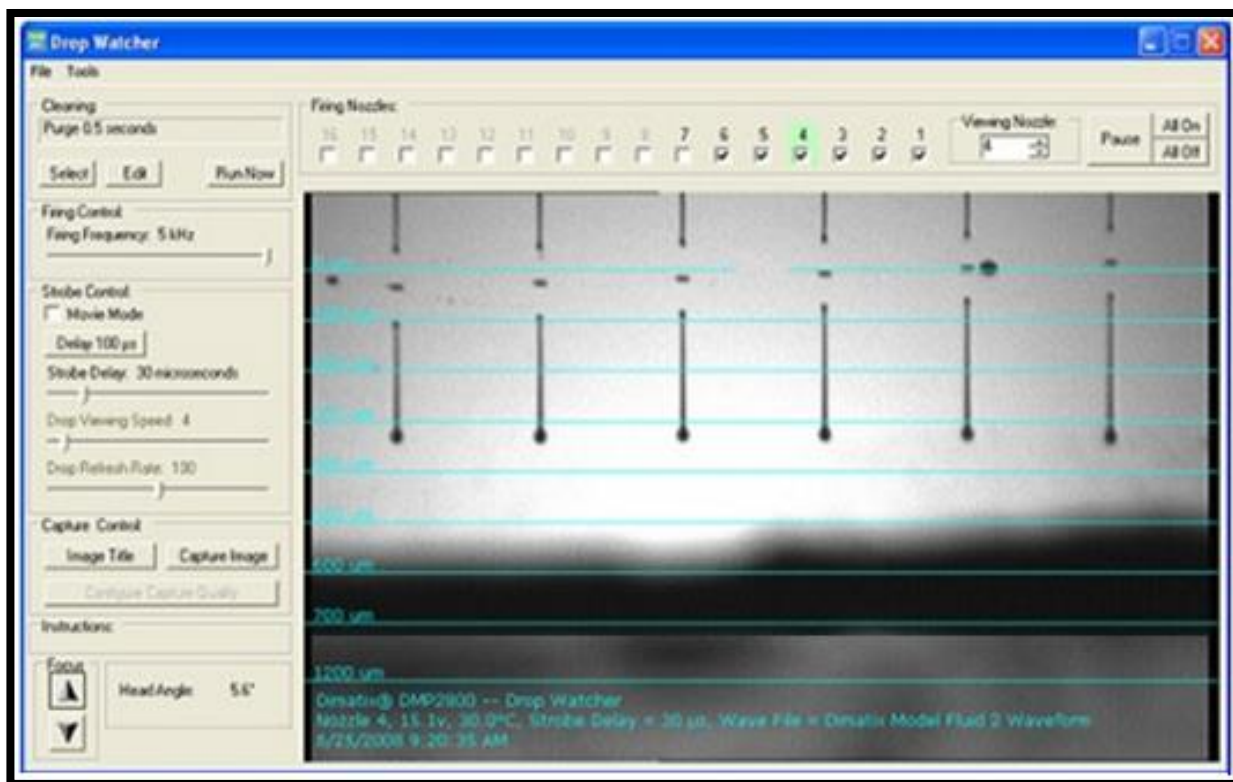
**Figura 34. Opción Cleaning Cycles**

**Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017**



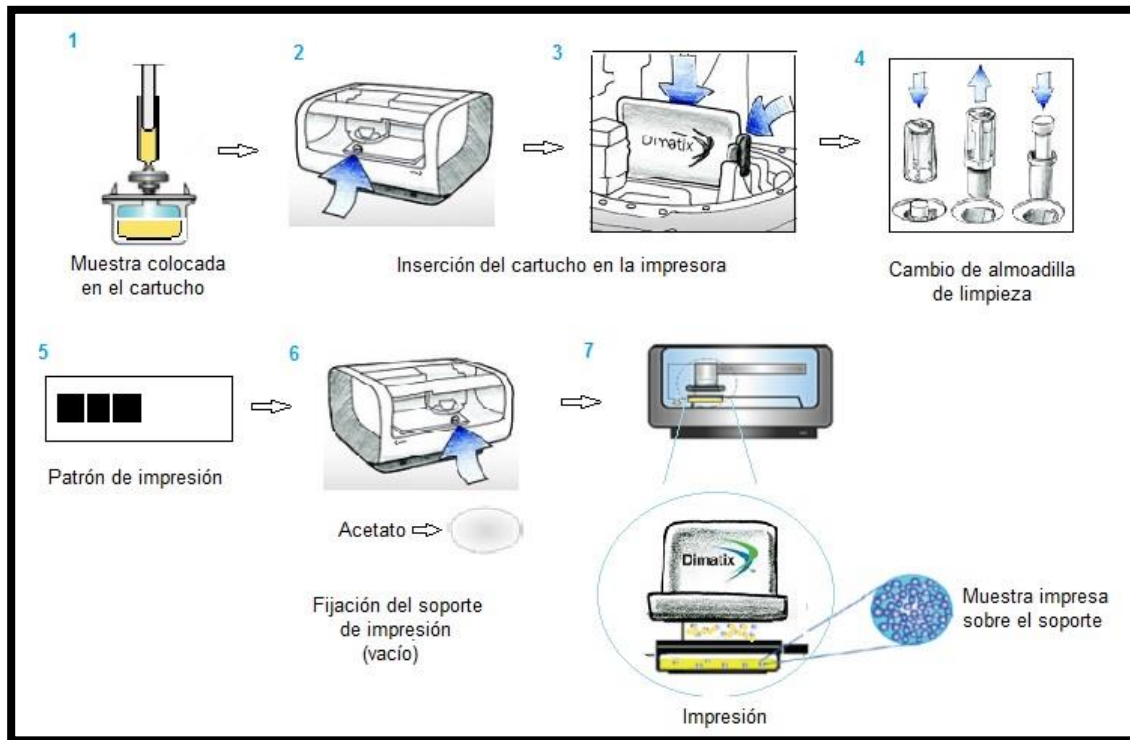
Finalmente con la herramienta Drop Watcher se visualizó el goteo y se verificó que el diferencial de potencial eléctrico aplicado fue el adecuado, dando paso al inicio de la impresión como indica la Figura 35.

La impresión de cada fluido (Ag-NPs (Q) y Ag-NPs (M) / PVB) se realizó por separado debido a que la impresora solo acepta un cartucho a la vez. Las impresiones se llevaron a cabo en oscuridad para evitar la degradación fotosensible de las Ag-NPs y posteriormente se retiró los dispositivos impresos, los cuales se colocaron en un lugar oscuro y fresco para concluir con su secado.



**Figura 35. Herramienta Drop Watcher**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017



**Figura 36. Resumen del proceso de impresión**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

### 3.9 ANÁLISIS DEL EFECTO BACTERICIDA DE LOS DISPOSITIVOS IMPRESOS EN *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*.

#### 3.9.1 Preparación de los dispositivos impresos

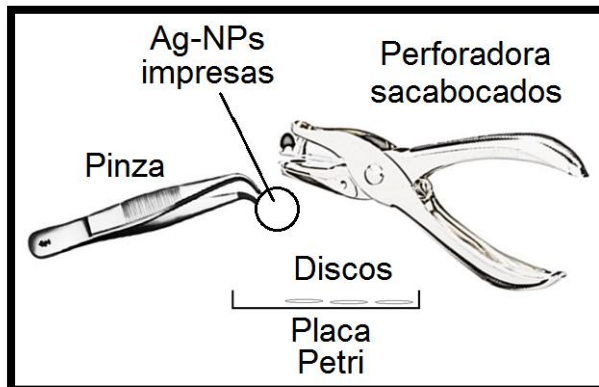
Se obtuvieron discos a partir de los dispositivos impresos sobre el AC como soporte de impresión, con el fin de realizar posteriormente el test antibacteriano por difusión en agar. Los discos fueron obtenidos con ayuda de una perforadora sacabocados y una pinza estéril, la perforación se realizó de forma en que el material impreso se mantuvo intacto sin contacto con ningún objeto. Se perforaron 5 discos para cada tratamiento como se muestra en la Tabla 10 y se clasificaron en cajas Petri estériles como indica la Figura 37.

Tabla 10.

Distribución de discos para cada tratamiento con las bacterias seleccionadas

	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<b>Total parcial</b>
	<i>Ag-NPs (Q)</i>	<i>Ag-NPs (M) / PVB</i>	<i>Ag-NPs (Q)</i>	<i>Ag-NPs (M) / PVB</i>	
<b>Blanco Acetato de celulosa (CAE)</b>	5 discos	5 discos	5 discos	5 discos	20 discos
<b>Acetato con polímero impreso 5 capas (CB5)</b>	-	5 discos	-	5 discos	10 discos
<b>Acetato con polímero impreso 15 capas (CB15)</b>	-	5 discos	-	5 discos	10 discos
<b>Acetato con polímero impreso 30 capas (CB30)</b>	-	5 discos	-	5 discos	10 discos
<b>5 capas impresas</b>	5 discos	5 discos	5 discos	5 discos	20 discos
<b>15 capas impresas</b>	5 discos	5 discos	5 discos	5 discos	20 discos
<b>30 capas impresas</b>	5 discos	5 discos	5 discos	5 discos	20 discos
				<b>Total</b>	<b>110 discos</b>

Elaborada por Barrera &amp; Guerrero, 2017

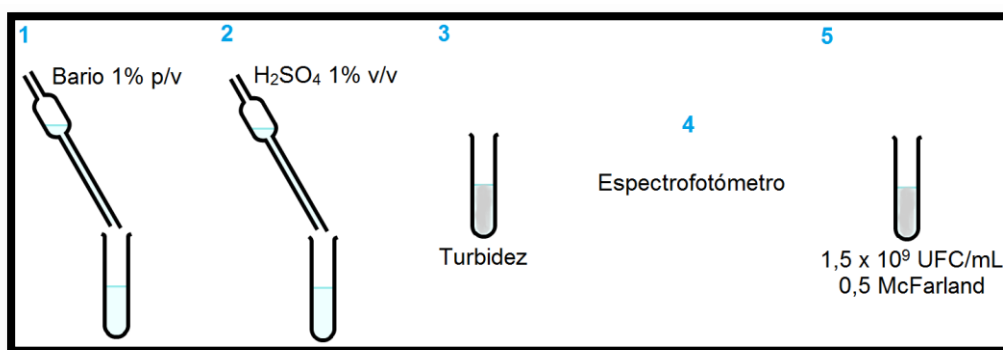


**Figura 37. Obtención mediante perforación de los discos con material impreso.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

### 3.9.2 Preparación del estándar 0.5 del nefelómetro de McFarland

La escala que utilizada fue de 0.5 que corresponde a la concentración de  $1.5 \times 10^9$  UFC/mL, para lo cual se colocó 0.5 mL de una solución de bario al 1% (1 g de bario en 100 mL de agua destilada) en un tubo de ensayo de 10 mL y se adicionó 9.5 mL de una solución de ácido sulfúrico al 1% (1 mL de  $H_2SO_4$  en 100 mL de agua destilada). Al medir la turbidez del nefelómetro de McFarland por densidad óptica en el espectrofotómetro a 625 nm, se obtuvo una absorbancia de 0.09, como se observa en la Figura 38.



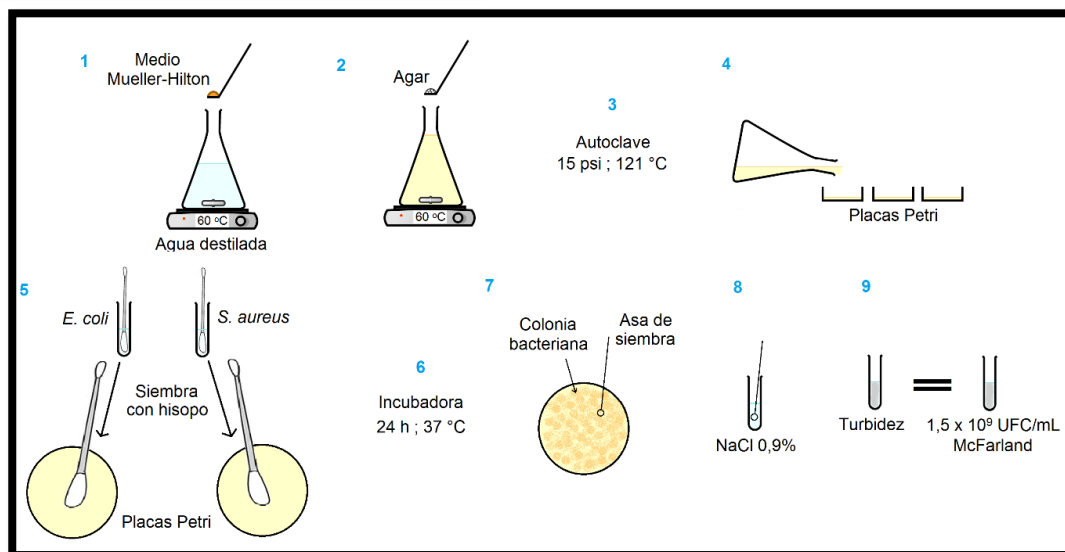
**Figura 38. Preparación del estándar 0.5 del nefelómetro de McFarland que equivale a  $1.5 \times 10^9$  UFC/mL.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

### 3.9.3 Preparación de los inóculos bacterianos

La preparación de los inóculos bacterianos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se realizaron y ajustaron a la escala de McFarland preparada previamente. Inicialmente se preparó una solución de 6.5% p/v (65 g de medio en 1000 mL de agua destilada) de medio Mueller-Hinton en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL, dicha mezcla se colocó en agitación constante a 60 °C para posteriormente se agregó 20 g de agar. El medio preparado se autoclavó a 15 psi de presión a 121 °C. A continuación, dentro de la cámara de flujo laminar, se vertió el medio de cultivo listo en las cajas Petri previamente autoclavadas en un volumen de 25 mL por caja y se esperó a su solidificación.

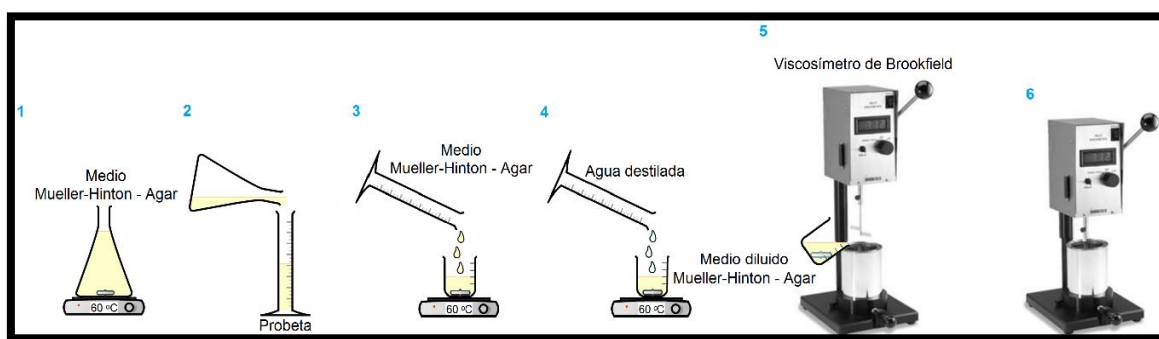
Se realizó una primera siembra bacteriana de cada microorganismo por separado, para obtener las bacterias puras en el medio de cultivo Mueller-Hinton preparado anteriormente. Se cultivó de manera uniforme con ayuda de un hisopo en toda la superficie de la caja Petri, y se incubó por 24 horas a 37 °C. Posteriormente se tomó material bacteriano a partir de colonias puras y se realizó una dilución en 10 mL de una solución salina de NaCl 0.9% (0.45 g de NaCl en 50 mL de agua destilada) hasta llegar a la turbidez deseada de 05 en la escala de McFarland, como resume la Figura 39.



**Figura 39. Preparación de los inóculos bacterianos según el estándar 0.5 del nefelómetro de McFarland que equivale a  $1.5 \times 10^9$  UFC/mL.**

### 3.9.4 Medición de la viscosidad aparente del medio de cultivo Mueller-Hinton – Agar

Se realizó diluciones del medio de cultivo, para ello recalentó el medio de cultivo en un matraz Erlenmeyer a 60 °C, con agitación constante hasta llegar a su estado líquido, se aforó el medio en una probeta de acuerdo a la alícuota necesaria, y a continuación se colocó en un vaso de precipitación y se adicionó agua en agitación constante y 60 °C de temperatura, finalmente se realizó las mediciones en el viscosímetro de Brookfield, como indica la Figura 40, y de esta forma se llegó a las concentraciones que se indican en la Tabla 11.



**Figura 40 . Medición de la viscosidad aparente del medio de cultivo Mueller-Hinton - Agar.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

**Tabla 11.**

**Concentraciones obtenidas de medio de cultivo**

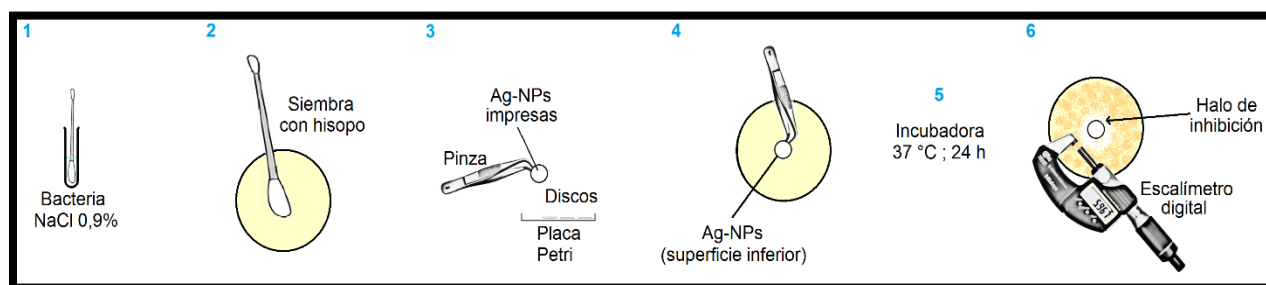
Concentraciones iniciales	Ecuación aplicada	Concentraciones finales
$C_{M-H} = 6.5 \% \text{ p/v}$ $C_{Agar} = 2 \% \text{ p/v}$	$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$	$C_{M-H} = 0.5 \% \text{ p/v}$
		$C_{Agar} = 0.154 \% \text{ p/v}$
		$C_{M-H} = 1 \% \text{ p/v}$
		$C_{Agar} = 0.308 \% \text{ p/v}$
		$C_{M-H} = 1.5 \% \text{ p/v}$
		$C_{Agar} = 0.462 \% \text{ p/v}$

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

### 3.9.5 Test de inhibición bacteriana

Se procedió a sembrar los microorganismos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en las cajas Petri donde previamente se vertió el medio preparado. Se tomó *E. coli* de la dilución salina con ayuda de un hisopo y se realizó la siembra en toda la superficie de la caja Petri. A continuación con ayuda de una pinza estéril se colocó los discos sobre la superficie de la siembra, de forma que el material impreso tenga contacto directo con la bacteria y se realizó el mismo procedimiento con *S. aureus*. Las cajas selladas con parafilm se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Después del tiempo de incubación se realizó la medición de la inhibición generada por los discos de dispositivos impresos con Ag-NPs (Q) y con Ag-NPs (M) / PVB, la medición se realizó con un escalímetro digital.



**Figura 41. Test de inhibición bacteriana en *E. coli* y *S. aureus*.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

## 3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 3.10.1 Supervivencia de *Artemia franciscana*

#### 3.10.1.1 Diseño experimental

En diseño experimental que se aplicó en un diseño factorial 2X3 ya que se evaluará la combinación de dos niveles: Tipo de material (PVB y AC) y Concentraciones de ambos. El

PVB se evaluó en tres concentraciones diferentes: 0.4, 0.8 y 1.2 mg/mL, mientras que el AC se evaluó a 1, 2 y 3 mg/mL. En la Tabla 12 se indica la matriz con el arreglo factorial 2X3.

### 3.10.1.2 Tratamientos

Se llevó a cabo seis tratamientos (2X3) debido a la combinación de los niveles mencionados.

**Tabla 12.**

**Tratamientos en la fase de supervivencia en *Artemia franciscana***

Tratamiento	Tipo de material	Concentración del material (mg/ml)
T1	PVB	0.4
T2	PVB	0.8
T3	PVB	1.2
T4	Acetato	1
T5	Acetato	2
T6	Acetato	3

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

### 3.10.1.3 Repeticiones

Como se mencionó anteriormente, para este ensayo se realizó cinco repeticiones para cada tratamiento con dos controles.

### 3.10.1.4 Variables

**Variable de respuesta:** La variable de respuesta la supervivencia que presenten las artemias en contacto con los diferentes materiales y sus concentraciones, para lo cual se necesitó de lupas para contar los individuos que han muerto.



### 3.10.1.5 Modelo estadístico

Para un modelo a x b tratamientos que se replican n veces, el diseño se estableció por:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, 2, \dots a; j = 1, 2, \dots b; k = 1, 2, \dots n$$

Donde  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  es el efecto debido al  $i$ -ésimo nivel del factor A,  $\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo nivel del factor B,  $(\alpha\beta)_{ij}$  representa al efecto de interacción en la combinación  $ij$  y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error aleatorio que se supone sigue una distribución normal con media cero y varianza constante  $\sigma^2(N(0, \sigma^2))$  y son independientes entre sí.

Para las variables descritas, la evaluación se realizó a las 24 horas de contacto entre los materiales y las artemias. El análisis estadístico se efectuó con un análisis de varianza (ANOVA).

### 3.10.1.6 Error aleatorio y error experimental

Se consideró error aleatorio a la variabilidad producida por: temperatura, luz y aireación. El error experimental se consideró debido a la manipulación de los individuos durante el proceso por parte de las investigadoras.

### 3.10.1.7 Análisis

El análisis de los resultados se llevó a cabo en el programa estadístico IBM SPSS® (Student version).

### 3.10.1.8 Interpretación

Los resultados se interpretaron con el fin de crear el dispositivo más favorable posible, es decir, que pueda ser confiable e inocuo con respecto al soporte y polímero utilizados.

### 3.10.1.9 Conclusiones

De acuerdo con la supervivencia de las artemias en contacto con los materiales, se pudo determinar la toxicidad de éstos, y así indicar si los dispositivos son aptos para usarse en alguna industria sin generar toxicidad.

### 3.10.2 Test de inhibición bacteriana

#### 3.10.2.1 Diseño experimental

En diseño experimental que se aplicó en un diseño factorial 2X3 para la evaluación de la combinación de dos niveles: Tipos de bacterias y Números de capas de impresión para las Ag-NPs (Q). Se evaluaron dos factores de tipo cualitativo: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, frente a tres factores cuantitativos según el número de capas de impresión de cada dispositivo: 5, 15 y 30 capas de impresión con Ag-NPs (Q). En la Tabla 12. A se indica la matriz con el arreglo factorial 2X3 descrito.

Para los nanocompuestos poliméricos formados de Ag-NPs (M) / PVB, de igual forma se utilizó un diseño factorial 2X3 para evaluar la combinación de dos niveles: Tipos de bacterias y Número de capas de impresión. Los dos factores de tipo cualitativo son *S. aureus* y *E. coli* y estos se evaluaron frente a tres factores cuantitativos referidos al número de capas de impresión por dispositivo: 5, 15 y 30. En la Tabla 12. B se indica también la matriz factorial 2X3 explicado.

#### 3.10.2.2 Tratamientos

Se llevó a cabo seis tratamientos (2X3), debido a la combinación de niveles según tipo de bacteria y el número de capas de impresión con Ag-NPs (Q) (Tabla 13. A), y seis tratamientos (2X3) determinados también por la combinación del tipo de bacteria y el número de capas de impresión Ag-NPs (M) / PVB, como indica la Tabla 13. B.

**Tabla 13.****Tratamientos en la fase de inhibición bacteriana**

<b>(A) Dispositivo con Ag-NPs (Q) impresas sobre acetato como soporte de impresión</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Tipo de bacteria</b>	<b>Número de capas</b>
T1	<i>E. coli</i>	5
T2	<i>E. coli</i>	15
T3	<i>E. coli</i>	30
T4	<i>S. aureus</i>	5
T5	<i>S. aureus</i>	15
T6	<i>S. aureus</i>	30
<b>(B) Dispositivo con Ag-NPs (M) /PVB impresas sobre acetato como soporte de impresión</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Tipo de bacteria</b>	<b>Número de capas</b>
T1	<i>E. coli</i>	5
T2	<i>E. coli</i>	15
T3	<i>E. coli</i>	30
T4	<i>S. aureus</i>	5
T5	<i>S. aureus</i>	15
T6	<i>S. aureus</i>	30

Elaborada por Barrera &amp; Guerrero, 2017

**3.10.2.3 Repeticiones**

Para el ensayo de la actividad antibacteriana de los dispositivos impresos con Ag-NPs (Q) y con Ag-NPs (M) / PVB, se realizó cinco repeticiones para cada tratamiento, incluyendo un control que son los discos de acetato de celulosa puro esterilizado con alcohol al 70%, para Ag-NPs (Q) y para Ag-NPs (M) / PVB se usó los discos de acetato de celulosa puro esterilizado con alcohol al 70%, y los discos de polímero PVB.

#### **3.10.2.4 Variables**

*Variable de respuesta:* La variable de respuesta fue el halo de inhibición bacteriano generado, por cada dispositivo impreso según el número de capas de impresión, en cada tipo de bacteria.

#### **3.10.2.5 Modelo estadístico**

Se realizó el mismo modelo estadístico para el test de ecotoxicidad con *Artemia franciscana*. En este caso, la evaluación se realizó a las 24 horas de inoculación de las bacterias con los dispositivos. El análisis estadístico consistió en efectuar un análisis de varianza (ANOVA).

#### **3.10.2.6 Error aleatorio y error experimental**

Se consideró como error aleatorio a la variabilidad producida por: temperatura y luz. El error experimental se consideró debido a la siembra de los microorganismos durante el proceso por parte de las investigadoras.

#### **3.10.2.7 Análisis**

El análisis de los resultados se llevó a cabo en el programa estadístico IBM SPSS® (Student version).

#### **3.10.2.8 Interpretación**

Los resultados se interpretaron con el fin de determinar el dispositivo con el mejor efecto bactericida, observado en relación con el número de capas de impresión y con el tipo de microorganismo bacteriano.

### 3.10.2.9 Conclusiones

De acuerdo con la inhibición bacteriana obtenida, se determinó el mejor dispositivo con efecto antibacterial en relación al número de capas de impresión y al tipo de bacteria.

## 3.11 HIPÓTESIS

### 3.11.1 Hipótesis para la Supervivencia de *Artemia franciscana*

**Ho:** Existe influencia en la supervivencia de *Artemia franciscana* frente al contacto con el polímero PVB y el soporte de impresión AC en diferentes concentraciones.

**Hi:** No existe influencia en la supervivencia de *Artemia franciscana* frente al contacto con el polímero PVB y el soporte de impresión AC en diferentes concentraciones.

### 3.11.2 Hipótesis para la Inhibición bacteriana

**Ho:** Presencia inhibición bacteriana con ambos tipos de dispositivos impresos (Ag-NPs (Q) y con Ag-NPs (M) / PVB), según el número de capas en ambos tipos de bacterias (*E. coli* y *S. aureus*).

**Hi:** Ausencia inhibición bacteriana con ambos tipos de dispositivos impresos (Ag-NPs (Q) y con Ag-NPs (M) / PVB), según el número de capas en ambos tipos de bacterias (*E. coli* y *S. aureus*).

### 3.12 OPERATIVIDAD DE LAS VARIABLES

La operatividad de las variables y sus factores determinados se indican en la Tabla 14:

**Tabla 14.**

#### **Operatividad de Variables**

<b>Variables</b>	<b>Factor a determinar</b>
<b>Supervivencia en artemias</b>	Número de artemias sobrevivientes después de 24 horas de contacto con PVB y con acetato de celulosa.
<b>Inhibición bacteriana</b>	Halo de inhibición (mm) después de 24 horas de contacto con los dispositivos.

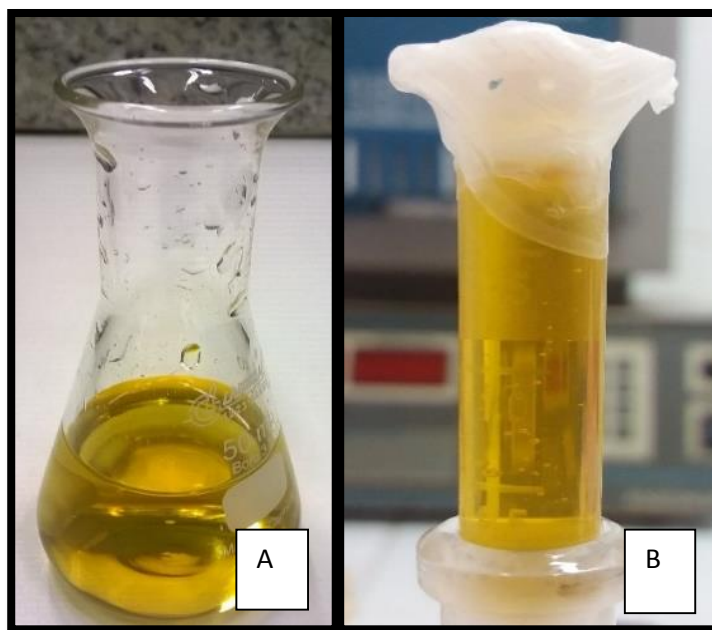
Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

## 4 CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS

Las nanopartículas de plata obtenidas tanto por el método químico como por irradiación microondas se tornaron de color transparente a amarillo intenso al finalizar la síntesis, como indica la Figura 42. Cabrera y sus colaboradores (2008), mencionan que el color amarillo es un indicativo característico de las suspensiones coloidales con la formación e nanopartículas de plata de 30 nm aproximadamente.



**Figura 42. Síntesis de Ag-NPs, A. Por método químico. B. Por microondas.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

#### 4.1.1 Caracterización de nanopartículas

##### 4.1.1.1 Espectroscopía ultravioleta – visible (UV-VIS)

En este análisis se confirmó la presencia de nanopartículas de plata tras las síntesis realizadas. En la Tabla 15 se detalla los resultados de la espectroscopía UV-VIS de las nanopartículas sintetizadas por el método químico Ag-NPs (Q), donde se incluyen tres repeticiones de la medición, con los valores de la longitud de onda máxima de la resonancia del plasmón de superficie de la plata que representan los picos máximos de absorción y la absorbancia, siendo el promedio de la absorción máxima 425.3 nm (Madrid, 2017).

**Tabla 15.**

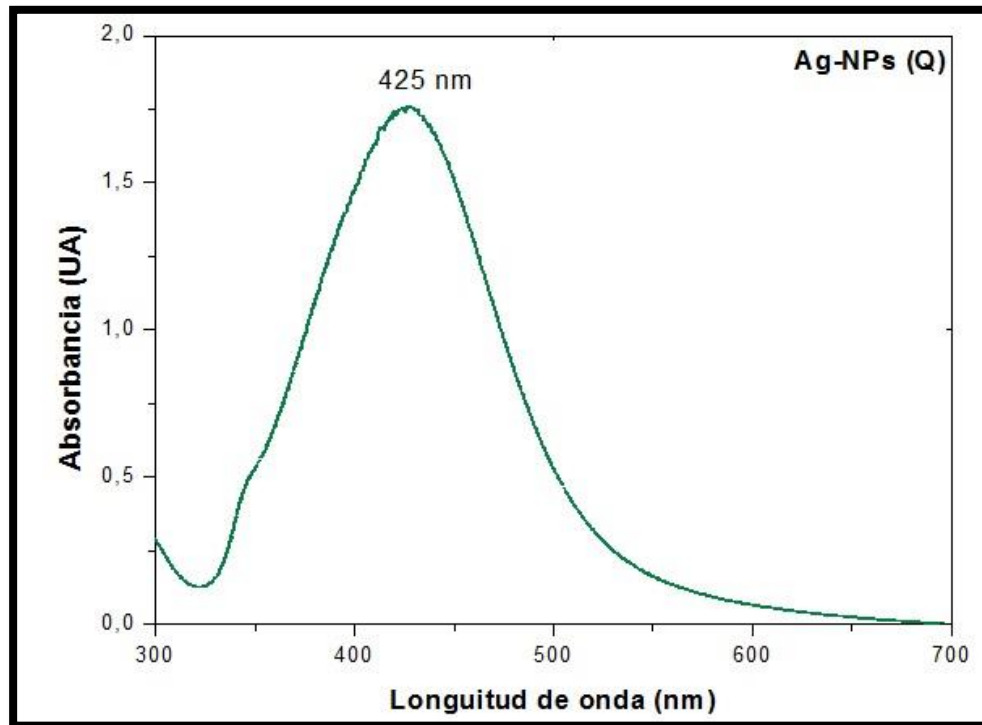
**Espectros UV-VIS obtenidos en la síntesis de Ag-NPs por el método químico**

<b>Ag-NPs (Q) Muestras</b>	<b>Pico máximo de absorción (nm)</b>	<b>Absorbancia (S.U.)</b>
<b>1</b>	425.3	1.778
<b>2</b>	425.3	1.789
<b>3</b>	425.3	1.757
<b>Promedio</b>	425.3	1.775

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

En la Figura 43 se muestra una medida realizada con el espectro UV-VIS de las Ag-NPs (Q) sintetizadas.





**Figura 43. Espectro UV-VIS de la síntesis de Ag-NPs por el método químico.**

**Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017**

Las mediciones realizadas de las nanopartículas sintetizadas por irradiación microondas Ag-NPs (M) se encuentran detalladas en la Tabla 16, de la misma forma se ejecutaron tres repeticiones de la medición, con los valores de la longitud de onda máxima de la resonancia de plasmón de la superficie de la plata y la absorbancia, donde el promedio de la absorción máxima obtenida fue 421.2 nm (Madrid, 2017).

Tabla 16.

Espectros UV-vis obtenidos en la síntesis de Ag-NPs por irradiación microondas

Ag-NPs (M) Muestras	Pico máximo de absorción (nm)	Absorbancia S.U.
1	421.2	0.895
2	421.2	0.892
3	421.2	0.894
<b>Promedio</b>	421.2	0.894

Elaborada por Barrera &amp; Guerrero, 2017

En la Figura 44 se muestra una medida realizada con el espectro UV-VIS de las Ag-NPs (M) sintetizadas.

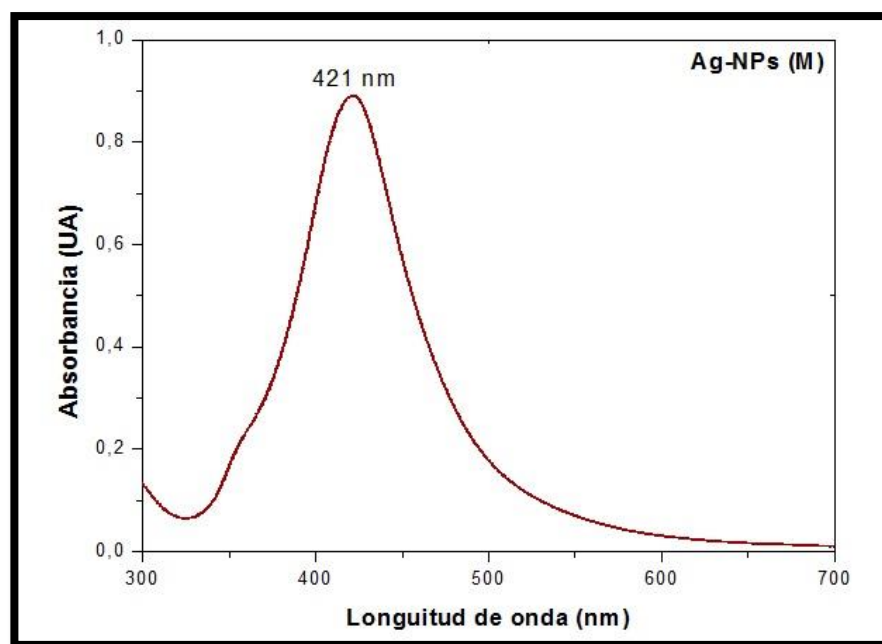


Figura 44. Espectro UV-VIS de la síntesis de Ag-NPs por irradiación microondas.

Elaborada por Barrera &amp; Guerrero, 2017

Según Escobar (2015), los datos obtenidos del UV-VIS pueden determinar el tamaño aproximado de la partícula, ya que está íntimamente relacionado con el valor del pico máximo de absorción, como indica la Tabla 17.

**Tabla 17.**

**Relación entre la posición del pico máximo de absorción y el tamaño aproximado de nanopartículas formadas**

Tamaño de partícula (nm)	Posición del pico (nm)	Color observado
5 – 10	380 – 390	Verde
10 – 14	395 – 405	Amarillo
35 – 50	420 – 435	Amarillo
60 – 80	438 - 450	Amarillo

Fuente: (Journal of Chemical Education, 2007).

Adaptada por Barrera & Guerrero, 2017.

El valor promedio del pico máximo de absorción de 425.3 nm, obtenido en la medición de la longitud de onda de Ag-NPs (Q) por espectroscopía, se encuentra próximo a la posición del pico 430 nm, y según Escobar (2015), esto indica un tamaño aproximado de 35 – 50 nm de diámetro de las nanopartículas sintetizadas por el método químico. De igual forma, al comparar el valor promedio de 421.2 nm del pico máximo de absorción de Ag-NPs (M) con los valores de la Tabla 17, el tamaño aproximado de las nanopartículas sintetizadas por irradiación microondas es de 35 – 50 nm (Escobar, 2015).

Según Morales y colaboradores (2009), las longitudes de onda medidas que se encuentran entre 400 y 450 nm, indican la presencia de nanopartículas metálicas de 30 nm de diámetro aproximadamente.

#### **4.1.1.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)**

Mediante la utilización del DLS HORIBA LB-550 Dynamic Light Scattering Nanoparticle Size Analyzer, se determinaron los diferentes diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas sintetizadas por ambos métodos, a través de histogramas de distribución como se observa en la Figura 45.

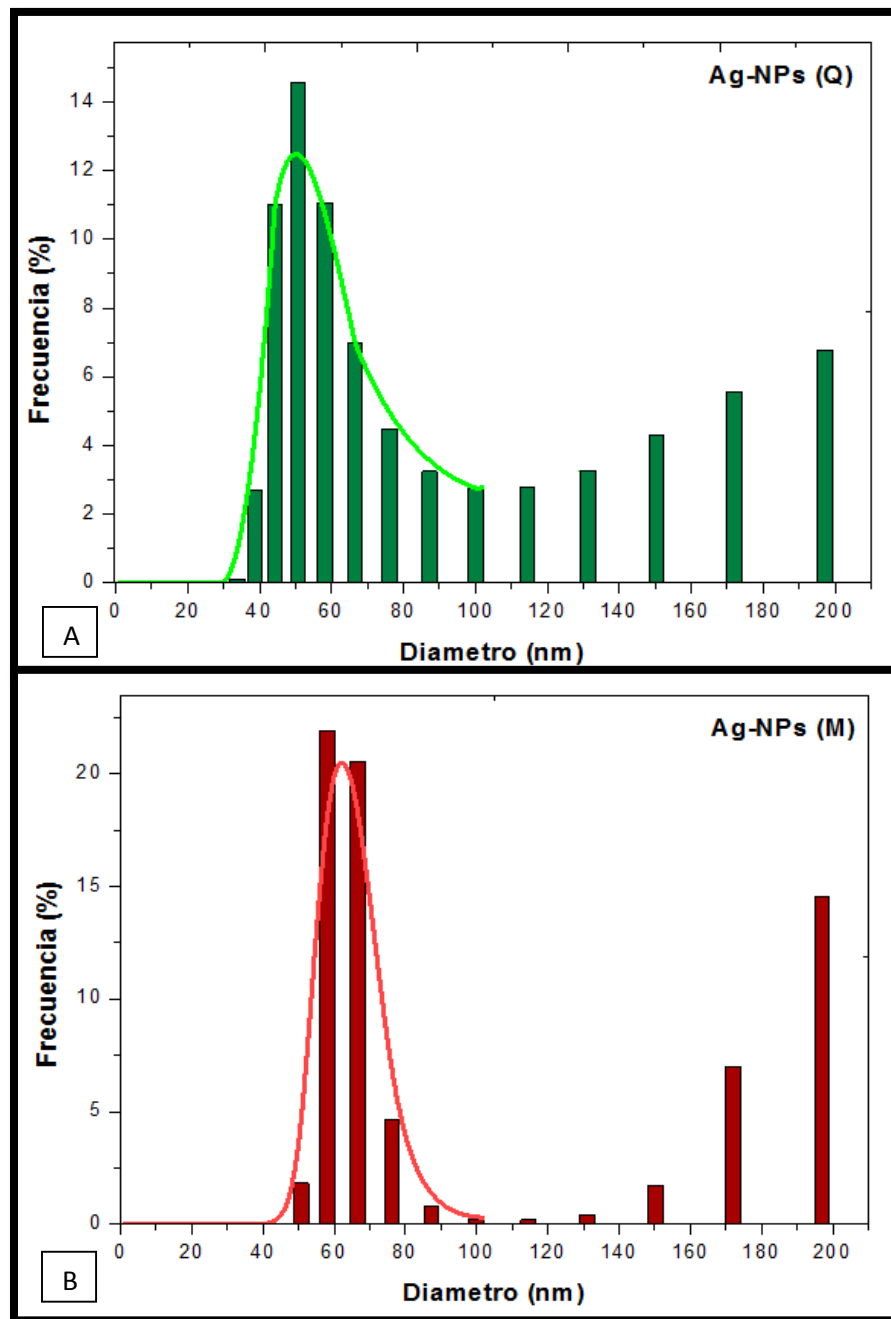


Figura 45. Análisis de DLS para nanopartículas de ambas síntesis, A. Ag-NPs (Q). B. Ag-NPs (M).

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

Con los datos obtenidos se estableció el diámetro promedio y la desviación estándar del área bajo la curva, tanto para Ag-NPs (Q) y Ag-NPs (M), los cuales son  $59.59 \pm 15.8$  nm y  $64.29 \pm 8.62$  nm respectivamente. En ambos histogramas se pudo observar que la mayoría de nanopartículas son menores de 100 nm, teniendo un 65.6% de Ag-NPs (Q) y 58% de Ag-NPs (M) menores a 100 nm.

Según Ávalos y colaboradores (2013), los radios hidrodinámicos permiten conocer un valor aparente del diámetro de las nanopartículas, ya que éste incluye no solo el núcleo de plata sino también la capa de estabilizante y/o la capa eléctrica adquirida en la superficie de la partícula, debido a lo cual se estima que el diámetro promedio de las nanopartículas obtenidas por ambos procesos síntesis es menor a 80 nm; lo que se determinará con el STEM y TEM.

El coeficiente de difusión, depende de la viscosidad dinámica como fue explicado anteriormente. A pesar de que el medio de cultivo tiene un comportamiento de fluido no newtoniano, debido a la naturaleza del mismo, se realizó diluciones del medio con el fin de extrapolar datos hasta la concentración utilizada  $C_{M-H} = 6.5\%$  p/v y  $C_{Agar} = 2\%$  p/v en el cultivo bacteriano, como indica la Tabla 18, y de esta forma determinar la viscosidad a esa concentración a la temperatura de  $35.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que fue la temperatura más aproximada que permitió el viscosímetro Brookfield Ametek®, con respecto a la temperatura de incubación de  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Guzmán, 2015).

**Tabla 18.**

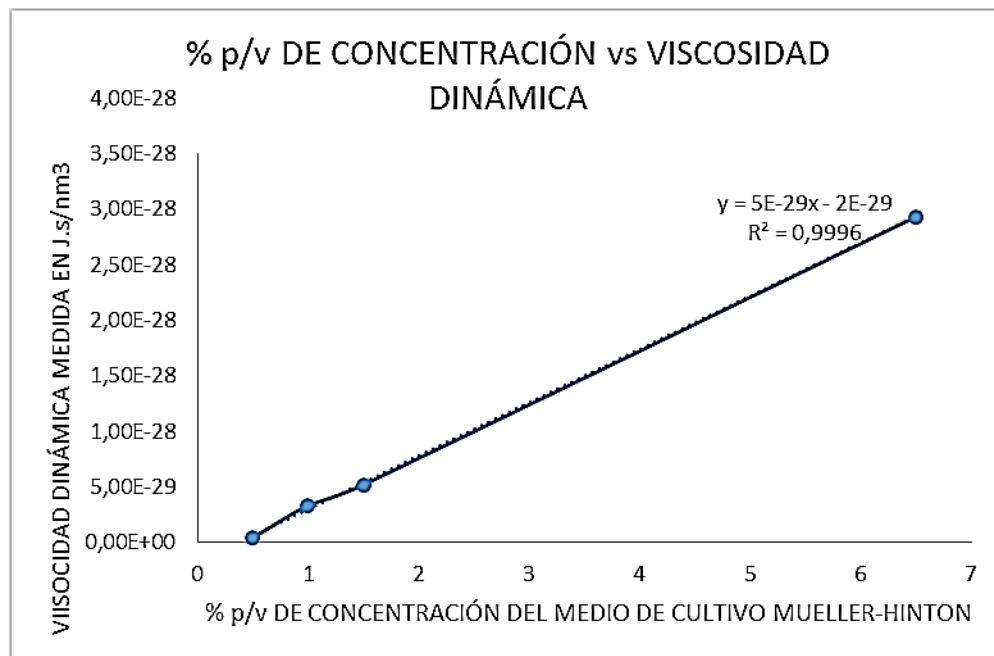
**Mediciones de la viscosidad dinámica del medio de cultivo Mueller-Hinton preparado con agar.**

<b>Viscosidad dinámica calculada del medio de cultivo, tomando como referencia el porcentaje de concentración del medio de cultivo Mueller-Hinton</b>		
<b>Concentraciones utilizadas</b>	<b>Viscosidades medidas</b>	<b>Viscosidades medidas</b>
<b>(% p/v)</b>	<b>(cP)</b>	<b><math>\left(\frac{\text{J}\cdot\text{s}}{\text{nm}^3}\right)</math></b>
$C_{M-H} = 0.5$	$\eta = 4$	$\eta = 4 \times 10^{-30}$



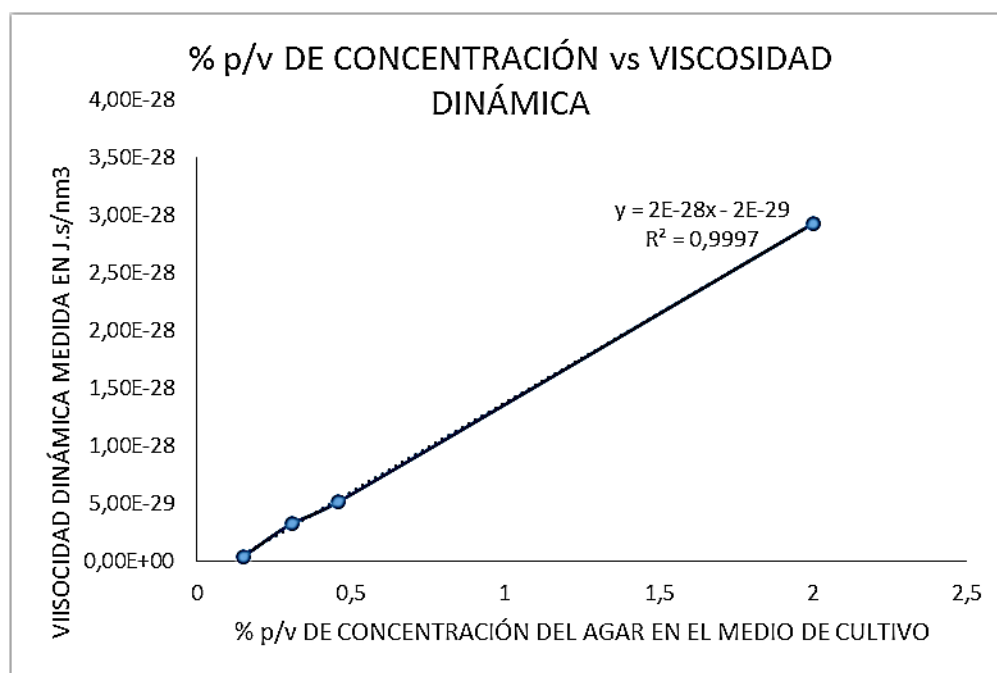
$C_{\text{Agar}} = 0.154$		
$C_{\text{M-H}} = 1$ $C_{\text{Agar}} = 0.308$	$\eta = 33.3$	$\eta = 3.33 \times 10^{-29}$
$C_{\text{M-H}} = 1.5$ $C_{\text{Agar}} = 0.462$	$\eta = 51.8$	$\eta = 5.18 \times 10^{-29}$
<b>Viscosidad dinámica calcula del porcentaje de concentración del medio de cultivo Mueller-Hinton</b>		
$C_{\text{M-H}} = 6.5$ $C_{\text{Agar}} = 2$	$\eta_f = 292.6$	$\eta_f = 2.926 \times 10^{-28}$

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017



**Figura 46. Relación entre la concentración del medio de cultivo Mueller-Hinton y la viscosidad dinámica del medio usado para la siembra bacteriana.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017



**Figura 47. Relación entre la concentración del agar en el medio de cultivo usado para la siembra bacteriana y su viscosidad dinámica.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

En la Figura 46 el coeficiente de determinación  $R^2$  en la relación entre la concentración del medio de cultivo Mueller-Hinton y la viscosidad dinámica del medio usado para la siembra bacteriana, tiene un valor de 0.9996, lo que indica un ajuste al modelo que satisface la variabilidad de la viscosidad, y lo mismo ocurre en la Figura 47, donde el coeficiente de determinación  $R^2$  en la relación entre la concentración del agar en el medio de cultivo usado para la siembra bacteriana y su viscosidad dinámica es 0.9997 (Martinez, 2005).

Los diámetros hidrodinámicos obtenidos por DLS junto con la viscosidad dinámica y los demás parámetros descritos, permitieron conocer el coeficiente de difusión de las nanopartículas tanto para aquellas sintetizadas por el método químico, así como por irradiación microondas, estos diámetros se muestran en la Tabla 19.

**Tabla 19.****Coefficientes de difusión de las Ag-NPs sintetizadas en el medio de cultivo Mueller-Hinton**

<b>Coefficientes de difusión en el medio de cultivo Mueller-Hinton</b>			
<b>Tipo de Ag-NPs (nm)</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Coefficiente de Difusión nm<sup>2</sup>/s</b>	<b>Coefficiente de Difusión cm<sup>2</sup>/s</b>
<b>Ag-NPs (Q)</b> d(H) = 80.97	$D = \frac{kT}{3\pi d(H)\eta}$ donde:	D = 19068.99973	D = 1.906899973x10 <sup>-8</sup>
<b>Ag-NPs (M)</b> d(H) = 87.84	k = 1.38064852 x 10 <sup>-23</sup> JK <sup>-1</sup> T = 298 K $\eta = 2.926 \times 10^{-28}$ J.s/nm <sup>3</sup>	D = 17577.60597	D = 1.757760597x10 <sup>-8</sup>

Elaborada por Barrera &amp; Guerrero, 2017

Es importante recalcar que el coeficiente de difusión calculado depende de la viscosidad dinámica, y como el medio de cultivo Mueller-Hinton mezclado con agar tiene un comportamiento de fluido no Newtoniano reopéctico, la viscosidad encontrada es una viscosidad aparente, que depende de la velocidad de la deformación aplicada y del tiempo (Cabrejos 2011).

**4.1.1.3 Difracción de Rayos- X (XRD)**

La estructura cristalina de la plata según Callister (2007) es cúbica centrada en las caras FCC como se indica en la Tabla 20.



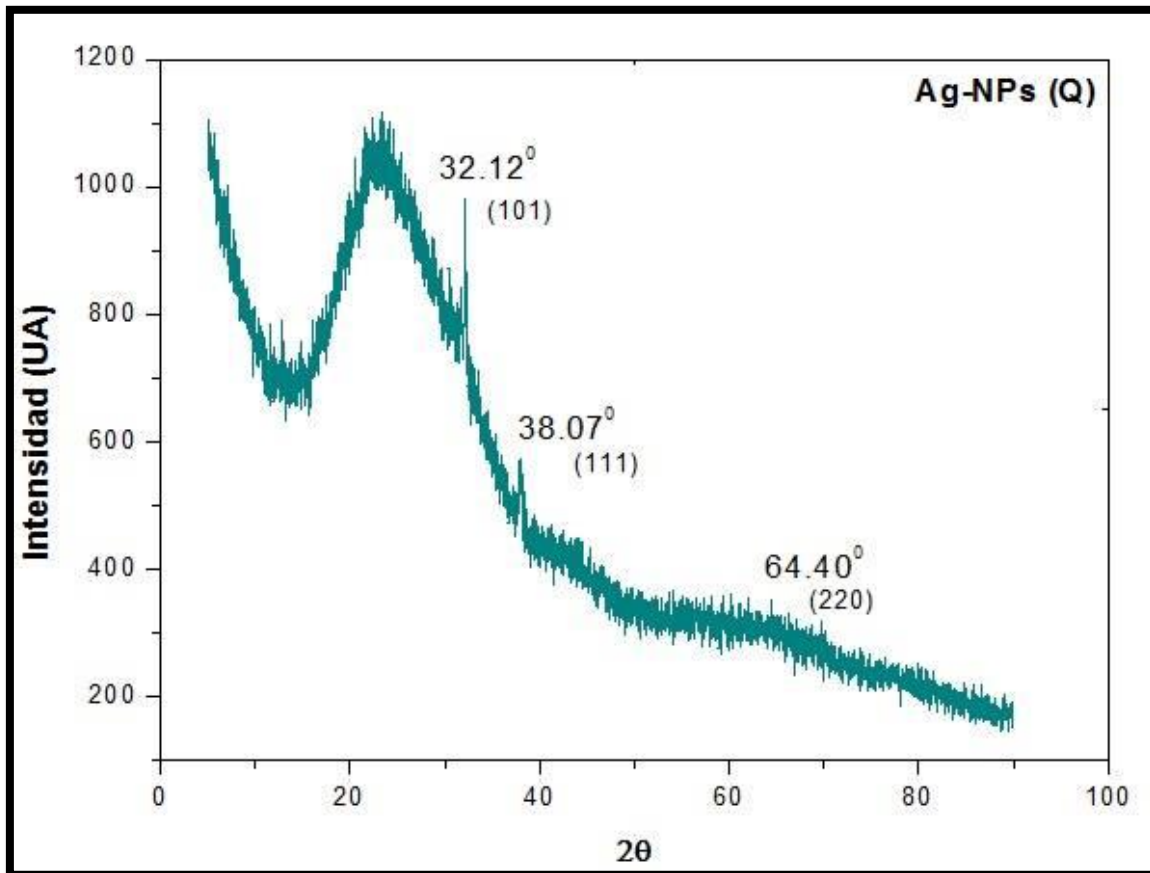
**Tabla 20.**  
**Radios atómicos y estructuras cristalinas de 16 metales**

<b>Metal</b>	<b>Estructura cristalina</b>	<b>Radio atómico a (nm)</b>	<b>Radio atómico a (Å)</b>
<b>Aluminio</b>	FCC	0.1431	1.431
<b>Cadmio</b>	HC	0.1490	1.490
<b>Cromo</b>	BCC	0.1249	1.249
<b>Cobalto</b>	HC	0.1253	1.253
<b>Cobre</b>	FCC	0.1278	1.278
<b>Oro</b>	FCC	0.1442	1.442
<b>Hierro (<math>\alpha</math>)</b>	BCC	0.1241	1.241
<b>Plomo</b>	FCC	0.1750	1.750
<b>Molibdeno</b>	BCC	0.1363	1.363
<b>Níquel</b>	FCC	0.1246	1.246
<b>Platino</b>	FCC	0.1387	1.387
<b>Plata</b>	FCC	0.1445	1.445
<b>Tántalo</b>	BCC	0.1430	1.430
<b>Titanio</b>	HC	0.1445	1.445
<b>Tungsteno</b>	BCC	0.1371	1.371
<b>Zinc</b>	HC	0.1332	1.332

Fuente: (Callister, 2017).

Adaptada por Barrera & Guerrero, 2017

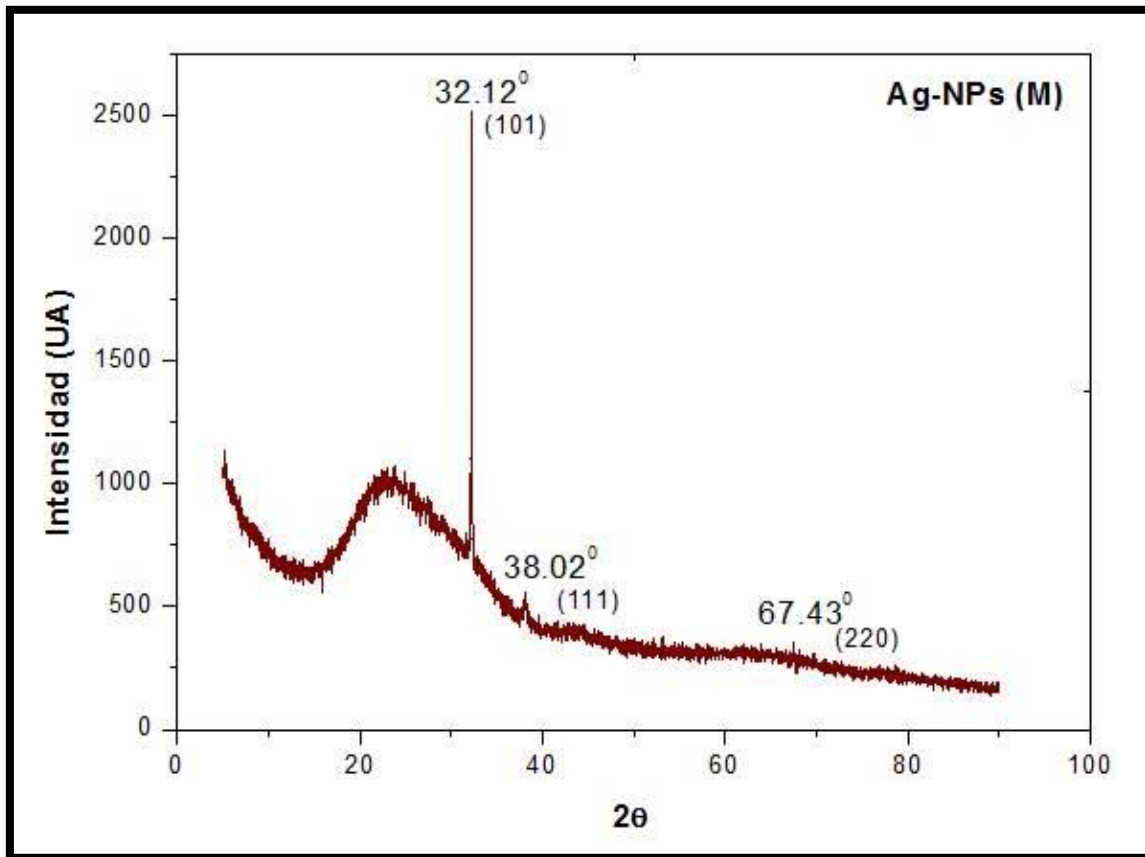
En la Figura 48, se observa el resultado del análisis hecho en XRD PANalytical Empyrean para las Ag-NPs (Q), donde se indican picos de ángulo  $2\theta$ :  $32,12^\circ$ ,  $39,07^\circ$  y  $64,4^\circ$  que según Amutha (2014), corresponde al conjunto de planos (101), (111) y (220) respectivamente.



**Figura 48. Análisis XRD para Ag-NPs (Q)**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

Para las Ag-NPs (M) se obtuvieron los picos de ángulo  $2\theta$ :  $32,12^\circ$  y  $38,02^\circ$  que corresponden a los planos (101), (111) respectivamente (Amutha, 2014), y según Marslin (2017), el pico de  $67,43^\circ$  corresponde al conjunto de planos (220) como indica la Figura 49.

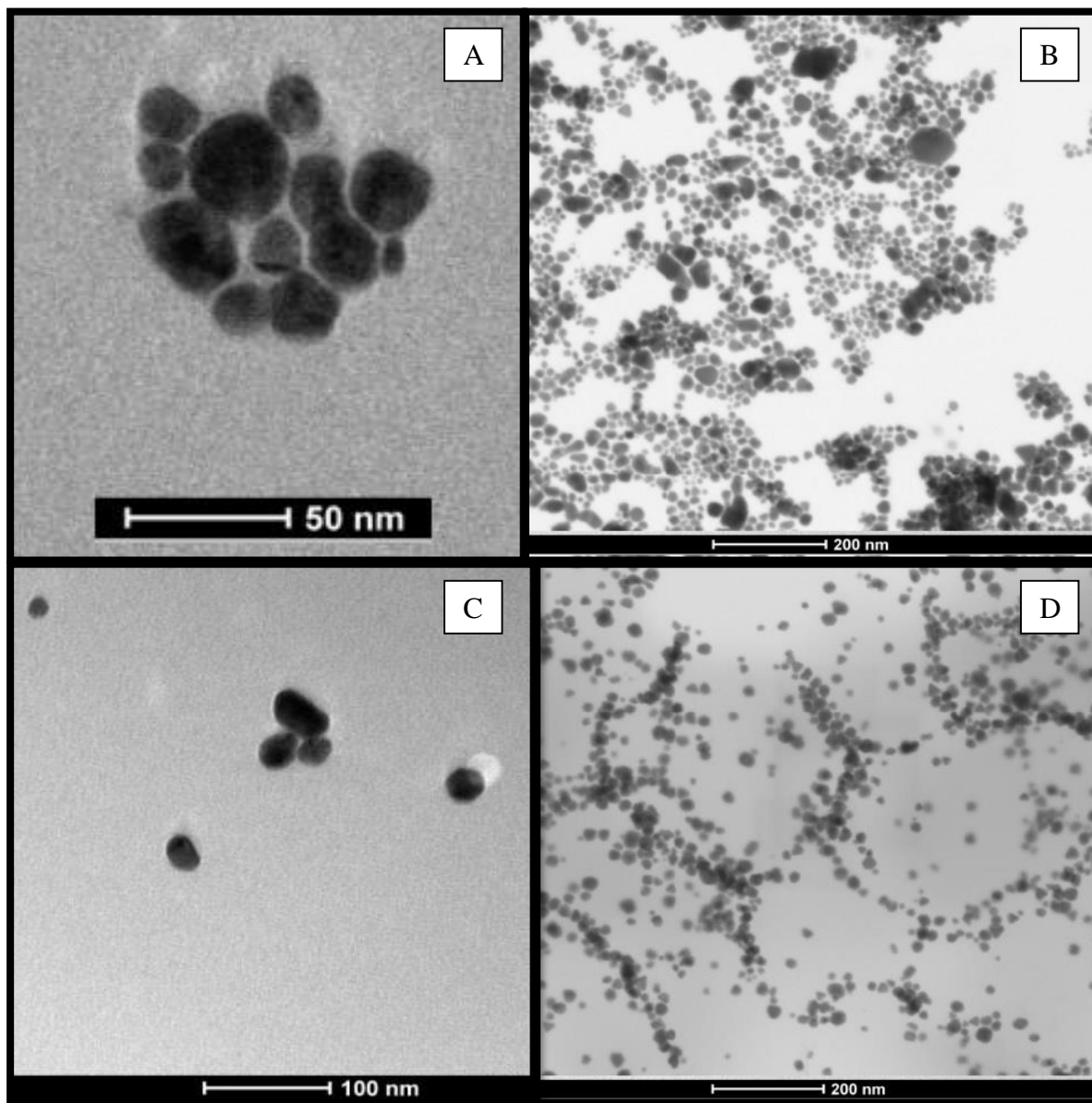


**Figura 49. Análisis XRD para Ag-NPs (M)**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

#### **4.1.1.4 Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido en modo Transmisión (STEM) y Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM)**

Con el fin de observar el tamaño promedio y la forma de las NPs sintetizadas por ambos métodos (tanto químico como por irradiación microondas), se realizó la caracterización de las Ag-NPs mediante STEM Tescan MIRA 3 FEG SEM y TEM FEI-TECNAI G20 SPIRIT TWIN. Tanto Ag-NPs (Q) como Ag-NPs (M), la morfología observada es esférica y se encuentran dispersas sin presencia de aglomerados como se puede observar en la Figura 50.

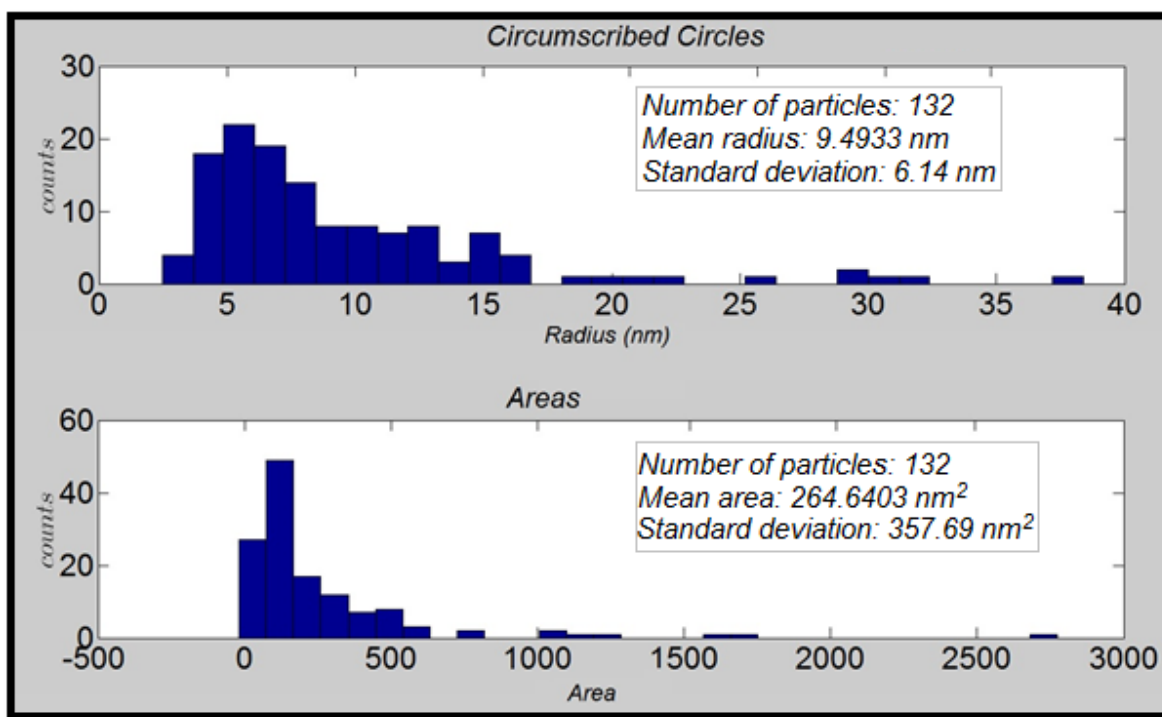


**Figura 50. Imágenes de TEM / STEM para ambos métodos de síntesis. A. TEM de Ag-NPs (Q). B. STEM de Ag-NPs (Q). C. TEM de Ag-NPs (M). D. STEM de Ag-NPs (M)**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

La Figura 50 B y la Figura 50 D fueron analizadas en el Software NanoSize<sup>TM</sup> para determinar el diámetro promedio de las Ag-NPs obtenidas por ambos métodos de síntesis, así como el área promedio que ocupan; dicho Software fue desarrollado en el CENCINAT

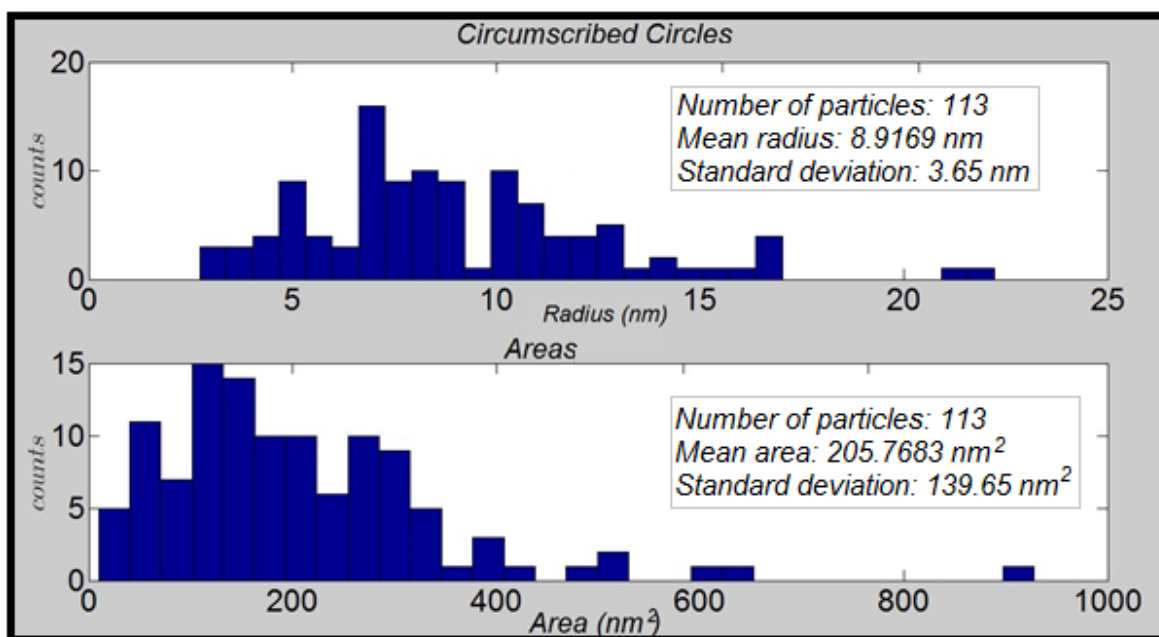
perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (Arroyo et al., 2016). Para la obtención de los histogramas de distribución, se tomó una zona de cada imagen y de esta manera realizar un conteo de aproximadamente 100 NPs. En la Figura 50 B fueron analizadas 132 Ag-NPs (Q), en la cual se obtuvo un diámetro promedio de  $18.9 \pm 12.28$  nm y un área promedio de  $264.6 \pm 357.69$  nm<sup>2</sup> como se muestra en la Figura 51.



**Figura 51. Histograma de distribución de Ag-NPs (Q) obtenido por el Software NanoSize™.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

En la Figura 50 D se analizó 113 Ag-NPs (M), en la cual se obtuvo un diámetro promedio de  $17.83 \pm 7.3$  nm y un área promedio de  $205.77 \pm 139.65$  nm<sup>2</sup> como se muestra en la Figura 52.



**Figura 52. Histograma de distribución de Ag-NPs (M) obtenido por el Software NanoSize™.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

## 4.2 ANÁLISIS ECOTÓXICO EN *Artemia franciscana*

### 4.2.1 Mortalidad

**Tabla 21.**

**Mortalidad de *A. franciscana* con AC en diferentes concentraciones**

Mortalidad de <i>A. franciscana</i> con AC 1 mg/mL (24 horas)									
Artemias	Blanco 1	Blanco 2	% supervivencia o mortalidad	Pocillo 1	Pocillo 2	Pocillo 3	Pocillo 4	Pocillo 5	% supervivencia o mortalidad



Vivas	5	5	100%	5	5	5	3	5	92%
Muertas	0	0	0%	0	0	0	2	0	8%
<b>Mortalidad de <i>A. franciscana</i> con AC 2 mg/mL (24 horas)</b>									
<b>Artemias</b>	<b>Blanco 1</b>	<b>Blanco 2</b>	<b>% supervivencia o mortalidad</b>	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>	<b>Pocillo 4</b>	<b>Pocillo 5</b>	<b>% supervivencia o mortalidad</b>
Vivas	5	5	100%	5	4	4	4	5	88%
Muertas	0	0	0%	0	1	1	1	0	12%
<b>Mortalidad de <i>A. franciscana</i> con AC 3 mg/mL (24 horas)</b>									
<b>Artemias</b>	<b>Blanco 1</b>	<b>Blanco 2</b>	<b>% supervivencia o mortalidad</b>	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>	<b>Pocillo 4</b>	<b>Pocillo 5</b>	<b>% supervivencia o mortalidad</b>
Vivas	5	4	90%	5	5	4	3	5	88%
Muertas	0	1	10%	0	0	1	2	0	12%

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

Como se observa en la Tabla 21, al comparar el porcentaje de supervivencia de los individuos blancos con respecto a los individuos de estudio, se puede evidenciar claramente que la supervivencia en cada concentración de sustrato de impresión, dista mínimamente con respecto al porcentaje de supervivencia de los individuos blanco, por lo que de forma porcentual se determinó que no existe influencia del soporte de impresión AC, sobre la supervivencia de *A. franciscana* (Borroto et al., 2011).

Tabla 22.

Mortalidad de *A. franciscana* con PVB en diferentes concentraciones

<b>Mortalidad de <i>A. franciscana</i> con PVB 0.4 mg/mL (24 horas)</b>									
<b>Artemias</b>	<b>Blanco 1</b>	<b>Blanco 2</b>	<b>% supervivencia o mortalidad</b>	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>	<b>Pocillo 4</b>	<b>Pocillo 5</b>	<b>% supervivencia o mortalidad</b>
Vivas	4	5	90%	5	5	4	5	5	96%
Muertas	1	0	10%	0	0	1	0	0	4%
<b>Mortalidad de <i>A. franciscana</i> con PVB 0.8 mg/mL (24 horas)</b>									
<b>Artemias</b>	<b>Blanco 1</b>	<b>Blanco 2</b>	<b>% supervivencia o mortalidad</b>	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>	<b>Pocillo 4</b>	<b>Pocillo 5</b>	<b>% supervivencia o mortalidad</b>
Vivas	5	5	100%	4	5	5	5	4	92%
Muertas	0	0	0%	1	0	0	0	1	8%
<b>Mortalidad de <i>A. franciscana</i> con PVB 1.2 mg/mL (24 horas)</b>									
<b>Artemias</b>	<b>Blanco 1</b>	<b>Blanco 2</b>	<b>% supervivencia o mortalidad</b>	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>	<b>Pocillo 4</b>	<b>Pocillo 5</b>	<b>% supervivencia o mortalidad</b>
Vivas	5	4	90%	5	5	4	5	4	92%
Muertas	0	1	10%	0	0	1	0	1	8%

Elaborada por Barrera &amp; Guerrero, 2017



Lo mismo ocurre en la Tabla 22, donde se observa una diferencia mínima entre el porcentaje de supervivencia de los individuos blanco, y el porcentaje de supervivencia de los individuos de estudio, por lo tanto porcentualmente no existe influencia del polímero PVB en la supervivencia de *Artemia franciscana* (Borroto et al., 2011).

Según Borroto y sus colaboradores (2011), la toxicidad de sustancias expresada en porcentaje de mortalidad de artemias tiene cuatro categorías: de 0 a 10 % no tóxico; 11 a 50% medianamente tóxico; 51 a 90 % altamente tóxicos y 100 % extremadamente tóxicos, por lo cual el acetato de celulosa en una concentración de 1 mg/mL y el PVB en las tres diferentes concentraciones (0.4; 0.8 y 1.2 mg/mL) se consideran como no tóxicos.

El AC en las concentraciones de 2 y 3 mg/mL, dentro de la escala, se considera como medianamente tóxico, pero hay que tomar en cuenta que la manipulación de las artemias es de vital importancia para su supervivencia. La FAO (2016), recomienda utilizar una pipeta de vidrio de 1 mL, en la cual se corte la punta para evitar provocar daños en las artemia, y así generar errores de operador que afecten los ensayos. Además, la brusca manipulación de las artemias con las pipetas, como tomarlas y soltarlas rápidamente puede causar su muerte temprana. Los errores experimentales o de operador se consideraron con un margen de error máximo del 5%, por lo tanto el error presente en esta investigación (2%), permite determinar que el resultado obtenido no fue afectado por el acetato de celulosa.

#### **4.2.2 Análisis estadístico**

El análisis se realizó mediante un análisis de varianza ANOVA de un diseño factorial 2X3, en el programa estadístico IBM SPSS® (Student version). En la Tabla 23 se observa los p\_valores, cada uno de ellos indica el valor de significancia más pequeño posible, que puede escogerse para que aún se acepte la hipótesis nula, esto quiere decir que a través de pruebas de hipótesis, se puede cuantificar hasta que punto la variabilidad de la muestra de estudio es responsable de los resultados obtenidos, por lo tanto los p\_valores para los dos niveles: Tipo de sustrato (0.865) y Concentración de cada sustrato (0.523), son superiores al p\_valor 0.05, lo que quiere decir que con una seguridad del 95%, se acepta la hipótesis alternativa, esto

indica que no existe influencia de estos sobre la supervivencia de las artemias (Gutiérrez & de la Vara, 2012).

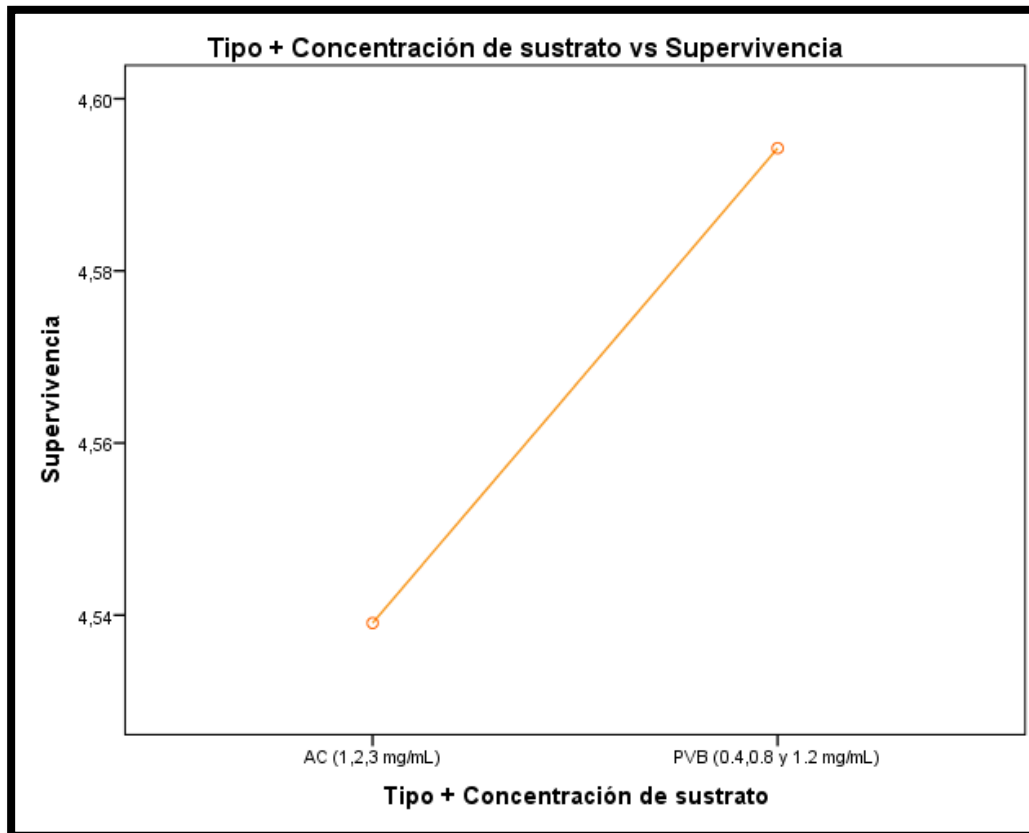
**Tabla 23.**

**Análisis de varianza ANOVA del diseño factorial 2X3 de la supervivencia de *Artemia franciscana***

<b>Pruebas de efectos inter-sujetos</b>					
Variable dependiente: Supervivencia					
<b>Origen</b>	<b>Tipo III de suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>p_valor</b>
<i>Modelo corregido</i>	0.469	2	0.234	0.581	0.566
<i>Intersección</i>	110.857	1	110.857	274.657	0.000
<i>Tipo de Sustrato</i>	0.012	1	0.012	0.029	0.865
<i>Concentración de sustrato</i>	0.169	1	0.169	0.419	0.523
<i>Error</i>	10.898	27	0.404		
<i>Total</i>	637.000	30			
<i>Total corregido</i>	11.367	29			

Elaborada en IBM SPSS® (Student version) por Barrera & Guerrero, 2017

En cuanto al p\_valor de la intersección entre el factor Tipo de sustrato y la covariable Concentración de sustrato es inferior al p\_valor 0.05, por lo tanto si existe influencia entre estos dos parámetros pero no influyen en la supervivencia de *Artemia franciscana* (Gutiérrez & de la Vara, 2012).



**Figura 53. Relación de la supervivencia de *Artemia franciscana* y el tipo y concentración de sustrato.**

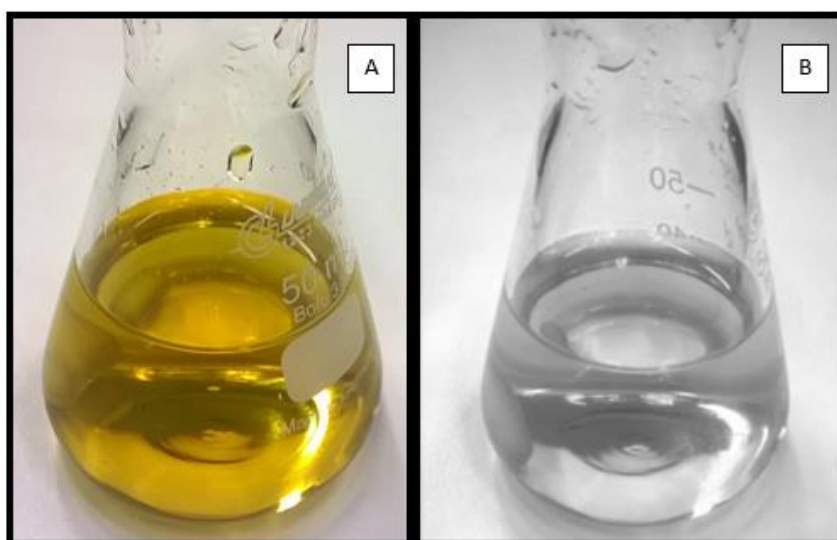
Elaborada en IBM SPSS® (Student version) por Barrera & Guerrero, 2017

Como se observa en la Figura 53, la supervivencia del crustáceo es mayor al tener contacto con PVB, sin embargo al estar en contacto con AC la supervivencia disminuye de forma mínima, por lo tanto, la supervivencia se ve vagamente afectada (Gutiérrez & de la Vara, 2012).

Debido a que los dos tipos de materiales por separado, no tuvieron influencia en la supervivencia de *A. franciscana*, los dispositivos impresos con ambos materiales pueden ser utilizados en la industria sin provocar toxicidad frente a un individuo vivo (Borroto et al., 2011).

### 4.3 AFINIDAD SOLVENTE – MATERIAL DE IMPRESIÓN NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR SISTESIS QUÍMICA

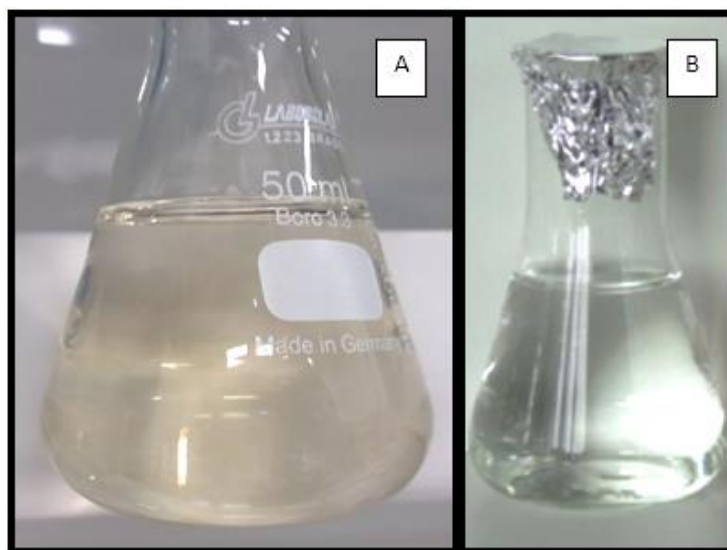
Las pruebas realizadas de combinación de Ag-NPs (Q) en contacto directo con etanol como solvente de impresión presentaron precipitación de las NPs dentro de las siguientes 24 horas de realizada la mezcla en cada una de las siete relaciones solvente-material evaluadas (Figura 54), como lo corrobora Díaz (2013), quien obtuvo la misma precipitación al día siguiente de preparada la solución (Ag-NPs / etanol).



**Figura 54. Ag-NPs (Q) con etanol. A. relación 1:1 (Ag-NPs (Q) / Etanol) al instante de la mezcla. B. relación 1:1 (Ag-NPs (Q) / Etanol) al día siguiente de la mezcla.**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

La combinación de Ag-NPs (Q) con etilenglicol generó la precipitación de las NPs a los 14 días de realizada la mezcla (Figura 55). El etilenglicol es uno de los reductores de NPs más utilizados, por lo que con el paso del tiempo las Ag-NPs (Q) continuaron su proceso de reducción hasta llegar a la aglomeración y su posterior precipitación (Pérez, 2010).



**Figura 55. Ag-NPs (Q) con etilenglicol. A. relación 1:1 (Ag-NPs (Q) / Etilenglicol) al día 7. B. relación 1:1 (Ag-NPs (Q) / Etilenglicol) al día 14.**

**Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017**

El PVB en etanol se combinó con etilenglicol como solvente de impresión, pero en cada una de las relaciones evaluadas polímero-solvente, se generó una masa densa en el centro de la solución, que según Seymour y Carraher (2002) esto se debe a una polimerización mediante reacciones químicas entre el PVB y etilenglicol por sus grupos funcionales.

#### **4.4 CURVA DE CALIBRACION WAVEFORM PARA LA IMPRESIÓN**

La curva de calibración es la función más importante del software de control de fluidos, en ella se controla el pulso aplicado por cada eyector para expulsar la gota. La calibración de la curva se realizó mediante el control de cuatro segmentos individuales (A, B, C y D), a través de tres ajustes en cada uno de los segmentos:

1. **Nivel:** es el porcentaje de amplitud en relación con la altura de la pantalla Jetting Waveform mostrada.
2. **Decaimientos:** es la pendiente que forma las curvas durante las rampas de voltaje.
3. **Duración:** es la duración o longitud del segmento.

Cada uno de los segmentos representan una fase de control, así el segmento A representa el diferencial de potencial eléctrico constante, B simboliza la inyección del fluido, C la eyección del fluido y D la disminución del diferencial de potencial.

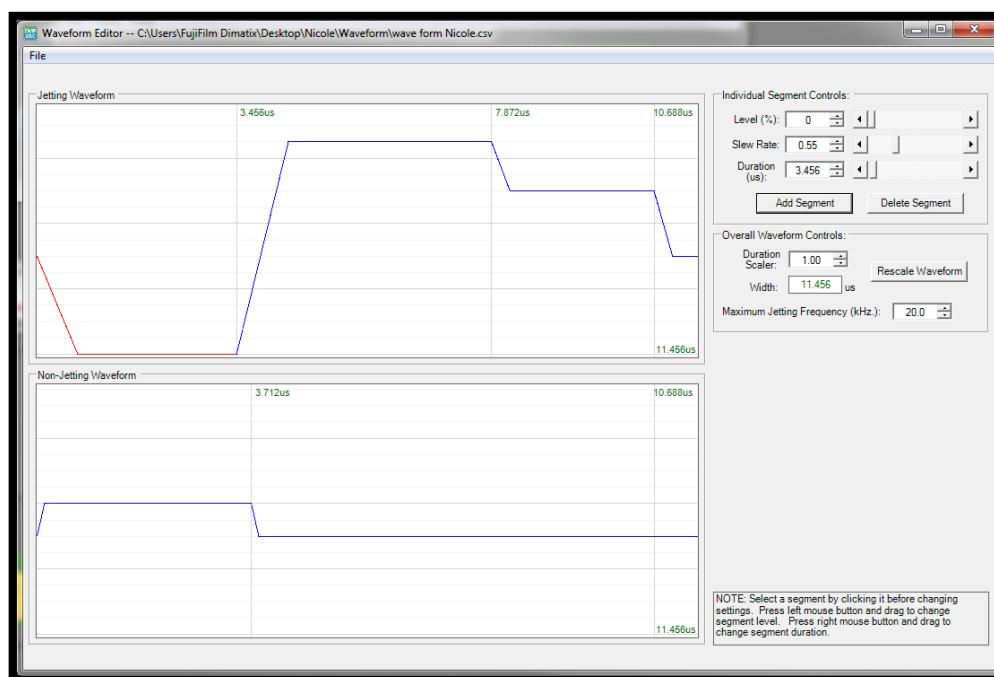
La curva de calibración para la impresión de las Ag-NPs (Q) se determinó mediante el control de los ajustes de los cuatro segmentos como se muestra en la Tabla 24 y en la Figura 56.

**Tabla 24.**

**Ajustes de control de los cuatro segmentos para la elaboración de la curva de calibración para la impresión de Ag-NPs (Q).**

Fase de control (segmento)	Nivel %	Decaimientos	Duración ( $\mu$ s)
<b>A</b>	0	0.55	3.456
<b>B</b>	87	0.90	4.416
<b>C</b>	67	0.60	2.816
<b>D</b>	40	0.73	0.768

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017



**Figura 56. Curva de calibración para Ag-NPs (Q)**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

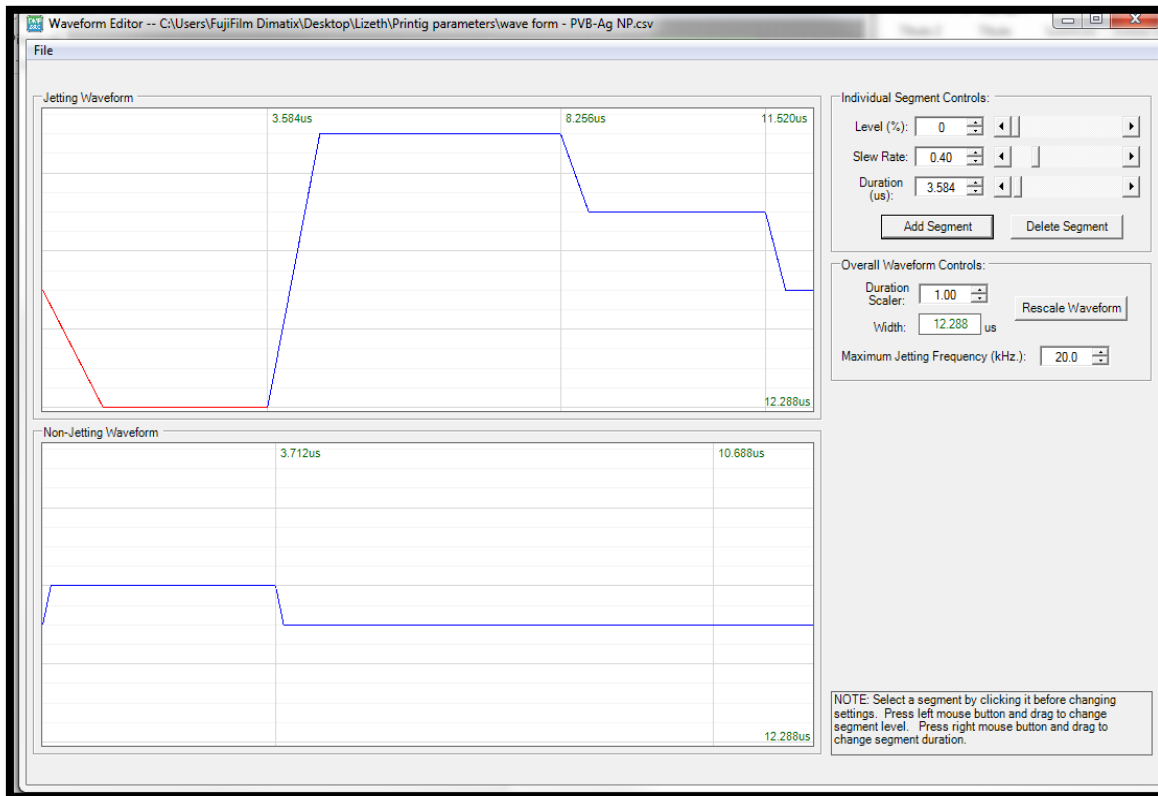
La curva de calibración para la impresión de las Ag-NPs (M) / PVB se determinó mediante el control de los ajustes de los cuatro segmentos como se muestra en la Tabla 25 y en la Figura 57.

**Tabla 25.**

**Ajustes de control de los cuatro segmentos para la elaboración de la curva de calibración para la impresión de Ag-NPs (M) / PVB.**

Fase de control (segmento)	Nivel %	Decaimientos	Duración (µs)
<b>A</b>	0	0.40	3.586
<b>B</b>	93	1.05	4.864
<b>C</b>	67	0.59	3.392
<b>D</b>	40	0.73	0.768

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017



**Figura 57. Curva de calibración para Ag-NPs (M) / PVB**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

## 4.5 ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

### 4.5.1 Halos de inhibición

Previamente se evidenció el efecto bactericida de los coloides de Ag-NPs (Q) y Ag-NPs (M), sin impresión y sin PVB en el caso de las nanopartículas de plata sintetizadas por irradiación microondas, en los cultivos bacterianos de *E. coli* y *S. aureus* como se muestra en la Figura 58. A y 58. B y en la Figura 59. A y 59. B, donde se observó claramente el halo de inhibición formado en ambos casos como indica la Tabla 26.

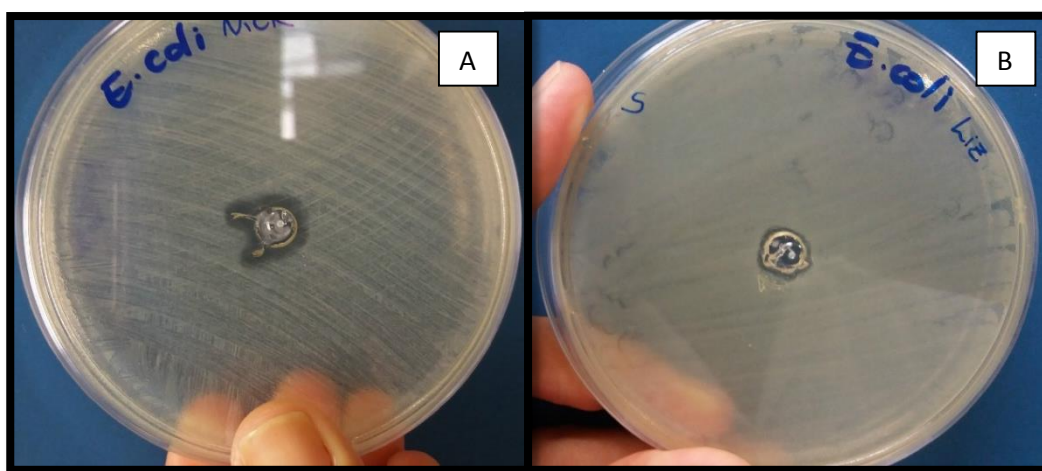


Tabla 26.

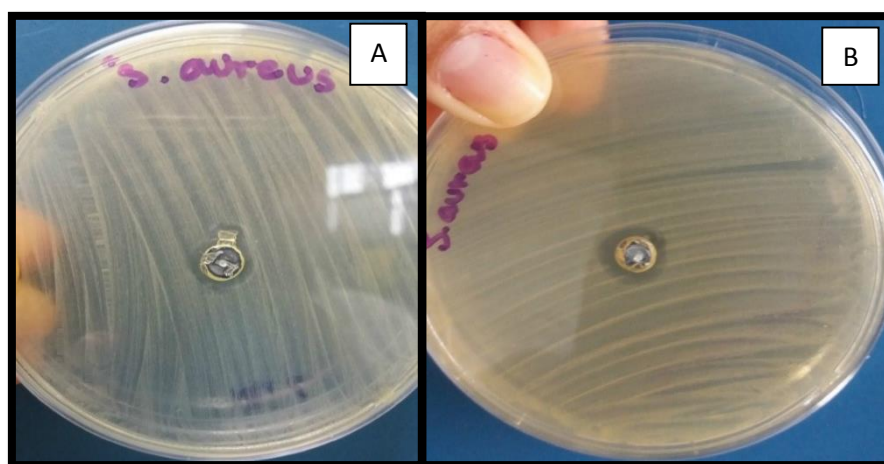
Efecto bactericida de los coloides Ag-NPs (Q) y Ag-NPs (M) en *E. coli* y *S. aureus*

Halo de inhibición mm	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Ag-NPs (Q)	Ag-NPs (M)	Ag-NPs (Q)	Ag-NPs (M)
	2.48	3.75	1.91	2.01

Elaborada por Barrera &amp; Guerrero, 2017

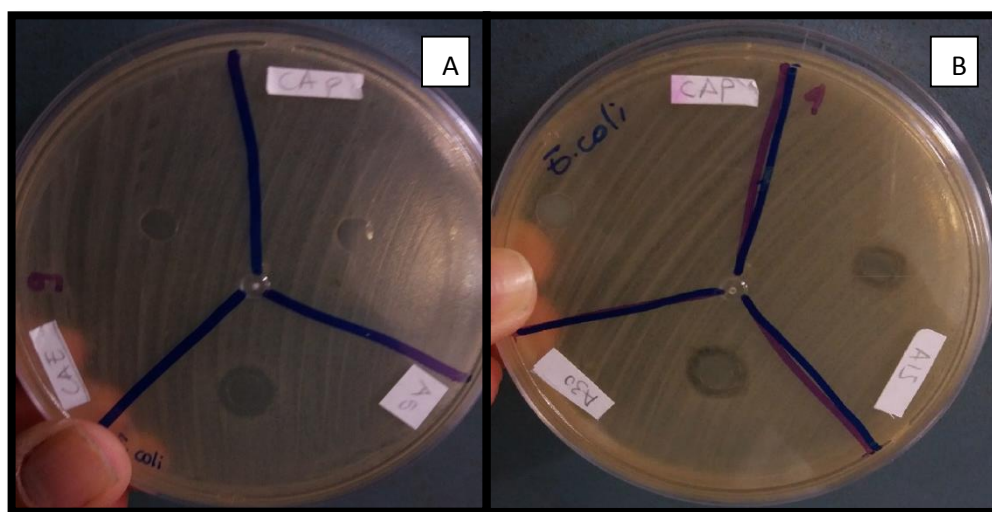
Figura 58. Efecto bactericida de los coloides en *E. coli*. A. Ag-NPs (Q). B. Ag-NPs (M).

Elaborada por Barrera &amp; Guerrero, 2017

Figura 59. Efecto bactericida de coloides en *S. aureus* A. Ag-NPs (Q) B. Ag-NPs (M)

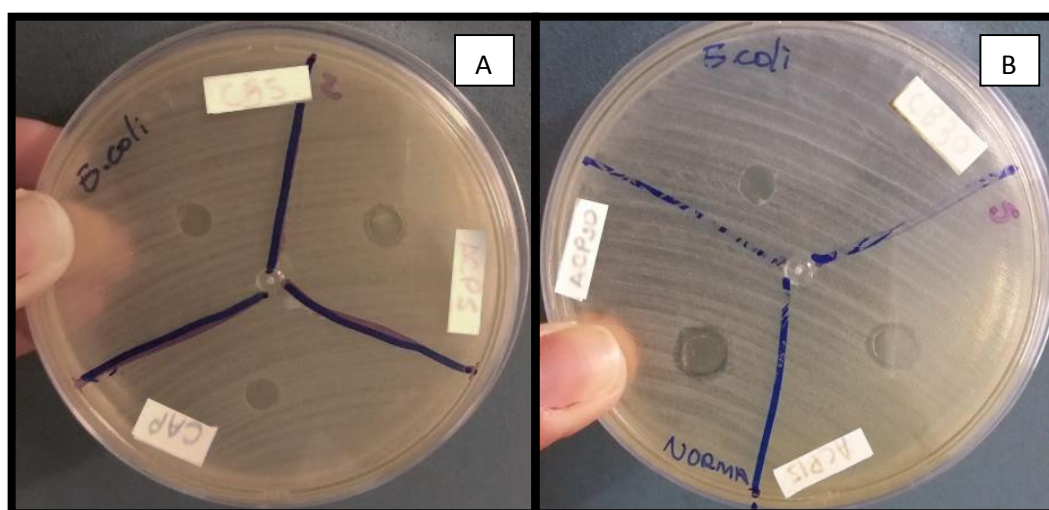
Elaborada por Barrera &amp; Guerrero, 2017

El análisis bacteriológico para Ag-NPs (Q) y Ag-NPs (M) se llevó a cabo con la medición del halo de inhibición en ambas bacterias (*E. coli* y *S. aureus*) para los diferentes discos realizados, como se muestra en la Figura 60. A y 60. B, en la Figura 61. A. y 61. B., en la Figura 62. A. y 62. B., en la Figura 63. A. y 63. B. y en la Tabla 27 y Tabla 28.



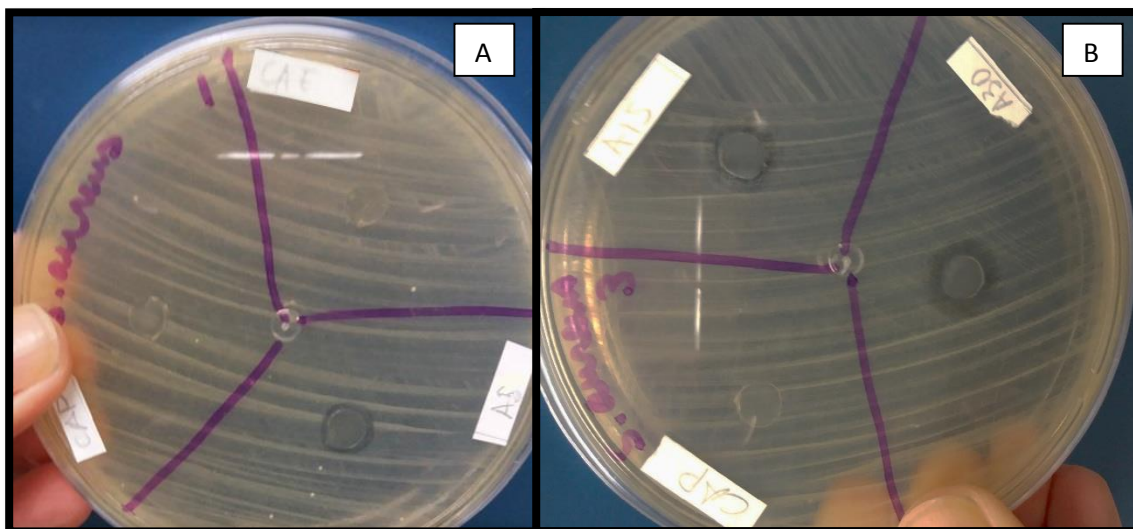
**Figura 60. Efecto bactericida de Ag-NPs (Q) en *E. coli*. A. Inhibición con A5. B. Inhibición con A15 y A30**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017



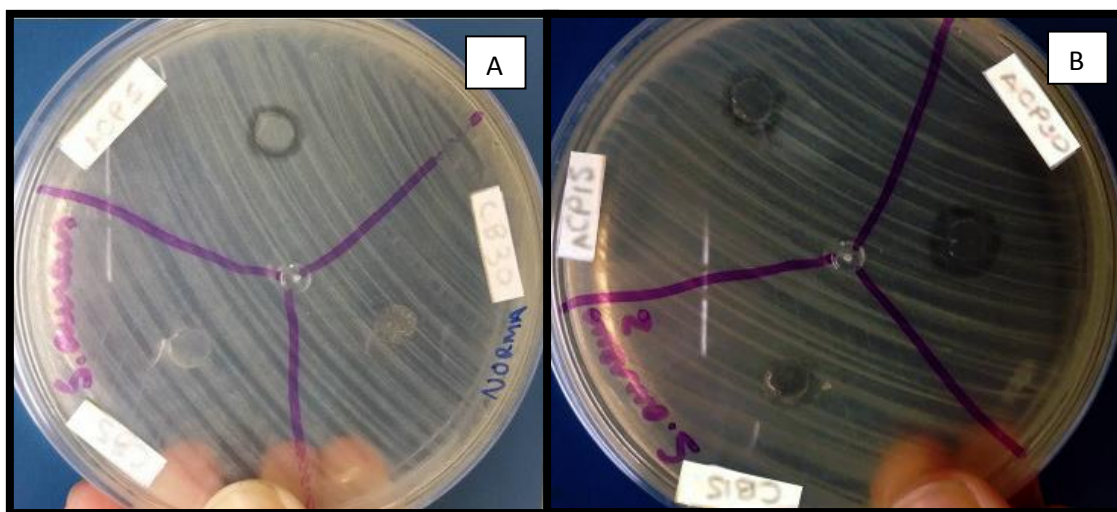
**Figura 61. Efecto bactericida de Ag-NPs (M) / PVB en *E. coli*. A. Inhibición con ACP5. B. Inhibición con ACP15 y ACP30**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017



**Figura 62. Efecto bactericida de Ag-NPs (Q) en *S. aureus*. A. Inhibición con A5. B. Inhibición con A15 y A30**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017



**Figura 63. Efecto bactericida de Ag-NPs (M) / PVB en *S. aureus*. A. Inhibición con ACP5. B. Inhibición con ACP15 y ACP30**

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

Tabla 27.

Medición del halo de inhibición de Ag-NPs (Q) en *E. coli* y *S. aureus*

Halo de inhibición de Ag-NPs (Q) en <i>E. coli</i>						
Disco	Tamaño del halo de inhibición en mm					Promedio
CAE	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A5	0.42	0.52	1.16	1.97	0.89	0.99
A15	2.21	1.20	0.00	0.00	1.53	1.65
A30	2.02	0.00	0.64	1.92	2.13	1.68
Halo de inhibición de Ag-NPs (Q) en <i>S. aureus</i>						
Disco	Tamaño del halo de inhibición en mm					Promedio
CAE	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A5	0.00	0.29	0.21	0.36	0.14	0.25
A15	0.00	0.56	0.52	0.52	0.58	0.55
A30	1.35	1.09	0.67	1.84	0.00	1.24

Elaborada por Barrera &amp; Guerrero, 2017

Tabla 28.

Medición del halo de inhibición de Ag-NPs (M) / PVB en *E. coli* y *S. aureus*

Halo de inhibición de Ag-NPs (M) / PVB en <i>E. coli</i>						
Disco	Tamaño del halo de inhibición en mm					Promedio
CAE	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CB 5, 15, 30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A5	0.89	1.06	1.09	0.00	1.24	1.07
A15	2.27	1.59	0.00	1.51	0.00	1.79
A30	0.00	2.06	1.19	2.27	2.21	1.93
Halo de inhibición de Ag-NPs (M) / PVB en <i>S. aureus</i>						
Disco	Tamaño del halo de inhibición en mm					Promedio



<b>CAE</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>CB</b> <b>5, 15, 30</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>A5</b>	0.45	0.36	0.26	0.00	0.25	0.33
<b>A15</b>	0.59	0.62	0.00	0.59	0.67	0.62
<b>A30</b>	1.42	1.17	1.75	0.00	2.01	1.59

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

Los datos obtenidos permiten comprobar el poder antibacteriano que presentan las nanopartículas de plata, al compararlas con los controles CAE y CB, y al comparar los tipos de dispositivos se evidencia mayor halo de inhibición en Ag-NPs (M) / PVB (Malegwd et al., 2016). Sin embargo según Paredes (2011), en los dos casos se puede evidenciar el efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata sobre las cepas analizadas, indicando que su actividad se genera sobre un amplio espectro bacteriano (Awad, 2016).

Por otro lado se puede evidenciar que el efecto antibacteriano es mayor en *E. coli* con respecto a *S. aureus*, esta relación es corroborada por Malegwd et al., (2016), donde se demuestra la misma relación, indicando que esto puede deberse a la diferencia entre las paredes celulares de las Gram negativas y Gram positivas respectivamente.

También es importante destacar que según la Norma Suiza (SN) 195920- ASTM E 2149-01, cualquier compuesto que genere una zona de inhibición mayor a 1 mm se considera como un buen agente antibacteriano (Malegwd et al., 2016), y como en Ag-NPs (Q) para *E. coli*, el promedio de halo de inhibición respectivamente para A5, A15, y A30 es 0.99, 1.65 y 1.68, a estos dispositivos se los considera como buenos agentes antibacterianos.

Lo mismo ocurre en Ag-NPs (M) / PVB para *E. coli* donde el promedio del halo de inhibición para A5, A15 y A30 es 1.07, 1.79 y 1.93 respectivamente, por lo tanto a estos dispositivos se los considera como buenos agentes antibacterianos según (Malegwd et al., 2016), sin embargo esto no ocurre en Ag-NPs (Q) ni en Ag-NPs (M) / PVB para *S. aureus* debido a que únicamente A30 tiene valores mayores a 1 mm, siendo estos 1.24 y 1.59 respectivamente.

Por lo tanto, como indican los resultados y según Malegwd et al., (2016), el tamaño de la pared celular si tiene influencia sobre la acción antibacteriana de las Ag-NPs, y en consecuencia de esto, se determinó que se requiere imprimir dispositivos con 30 capas en adelante para considerarlos como buenos agentes antibacterianos.

#### 4.5.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico de la inhibición bacteriana generada por los dispositivos impresos con Ag-NPs (Q), se realizó usando un análisis de varianza ANOVA de un diseño factorial 2X3, con el programa estadístico IBM SPSS® (Student version), y se obtuvieron los p\_valores para los dos niveles: Tipo de bacteria y Número de capas de impresión, como se muestra en la Tabla 29, donde se observa que el p\_valor del modelo es 0.041, menor que 0.05, por lo tanto si tiene influencia en la inhibición bacteriana, el tipo de bacteria tiene un p\_valor de 0.028 por lo que también influye en la inhibición bacteriana, sin embargo la cantidad de capas de impresión presenta un p\_valor de 0.15 que es superior a 0.5, por lo que estadísticamente se indica que no existe influencia significativa de este factor sobre la inhibición (Gutiérrez & de la Vara, 2012).

#### Tabla 29.

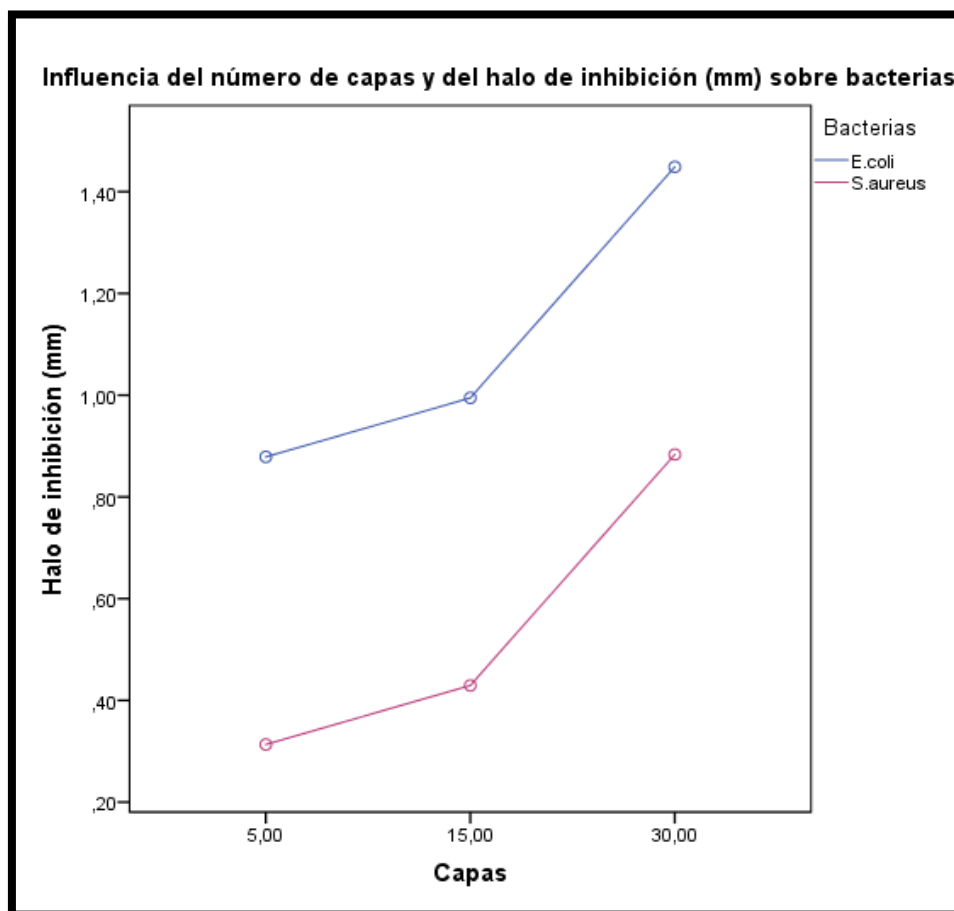
**Análisis de varianza ANOVA del diseño factorial 2X3 de la Inhibición bacteriana frente a Ag-NPs (Q).**

<b>Pruebas de efectos inter-sujetos</b>					
Variable dependiente: Inhibición					
<b>Origen</b>	<b>Tipo III de suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<i>Modelo corregido</i>	4.212	3	1.404	3.162	0.041
<i>Intersección</i>	20.402	1	20.402	45.956	0.000
<i>Tipo de bacteria</i>	2.397	1	2.397	5.399	0.028



<i>Número de capas de impresión</i>	1.815	2	0.907	2.044	0.150
<i>Error</i>	11.543	26	0.444		
<i>Total</i>	36.157	30			
<i>Total corregido</i>	15.755	29			

Elaborada en IBM SPSS® (Student version) por Barrera & Guerrero, 2017



**Figura 64. Relación entre el número de capas impresas y los halos de inhibición generados al poner en contacto el dispositivo con Ag-NPs (Q) sobre los microorganismos.**

Elaborada en IBM SPSS® (Student version) por Barrera & Guerrero, 2017

Como se observa en la Figura 64, existe influencia entre el número de capas impresas en el dispositivo que contiene Ag-NPs (Q), y los halos de inhibición formados tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, lo que indica que a mayor número de capas impresas, se forma un halo de inhibición mayor en los dos microorganismos.

**Tabla 30.**

**Análisis de varianza ANOVA del diseño factorial 2X3 de la Inhibición bacteriana frente a Ag-NPs (M) / PVB.**

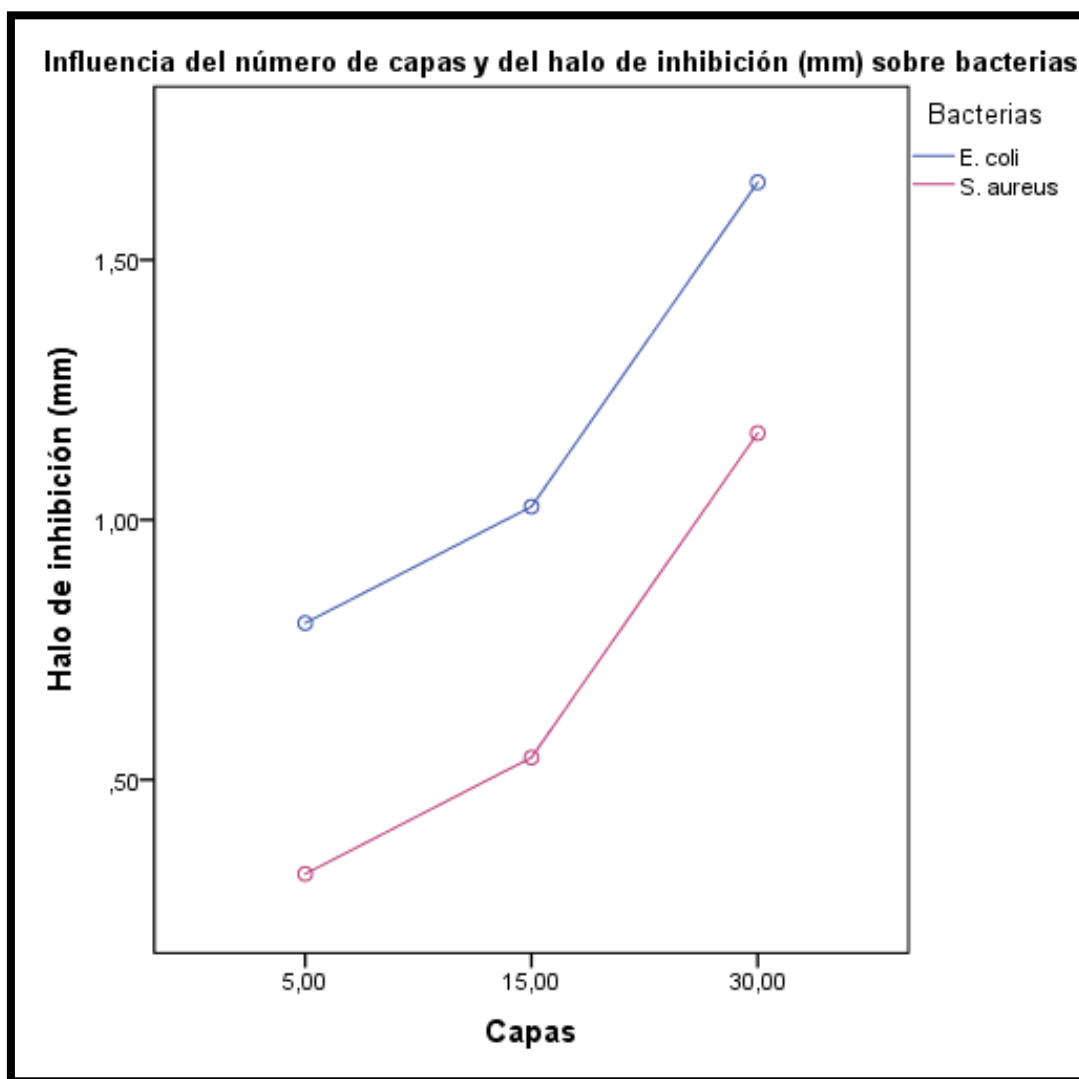
<b>Pruebas de efectos inter-sujetos</b>					
<b>Variable dependiente: Inhibición</b>					
<b>Origen</b>	<b>Tipo III de suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>P_valor</b>
<i>Modelo corregido</i>	5.609	3	1.870	4.077	0.017
<i>Intersección</i>	25.245	1	25.245	55.045	0.000
<i>Tipo de bacteria</i>	1.747	1	1.747	3.810	0.062
<i>Número de capas de impresión</i>	3.862	2	1.931	4.211	0.026
<i>Error</i>	11.924	26	0.459		
<i>Total</i>	42.779	30			
<i>Total corregido</i>	17.534	29			

Elaborada en IBM SPSS® (Student version) por Barrera & Guerrero, 2017

Para los dispositivos impresos con Ag-NPs (M) / PVB, se realizó un análisis estadístico de un diseño factorial 2X3 de un análisis de varianza ANOVA, en el programa estadístico IBM SPSS® (Student version), y se obtuvieron los p\_valores para los dos niveles: Tipo de bacteria y Número de capas impresas, como se muestra en la Tabla 30, donde el p\_valor para el modelo es 0.017, menor que 0.05, esto indica que si tiene influencia en la



inhibición bacteriana, y lo mismo ocurre con el número de capas impresas con p-valor de 0.026, en cuanto al p\_valor 0.062 del tipo de bacteria, es mayor que 0.05, sin embargo no dista mucho de este, por lo que si se consideró a este factor como influyente en la inhibición bacteriana considerando un nivel de confianza de 95% (Gutiérrez & de la Vara, 2012).



**Figura 65. Relación entre el número de capas impresas y los halos de inhibición generados al poner en contacto el dispositivo con Ag-NPs (M) / PVB sobre los microorganismos.**

Elaborada en IBM SPSS® (Student version) por Barrera & Guerrero, 2017

Como se observa en la Figura 65, también existe influencia entre el número de capas impresas en el dispositivo que contiene Ag-NPs (M) / PVB, y los halos de inhibición formados tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, lo que de igual forma indica que a mayor número de capas impresas, se forma un halo de inhibición mayor tanto en *E. coli* como *S. aureus*.

En base a los resultados obtenidos y analizados, se determinó que el dispositivo impreso con Ag-NPs (M) / PVB con treinta capas de impresión, es el mejor dispositivo con efecto antibacterial, siendo levemente más efectivo en *E. coli* con respecto a *S. aureus*.

#### 4.6 RELACIÓN ENTRE EL HALO DE INHIBICIÓN Y EL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN

En esta investigación se consideró necesario relacionar el coeficiente de difusión de Ag-NPs (Q) y Ag-NPs (M) calculado con el d(H) obtenido por DLS, con el halo de inhibición bacteriano generado por los dispositivos impresos.

Por lo tanto se relacionó estos dos análisis como se muestra en la Tabla 31.

**Tabla 31.**

**Relación entre el halo de inhibición y el coeficiente de difusión para Ag-NPs (Q) y para Ag-NPs (M) / PVB.**

Ag-NPs (Q)					
Capas de impresión	Promedio de halo de inhibición mm		Coeficiente de Difusión cm <sup>2</sup> /s	Cálculo del halo de inhibición mínimo esperado según el cálculo del coeficiente de difusión mm	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>			
A5	0.99 ± 0.62	0.25 ± 0.14	1.91x10 <sup>-8</sup>	$\sqrt{D * \frac{10^2 \text{mm}^2}{1 \text{cm}^2} * \frac{3600 \text{s}}{1 \text{h}} * 24 \text{h}}$	A <sub>min</sub> : 0.41
A15	1.65 ± 0.97	0.55 ± 0.25			
A30	1.68 ± 0.96	1.24 ± 0.70			



Ag-NPs (M) / PVB					
Capas de impresión	Promedio de halo de inhibición mm		Coeficiente de Difusión cm <sup>2</sup> /s	Cálculo del halo de inhibición mínimo esperado según el cálculo del coeficiente de difusión mm	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>			
A5	1.07 ± 0.49	0.33 ± 0.17	1.76x10 <sup>-8</sup>	$\sqrt{D * \frac{10^2 mm^2}{1 cm^2} * \frac{3600 s}{1 h} * 24 h}$	A <sub>min</sub> : 0.39
A15	1.79 ± 1.02	0.62 ± 0.28			
A30	1.93 ± 0.97	1.59 ± 0.78			

Elaborada por Barrera & Guerrero, 2017

De acuerdo a los cálculos realizados, según el coeficiente de difusión obtenido en Ag-NPs (Q) y Ag-NPs (M), el halo de inhibición mínimo es de 0.41 mm y 0.39 respectivamente. Como se mencionó anteriormente, existe influencia de la doble capa lipídica presentada por las Gram positivas sobre el efecto antibacterial de las Ag-NPs, y esto se puede evidenciar al comparar el halo de inhibición mínimo calculado, con los promedios de halo de inhibición medidos (Malegwd et al., 2016). Como se indicó anteriormente, según Cabrejos (2011), el coeficiente de difusión calculado depende de una viscosidad aparente para el medio de cultivo usado, por lo tanto los valores obtenidos del halo de inhibición mínimo en ambos casos es aparente.

## 5 CONCLUSIONES

- La investigación permitió la obtención de nanopartículas de plata mediante método químico y por irradiación microondas, utilizando como precursor metálico nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Se realizó la caracterización de las nanopartículas por cinco técnicas: espectroscopía UV-VIS, presentando una longitud de onda de 425 nm para Ag-NPs (Q) y 421 nm para Ag-NPs (M), las cuales están dentro de la banda característica en la cual la plata absorbe la luz; DLS, en el cual se obtuvo un diámetro hidrodinámico de  $80.9 \pm 59.7$  nm Ag-NPs (Q) y  $87.8 \pm 122.3$  nm para Ag-NPs (M); XRD, presentado picos de difracción en  $32.12^\circ$ ,  $39.07^\circ$  y  $64.40^\circ$  que corresponden a planos cristalográficos (101), (111) y (220) respectivamente para Ag-NPs (Q), y  $32.12^\circ$ ,  $38.02^\circ$  y  $67.43^\circ$  que corresponden a planos cristalográficos (101), (111) y (220) respectivamente para Ag-NPs (M) y finalmente STEM y TEM que permitieron obtener el diámetro promedio para cada caso,  $18.9 \pm 12.28$  nm para Ag-NPs (Q) y  $17.83 \pm 7.3$  nm para Ag-NPs (M)). Además las Ag-NPs (Q) han sido estables por 7 meses y Ag-NPs (M) por 4 meses y ambas continúan estables hasta la actualidad.
- Se determinó que el acetato de celulosa y el polivinil butiral no influyen en la supervivencia de *Artemia franciscana*, por lo que se puede concluir que no existe toxicidad por parte del soporte de impresión ni del polímero utilizado.
- Mediante la impresión se obtuvieron dispositivos antibacteriales replicables y evaluados, a través de la estandarización de los parámetro de nivel, decaimiento y duración en cada uno de los segmentos de las curvas de calibración (A, B, C y D). En el segmento A, los parámetros de nivel, decaimiento y duración son: 0%, 0.55 y 3.456  $\mu\text{s}$ ; en el segmento B son: 87%, 0.90 y 4.416  $\mu\text{s}$ ; en el segmento C son: 67%, 0.60 y 2.816  $\mu\text{s}$  y en el segmento D son: 40%, 0.73 y 0.768  $\mu\text{s}$  respectivamente para Ag-NPs (Q). Por otro lado, para Ag-NPs (M), en el segmento A, los parámetros son: 0%, 0.40 y 3.586  $\mu\text{s}$ ; en el segmento B son: 93%, 1.05 y 4.864  $\mu\text{s}$ ; en el segmento C son: 67%, 0.59 y 3.392  $\mu\text{s}$  y en el segmento D son: 40%, 0.73 y 0.768  $\mu\text{s}$  respectivamente.
- Bajo la investigación realizada y los resultados obtenidos, se determinó que el mejor dispositivo impreso tanto para las nanopartículas de plata sintetizadas por el método

químico, y para los compósitos poliméricos compuestos nanopartículas de plata sintetizadas por irradiación microondas y polivinil butiral, fueron aquellos dispositivos que contienen treinta capas de impresión.

## 6 RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos, recomendamos:

- Realizar análisis bacteriológicos con los dispositivos antibacteriales obtenidos, en *S. aureus* y *E. coli* resistentes a antibióticos.
- Analizar el medio de cultivo con los dispositivos impresos en ausencia de bacterias, para observar si existe desprendimiento de las nanopartículas o presencia de iones de plata.
- Realizar un ensayo de ecotoxicidad con los dispositivos impresos (A5, A15 y A30), en *Artemia franciscana* para poder analizar si existe efectos secundarios en los microcrustáceos, y además analizar su hábitat para determinar si contiene Ag-NPs por desprendimiento o iones de Ag.
- Mejorar el método de medición de la viscosidad del medio de cultivo para determinar un coeficiente de difusión real, tomando en cuenta que el comportamiento del fluido es no newtoniano reopéctico.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides* Instituto Politécnico Nacional. México, México.
- Aláez, S, (2015). Uso tópico del cobre y la plata en el tratamiento de heridas: revisión bibliográfica. Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- Alvarado, A. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Zornia reticulata* y *Cestrum sendtherianum*. Por el método de difusión en agar. Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador.
- Alves, M., Soares, L., Goncalves, M., Nogueira, A. (2012). Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 9. Pág. 1872-1878.
- Amro, N., Kotra, L., Wadu-Mesthrige, K., Bulychev, A., Mobashery, S. y Liu, G. High-Resolution Atomic Force Microscopy Studies of the *Escherichia coli* Outer Membrane: Structural Basis for Permeability. *Langmuir* 16, 2789-2796.
- Amutha, M., Lalitha, P., Firdhouse, J. (2014). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. *Journal of Nanotechnology*, Vol. 2014, Article ID 860875. Pág. 1-6.
- Armelin, E. (2002). Síntesis y Caracterización de nuevas poliesteramidas: Estudio de sus propiedades, Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, España.
- Armendáriz, J. (2012). Seguridad e higiene en manipulación de alimentos. Editorial Paraninfo, Segunda edición, Madrid, España.
- Argüello, F., (2016). Diseño del proceso de fabricación de láminas plásticas con actividad bactericida elaboradas a partir de polimetilmetacrilato y nanopartículas de plata. Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

- Arroyo, C., Debut, A., Vaca, A., Steal, C., Guzman, K., Cumar, B., Cumbal, L. (2016). Reliable Tools for Quatifying the Morphological Properties at the Nanoscale. Biol Med (Aligarh). doi: 10.4172/0974-8369.1000281.
- Ávalos, A., Haza, A., y Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Awad, M., Hendi, A., Ortashi, K., Alotaibi, R. y Sharafeldin M. (2016). Characterization of silver nanoparticles prepared by wet chemical method and their antibacterial and cytotoxicity activities. Tropical Journal of Pharmaceutical Research; 15 (4): 679-685
- Ayala, N. (2010). 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 antibióticos. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, México.
- Barani, H., Montazer, M., Braun, H., Dutschk, V. (2014). IET Nanobiotechnol., Vol. 8, Iss. 4. Pág. 282–289.
- Bartolomé, M. & Sánchez, S. (2007). Valoración de la toxicidad aguda de biocidas utilizados en ambientes de la vida privada y la salud pública sobre *Artemia franciscana*. Escuela de Químico-Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
- Bello, J. (2012). Calidad de Vida, Alimentos y Salud Humana. Editorial Diaz de Santos. Madrid, España pp 154.
- Beltran, M. (2013). Estudio de la biocompatibilidad de compósitos poliméricos con nanopartículas de cobre. Universidad de Chile. Santiago de Chile, Chile.



- Benítez, G. (2013). Análisis y modelización de la inactivación de *Escherichia coli* en aguas residuales. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Bergami, E., Bocci, E., Vannuccini, L., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K. y Coris, I. (2016). Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicol Environ Saf.* Vol. 123. Pág. 18-25.
- Blust, R.; Fontaine, A.; Declair, W. (1991). Effect of hydrogen ions and inorganic complexing on the uptake of copper by the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 76: 273-282.
- Borraz, C. (2006). Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Borroto, J., Trujillo, R., de la Torre, Y., Waksman, N., Hernández, M., Salazar, R. (2011). Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Vol. 16, No. 1. Pág. 34-42.
- Cabrejos, J. (2011). Estudio de pre-factibilidad para la recuperación de agua a partir de relaves de gran minería de cobre mediante la tecnología de relaves espesados. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima, Perú.
- Cabrera, J., López, A., Santiago, J. (2008). Síntesis de nanopartículas de plata en matrices poliméricas mediante radiación gamma. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* Vol. 11 N° 1. Págs. 16-20.
- Callister, W. (2007). *Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales 1*. Editorial Reverté, Barcelona, España.

- Camacho, J. & Deschamps, L. (2013). Síntesis de nanopartículas de plata y modificación con pulpa de papel para aplicación antimicrobial. Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia.
- Camacho, M., Vega, J., Campos, A. (2011). Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias. *Rev Soc Quím Perú*. 77-4.
- Carotenuto, G., Pepe, G., Nicolais, L. (2000). Preparation and characterization of nano-sized Ag/PVP composites for optical applications. *Eur. Phys. J. B* 16. Pág. 11-17.
- Castillo, G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Instituto Mexicano de Investigaciones para el Desarrollo. México, México.
- Castro, G. (2005). Incorporación de tres antibióticos en nauplios, metanauplios, juveniles y adultos de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) para inhibir el crecimiento de la bacteria *Aeromonas hydrophila*. Universidad Autónoma Metropolitana. México, México.
- Castro, J.; Castro, T.; Arredondo, J.; Hernández, L.; Castro, G.; De Lara, R.; Monroy, M. (2009). La salinidad y su efecto en la reproducción del crustáceo *Artemia* sp. *Contacts*, 73: 5-15.
- Clinical Laboratory Standards Institute, (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Antimicrobial susceptibility testing standards M02-A11, M07-A9, and M11-A8.
- Comisión Europea. (2004). La nanotecnología, Innovaciones para el mundo del mañana. Comunidades, Belgium, Bélgica.

- Cordero, M., García, A., Barreal, R., Jiménez, J., Rojas, N. (2002). Comportamiento de la infección nosocomial en las unidades de terapia en un período de 5 años. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 40(2):79-88.
- Creighton, J., Blatchford, C. & Albrecht, M. (1979). Plasma Resonance Enhancement of Raman Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength, *J. Chem.Soc. Farad. Trans., Vol. 2, No. 75. Pág. 790 – 798.*
- Cruz, D., Rodríguez, M., López, J., Herrera, V., Orive, A., Creus, A. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Av. cien. ing.:* 3(2). Pág. 67-78.
- Cruz, J. (2012). Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con péptidos análogos de lactoferrampina con potencial antibiótico contra *Escherichia coli* O157:H7. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Cuadros, A., Pimentel, R., San Martín, E., Fernández, J. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat. Am. J. Phys. Educ. Vol. 8, No. 4.*
- Danilczuk, M., Lund, A., Sadlo, J., Yamada, H., Michalik, J. (2006). Conduction electron spin resonance of small silver particles. *Spectrochimica Acta Part A* 63. Pág. 189–191.
- De Quadros, C., Brunelli, M., Faria, V., Sheeren. C. (2016). Nanopartículas de Au em líquido iônico suportadas em filmes biopoliméricos: uma aula prática para investigação da atividade antimicrobiana. *Quim. Nova, Vol. 39, No. 8. Pág. 1015-1018.*
- Delgado, G. (2009). Nanotecnología y producción de alimentos: impactos económicos, sociales y ambientales. *Estud. Soc vol.17 no.34 México jul./dic. 2009*

- D'Britto, V. (2010). Synthesis of metal nanoparticles and polymer/metal nanoparticle composites: investigation towards biological applications. Biochemical Sciences Division. Pune, India.
- Díaz, M. (2013). Obtención de nanopartículas de plata por ablación laser soportadas en hilo de sutura de seda. Universidad Autónoma de México, México.
- Domínguez, S. (2011). Síntesis de nanopartículas metálicas y de zeolitas para catálisis y separación de gases. Universidad de Alicante. Alicante, España.
- Eisa, W., Abdel-Moneam, Y., Shabaka, A., Hosam, A. (2012). In situ approach induced growth of highly monodispersed Ag nanoparticles within free standing PVA/PVP films. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 95: 341–346.
- Escobar, V. (2015). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopía de infrarrojos (FT-IR), UV-VIS, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- FAO, (1986). Manual para el cultivo y uso de artemia en acuicultura. Extraído de <<http://www.fao.org/3/contents/ffb7b54e-65ee-5d8f-bfdb-85022dbed29a/AB474S00.htm>>
- FAO, (2016). Prevención de la *E. coli* en alimentos. Extraído de <[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/Preventing\\_Ecoli\\_es.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf)>
- FDA, (2007). Resistencia a los antibióticos. FDA Office of Women's Health.
- Feng, Q., Wu, J., Chen, G., Cui, F., Kim, T., y Kim, J. (2010). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res.* 15;52(4):662-8.

- Fernández, D. (2011). Microfluidos: nuevas fronteras. *Revista Cubana de Física*, Vol. 28, No. 1. Pág. 61-68.
- Ferrer, C., Almirante, B. (2014). Infecciones relacionadas con el uso de los catéteres vasculares. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 32(2):115–124.
- Flores, C. (2014). Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina.
- Fontoura, C. (2009). Desenvolvimento de hélice de material compósito polimérico utilizando a moldagem por transferência de resina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Foriesteri, M. (2013). Produção de Compósito Polimérico a partir de Polímeros Reciclados: Resíduos de Espuma Flexível de Poliuretano e Polipropileno Reciclado. Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, Brasil.
- Freire, P., Albuquerque, A., Farias, I., Goncalves, T., Santos, J., Galembeck, A., Flores, M., Sampio, F., Montenegro, T., Rosenblatta, A. (2016). Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of colloidal chitosan – silvernanoparticles – fluoride nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules* 93: 896–903.
- García, A., Crespo, J., López, J., Olomos, M., Monge, M., Rodríguez, M., Martín, P., Bartolomé, B., Moreno, M. (2015). M22 - Síntesis y aplicación de nuevas nanopartículas de plata biocompatibles para el control del crecimiento de bacterias lácticas y acéticas en vinos. *Enología Innovación Vitivinícola*. Pág. 186-189.

- García, J., Cantón, R., García, J., Gómez, M., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J. (2000). *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antibióticos*. Madrid, España.
- Gautam, A., & Ram S. (2010). Preparation and thermomechanical properties of Ag-PVA nanocomposite films. *Materials Chemistry and Physics* 119. Pág. 266–271.
- Gibert, M. (2010). *Detección y caracterización de aislados de Escherichia coli de origen clínico y fecal en gallinas ponedoras*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Gómez, G. (2013). Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en Discapacidad*. 2:18-22.
- González, A. (2013). *Remoción de contaminantes en un efluente porcino, a nivel de laboratorio, mediante la selección de un consorcio microalgal y evaluación del valor nutricional de la biomasa*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Sangolquí, Ecuador.
- Govarthanan, M., Selvankumar, T., Monoharan, K., Rathika, R., Shanthi, K., Lee, K., Cho, M., Kamala, S., Oh, B. (2014). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using panchakavya, an Indian traditional farming formulating agent. *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 9. Pág. 1593–1599.
- Grouchko, M., Kamyshny, A., Magdassi, S. (2008). Formation of air-stable copper–silver core–shell nanoparticles for inkjet printing. doi: 10.1039/b821327e
- Güerri, M. (2002). *Estudio de la resistencia a antibióticos [beta]-lactámicos en aislamientos clínicos de Salmonella typhimurium*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Gutiérrez, H. & de la Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. Editorial Mc Graw Hill, Tercera Edición, México, México.

- Guzmán, C. (2015). Nanopartículas de plata para su uso como agente antibacteriano. Instituto de Química Biológica. Uruguay.
- Hadjispyrou, S., Kungolos, A., Anagnostopoulos, A. (2001). Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 49(2):179-86.
- Haiss, W., Thanh, N., Aveyard, J., Fernig, D. (2007). Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-VIS Spectra. *Anal. Chem.*, Vol. 79. Pág. 4215-4221.
- He, B., Tan, J., Liew, K., Lui, H. (2004). Synthesis of size controlled Ag nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 221: 121–126.
- Hernández, E. (2010). *Escherichia coli* productores de blee aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Hong, X., Wen, J., Xiong, X., Hu, Y. (2016). Shape effect on the antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized via a microwave-assisted method. *Environ Sci Pollut Res* 23:4489–4497.
- Ibrahim, N., Eid, B., Abou, T., Abd, E. (2013). A smart approach to add antibacterial functionality to cellulosic pigment prints. *Carbohydrate Polymers* 94. Pág. 612–618.
- Ibrahim, N., Eid, B., Elmaaty, A., Aziz, E. (2013). A smart approach to add antibacterial functionality to cellulosic pigment prints. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 94. Pág. 612– 618.
- Ip, M., Lui, S. L., Poon, V. K., Lung, I., and Burd, A. 2006. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J. Med. Microbiol.* 55:59-63.

- Kamel, S. (2012). Rapid synthesis of antimicrobial paper under microwave irradiation. *Carbohydrate Polymers* 90. Pág. 1538– 1542.
- Kong, H. & Jang, J. (2008). Synthesis and Antimicrobial Properties of Novel Silver/Polyrhodanine Nanofibers. *Biomacromolecules* Vol. 9. No. 10 Pág.2677– 2681.
- Kvitek, L., Panacek, A., Soukupova, J., Kolar, M., Vecerova, R., Pucek, R., Holecova, M., Zboril, R. (2008). Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C*, Vol. 112, No. 15. Pág. 5825-5834.
- Lapizco, B. (2008). Aplicaciones de microfluídica en bioseparaciones microfluidics applications in bioseparations. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 7, No. 3. Pág. 205-214.
- Lara, H., Garza, E., Ixtepan, L., Singh, D. (2014). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*. Pág. 1-8.
- Larrea, J., Rojas, M., Romeu, B., Rojas, N. y Heydrich, M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 44, No. 3, pp. 24-34.
- Lechuga, L. (2006). *Nanobiotecnología: Avances Diagnósticos y Terapéuticos*. Instituto de Microelectrónica de Madrid (IMM-CNM) CSIC. Madrid, España.
- Lee, P. & Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *Phys. Chem.*, Vol. 86. Pág. 3391 – 3395.
- Levard, C., Hotze, E., Lowry, G., Brown, G. (2012). Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 46. Pág. 6900–6914.



- Li, S., Jia, N., Ma, M., Zhang, Z., Lui, Q., Sun, R. (2011). Cellulose–silver nanocomposites: Microwave-assisted synthesis, characterization, their thermal stability, and antimicrobial property. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 86. Pág. 441–447.
- Lok, C., Ho, C., Chen, R., He, Q., Yu, W., Sun, H., Tam, P., Chiu, J., Che, C. (2006). Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, Vol. 5. Pág. 916-924.
- López, H., López, C., Múzquiz, E. (2016). Nanopartículas: aplicaciones actuales y futuras en la industria alimentaria. Universidad Autónoma de Coahuila. México.
- López, P. (1997). Artemia, Alimento de Peces... y Humanos. *Ciencia y Mar*. Pág. 49-54.
- Lux, A. (s.f.). Manual de Microscopía electrónica, ultraestructura y citología vegetal. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México.
- Ma, Y., Pang, Y., Lui, F., Xu, H., Shen, X. (2016). Microwave-assisted ultrafast synthesis of silver nanoparticles for detection of  $Hg^{2+}$ . *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* Vol. 153. Pág. 206–211.
- Malegowd, G., Jung, J., Kim, D., Seo, J. (2016). Microwave assisted antibacterial chitosan–silver nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules* 84: 281–288.
- Madrid, A. (2017). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata a partir de varios extractos pigmentados de dos plantas para su aplicación en celdas solares híbridas. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Quito, Ecuador.
- Martín, I., Salcedo, R., Font, R. (2011). Mecánica de fluidos, Tema1. Flujo interno de fluidos incompresibles y compresibles. Universidad de Alicante, Alicante, España.

- Martínez, E. (2005). Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Anuario Jurídico y Económico Escurialense*, XXXVIII. Pág. 315-332 / ISSN:1133-3677.
- Marslin, G., Selvakesavan, R., Franklin, G., Sarmiento, B., Dias, A. (2017). Antimicrobial activity of cream incorporated with silver nanoparticles biosynthesized from *Withania somnifera*. *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 10. Pág. 5955–5963.
- Marzán, L. (2006). Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles. *Langmuir* Vol. 22. Pág. 32-41.
- Matulis, V. & Ivaskevich, O. (2006). Comparative DFT study of electronic structure and geometry of copper and silver clusters: Interaction with NO molecule. *Computational Materials Science*, Vol. 35. Pág. 268–271.
- Mazuelas, A. (2002). Caracterización por difracción de Rayos X de heteroestructuras de semiconductores III-V: aplicación al diseño de superredes tensadas para epitaxias de Ga As – Si. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Mojica, L. (2017). CNT@Ag<sup>0</sup>@Ln<sup>3+</sup> como fase fotónica activa para nanocompuestos poliméricos impresos molecularmente. Universidad Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Monge, M. (2008). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Real Sociedad Española de Química*, Universidad de La Rioja, *An. Quím.* 2009, 105(1), 33–41.
- Monteiro, D., Gorup, L., Takamiya, A., De Camargo, E., Ruvolo, A., Barbosa, D. (2011). Silver Distribution and Release from an Antimicrobial Denture Base Resin Containing Silver Colloidal Nanoparticles. doi: 10.1111/j.1532-849X.2011.00772.x

- Morales J., Morán, J., Quintana, M., Estrada, W. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta sol-gel a partir de nitrato de plata. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, Vol. 75, No. 2. Pág. 177-184.
- Nam, G., Rangasamy, S., Purushothaman, B., Song, J. (2015). The Application of Bactericidal Silver Nanoparticles in Wound Treatment. doi: 10.5772/60918.
- Padovani G.C., Feitosa V.P., Sauro S., Tay F.R., Durán G., Paula A.J., Durán N. (2015). “Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects”. *Trends in Biotechnology*. 33(11):621-36.
- Palza, H. (2015). Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. doi:10.3390/ijms16012099.
- Paredes, D. (2011). Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Escuela de Química de Bucaramanga, Universidad Industrial de Santander. doi:10.1155/2011/265287.
- Paredes, D., Ortiz, C., Torres, R. (2014). Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 9. Pág. 1717–1729.
- Park, H., Zhang, X., Choi, Y., Park, H., Hill, R. (2011). Synthesis of Ag Nanostructures by Photochemical Reduction Using Citrate-Capped Pt Seeds.
- Pérez, A. (2013). Sugarcane bagasse cellulose acetate: plasticizing and evaluation of properties. *Ciencias Holguín*, Vol. 20, No. 1.
- Persoone G, Van de Vell A, Van Steetegem M, Nayer B (1989): Predictive value for laboratory tests with aquatic invertebrates: Influence of experimental condition. *Aquatic Toxicology*, 14: 149 – 166.

- Pica, A., Pica, M., Fikai, D., Fikai, A., Florica, D. (2015). Incorporation of Silver Nanoparticles in Film Forming Materials for Long Term Antimicrobial Action. *Current Nanoscience*, Vol. 11. Pág. 760-769.
- Pimentel, M., Silva, F., Santaella, S., Lotufo, L. (2010). O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol*, Vol. 6, No. 1. Pág. 15-22.
- Pirez, M. & Mota, M. (2008). *Temas de bacteriología y virología médica*. Universidad de la República. Uruguay.
- Portillo, D. (2015). Potencial de nanopartículas de plata inmovilizadas mediante la técnica de ultrasonido recubiertas en corcho granular como agente microbiano. Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona, España.
- Prabhu, S. y Poulouse, E. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters* 2012, 2:32
- Prado, J. & Morán, E. (2009). Síntesis asistida por microondas de sólidos inorgánicos. *An. Quím.*, Vol. 107, No. 2. Pág. 129–136.
- Puerta, A. & Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, Vol. 10, No. 51. Pág. 3426-3431.
- Ramón, M. (2007). Determinación del tamaño de cristal utilizando el software Jade 6.5. Centro de Investigación en Energía, Universidad Nacional Autónoma de México. México, México.
- Reimer, L. (1984). *Electron Microscopy*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH.

- Rodríguez, E. (2012). Síntesis, Propiedades y Funcionalización de Clústeres Metálicos. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
- Rodríguez, S. (2007). Obtención de nanopartículas y nanoordenamientos metálicos empleando la química de los compuestos de inclusión. Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- Rojas, S., Guerrero, V., Debut, A. (2015). Propiedad bactericida de telas de algodón impregnadas con nanopartículas de plata. ResearchGate. 10.
- Rojo, N., Smith, K., Perales, J. y Mayer, P. (2012). Recreating the seawater mixture composition of HOCs in toxicity tests with *Artemia franciscana* by passive dosing. *Aquat Toxicol.* 15;120-121:27-34
- Saenz, G., Hernández, M., Martínez, L. (2011). Síntesis acuosa de nanopartículas de plata. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.* S3. Pág. 34-35.
- Salguero, M. (2016). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando como reductores extractos de menta (*Origanum vulgare*) y cilantro (*Coriandrum sativum*), y como funcionalizante el látex de sangre de drago (*Croton lechleri*). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Sánchez, C. (2006). Antibióticos, ayer, hoy y mañana. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Sánchez, L. & Neira, A. (2005). Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava. L* y *Psidium guineense. Sw.* *Cultura Científica.* Pág. 240-45.
- Sergio, A., Nazario, E. Marqués, F., Ferrerira, K., Ramos, N. (2015). Aplicação de nanotecnologia em embalagens de alimentos. Application of nanotechnology in food packaging. doi: 10.1590/0104-1428.2069.

- Seymour, R. & Carraher, C. (1995). *Introducción a la química de los polímeros*. Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.
- Shah, V. & Wallece, D. (2004). *Low-cost Solar Cell Fabrication by Drop-on-Demand Ink-jet Printing*. Proc. IMAPS 37th Annual International Symposium on Microelectronics, Long Beach, California.
- Sharma, V, Yngard, R., Lin, Y. (2009). *Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities*. *Advances in Colloid and Interface Science*, Vol. 145. Pág. 83–96.
- Sifontes, A., Melo, L., Maza, C., Mendes, J., y Mediavilla, M. (2010). *Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polímeros estabilizantes*. *Quím. Nova*, Vol.33, No.6.
- Šileikaitė, A., Puišo, J., Prosyčėvas, I., y Tamulevičiu, S. (2009). *Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate*. *Materials Science (Medžiagotyra)*. Vol. 15, No. 1.
- Šileikaitė, A., Prosyčėvas, I., Puišo, J., Juraitis, A. y Guobienė, A., (2006). *Analysis of Silver Nanoparticles Produced by Chemical Reduction of Silver Salt Solution*. *Materials Science (Medžiagotyra)*. Vol. 12, No. 4.
- Slistan, A. (2005). *Determinación de los mecanismos de formación de nanopartículas de plata sintetizadas en etilenglicol utilizando caracterización teórica y experimental de la banda del plasmón*. Universidad de Sonora, Hermosillo, México.
- Solomon, A., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A., Rutkowsky, S., Boritz, C. (2007). *Journal of Chemical Education*, Vol. 84, No. 2. Pág. 322-325.
- Souza, F. (2015). *Dispositivos imprimíveis por tecnologia “drop-on-demand” de materiais fluidos funcionais: de nanotubos de carbono a complexos para dosímetros uv pessoais*. Universidad Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Stanier, R., Ingraham, J., Wheeliss, M., Painter, P. (1992). Microbiología. Editorial Reverté S.A., Segunda Edición, Barcelona, España.

Servicios Técnicos de Investigación (STTI). (2012). Microscopía Electrónica de Transmisión. Extraído de <<https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2012/especifica/tecnicas-instrumentales-en-el-analisis-de-superficie/tem-sesion-12-noviembre.pdf>>

Suzarte, A., González, R., Arias, A. (2002). Toxicidad del acetato de vinilo (monómero). Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 35, No. 1. Pág. 53-56

Sun, Y., Guo, G., Yang, B., Zhou, X., Liu, Y., Zhao, G. (2011). One-step fabrication of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Ag core-shell composite nanoparticles at low temperature. Journal of Non-Crystalline Solids, Vol. 357. Pág. 1085–1089.

Tang, D., Yuan, R., Chai, Y., Zhang L. Zhong, X., Dai, J. (2004). Novel potentiometry immunoassay with amplified sensitivity for diphtheria antigen based on Nafion, colloidal Ag and polyvinyl butyral as matrixes. J. Biochem. Biophys. Methods 61 (2004) 299 – 311

Tanaka, N. (2017). Electron Nano-imaging. Springer. Japón.

Taroco, R., Seiha, V., Vignoli. (s.f.). Temas de bacteriología y virología médica: Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Pag. 663-671.

Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2007). Introducción a la Microbiología. Editorial Médica Panamericana, Novena Edición. Buenos Aires, Argentina.

Tortorich, R. & Choi, J. (2013). Inkjet Printing of Carbon Nanotubes. Nanomaterials, Vol. 3, Pág. 453-468.

Trautwein, G. (2013). Síntesis de nanopartículas de polioxometalatos para su uso en catálisis heterogénea. Universidad de Alicante. Alicante, España.

- ANL. (s.f.). Tecnología de los materiales. Fac. De Ingeniería Mecánica y Electrónica UANL, Monterrey, México.
- Valle, H. (2014). Preparación, caracterización y actividad antibacteriana de compósitos hidrogel-nanoplatina basados en copolímeros de 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- Viudez, A. (2011). Síntesis, caracterización y ensamblaje de nanopartículas de oro protegidas por monocapas moleculares. Universidad de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Williams, D. & Carter, C. (2009). Transmission Electron Microscopy. Springer. New York, USA.
- Yamada, T., Fukuhara, K., Matsuoka, K., Minemawari, H., Tsutsumi, J., Fukuda, N., Aoshima, K., Arai, S., Makita, Y., Kubo, H., Enomoto, T., Togashi, T., Kurihara, M., y Hasegawa, T. (2016). Nanoparticle chemisorption printing technique for conductive silver patterning with submicron resolution. *Nature Communications* 7:11402
- Yang, X., Gondikas, A., Marinakos, S., Auffan, M., Liu, J., Hsu, H., Meyer, J. (2012). Mechanism of Silver Nanoparticle Toxicity Is Dependent on Dissolved Silver and Surface Coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 46. Pág. 1119–1127.
- Yu, H., Xu, X., Chen, X., Lu, T., Zhang, P., Jing, X., (2006). Preparation and Antibacterial Effects of PVA-PVP Hydrogels Containing Silver Nanoparticles. Wiley InterScience, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 103, 125–133.
- Yu, L., Zhang, Y., Zhang, B., Liu, J. (2014). Enhanced Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles/Halloysite Nanotubes/Graphene Nanocomposites with Sandwich-Like Structure. doi: 10.1038/srep04551.



- Yu, W. & White, I. (2010). Inkjet Printed Surface Enhanced Raman Spectroscopy Array on Cellulose Paper. *Analytical Chemistry*. Vol. 82, No. 23. Pág. 9626–9630.
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano* 5:69-81
- Zendejas, G., Ávalos, H., Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed* 2014; 25:129-143