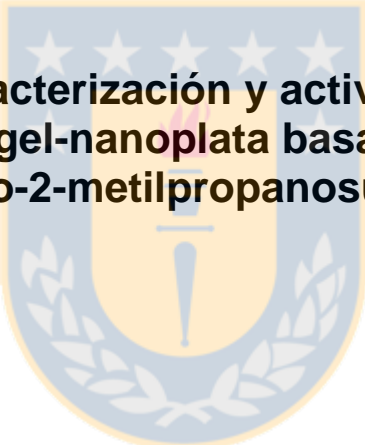




Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Químicas  
Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Química



**Preparación, caracterización y actividad antibacteriana de  
compositos hidrogel-nanoplatá basados en copolímeros de  
2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Química

HERNÁN ALONSO VALLE ZAPATA  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2014

Profesor Guía: Dr. Bernabé L. Rivas Quiroz  
Dpto. de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad de Concepción

## **Agradecimientos**

*“Te doy gracias, Señor, de todo corazón, porque tus promesas han superado tu fama. Cuando te invoqué tu me escuchaste, diste fuerza y vigor a mi alma...”*. Salmos 138 (137).

Agradezco a las siguientes personas y entidades por contribuir en la realización del presente trabajo investigativo:

A mis padres Hernán e Iris, por mostrarme que con trabajo, honestidad y perseverancia se alcanzan las metas. A mi esposa Paula, por su incondicional apoyo, generosidad, paciencia y comprensión durante mis años de estudios. A mis hermanas Liliana, Mónica y sus familias, por alentarme a alcanzar mis metas.

A mi profesor guía Dr. Bernabé L. Rivas, por sus enseñanzas e invaluable asesorías durante el desarrollo de mi trabajo de investigación. A los doctores Julio San Román, María R. Aguilar y María A. Mondaca, por la oportunidad de complementar mi formación en sus instalaciones y bajo su supervisión. A los doctores Luis H. Tagle, Nicolás Gatica y David Contreras, miembros de la Comisión Evaluadora de Tesis, por sus correcciones y sugerencias. A los integrantes del Grupo de Polímeros Funcionales de la Universidad de Concepción, liderado por el profesor Bernabé L. Rivas: Dr. Bruno Urbano, Dr. Julio Sánchez, QAN Lorena Leyton, Víctor, Daniela, Eli, Yesid, Karla, Nátali, Bryan, Mario y Leandro, por compartir sus conocimientos o simplemente por hacer más ameno las largas jornadas en el laboratorio. A todo el personal de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Concepción, en especial a la Sra. Angélica Hernández. Al Dr. Manuel Palencia, Cristian Muñoz e Iván Araya, por su amistad.

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, CONICYT, por la Beca de Doctorado en Chile para extranjeros 2009. Al Programa de Mejoramiento de la Calidad y Equidad de la Educación Superior, MECESUP, por el financiamiento de la estadía de investigación en el extranjero (Proyecto UCH0601). A la Escuela de Graduados y Dirección de Posgrado de la Universidad de Concepción, por el apoyo económico para la asistencia a eventos de divulgación científica.

## Resumen

La creciente amenaza de la resistencia a los antibióticos y la preocupación sobre la seguridad y toxicidad de los antisépticos tópicos, ha despertado un renovado interés en el antiguo uso de la plata para contrarrestar las infecciones bacterianas en las heridas agudas y crónicas. Como respuesta, en los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de apósitos para heridas que contienen nanopartículas de plata (NPsAg ó nanoplata), destacándose los basados en hidrogeles poliméricos que proporcionan un suministro continuo de plata, menor frecuencia de reemplazo, control del exudado excesivo y un ambiente húmedo en la herida que facilita el proceso de cicatrización.

Actualmente existen diversos estudios contradictorios en cuanto a la eficacia antibacteriana y citotoxicidad de los apósitos “hidrogel-nanoplatina” y por ello muchos investigadores continúan en la búsqueda de nuevos tipos de hidrogeles que mejoren su función como matriz de soporte de las NPsAg y optimicen el equilibrio entre poder antibacteriano y citotoxicidad. La presente investigación contribuye en dicha búsqueda, al evaluar el uso de los copolímeros poli[VP-co-AMPSNa] [1:1] y poli[AAm-co-AMPSNa] [1:1] como matriz de soporte de las NPsAg, incorporadas por inmersión de los respectivos xerogeles en suspensiones acuosas de NPsAg estabilizadas con citrato.

Los hidrogeles se obtuvieron por copolimerización radicalaria en medio acuoso de los monómeros correspondientes, utilizando 3 y 6 mol% de *N,N*-metilen-bis-acrilamida (MBA) como entrecruzador. La distribución de los monómeros en ambos sistemas copoliméricos (sin MBA) presentó una tendencia “moderadamente alternante”, ya que el producto de sus relaciones de reactividad fue cercano a cero. Se demostró mediante <sup>1</sup>H-RMN en estado sólido la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilo del citrato que cubren la superficie de las NPsAg y los grupos amida laterales de los copolímeros. Los compositos hidrogel-nanoplatina con menor porcentaje de entrecruzador retuvieron mayor cantidad de plata total. El composito procedente del hidrogel poli[VP-co-AMPSNa] [1:1] con menor grado de entrecruzamiento, presentó la mayor capacidad antibacteriana y menor citotoxicidad entre los compositos evaluados, que lo convierten en una excelente alternativa como potencial apósito en polvo para el tratamiento de heridas profundas y exudativas.

## Abstract

The increasing threat of resistance to antibiotics and the concern about the safety and the toxicity of topic antiseptics has resulted in a renewed interest in the ancient use of silver to treat bacterial infections in acute and chronic wounds. In response, in recent years wound dressings containing silver nanoparticles (nanosilver or AgNPs) have been developed, particularly those based on polymeric hydrogels providing a continuous supply of silver, less frequent replacement, controlling excess exudate and a wound moist environment that improves the healing process.

There are currently several contradictory studies that deal with the antibacterial efficacy and cytotoxicity of the hydrogel-NPsAg dressings and for this reason, many researchers have continued with the search of new types of hydrogels which improve its role as the supporting matrix of AgNPs and optimize the balance between antibacterial efficacy and cytotoxicity. In this investigation the use of poly[VP-*co*-AMPSNa] [1:1] and poly[AAM-*co*-AMPSNa] [1:1] hydrogels as a supporting matrix of AgNPs incorporated by immersing the respective xerogels into the aqueous suspensions of citrate-stabilized AgNPs was evaluated.

The hydrogels were obtained by radical copolymerization in aqueous media of the respective monomers, using 3 mol% and 6 mol% of *N,N*-methylene-bis-acrylamide (MBA) as a crosslinking reagent. The distribution of the monomers in both copolymers (without MBA) showed a tendency to “moderately alternate” because the product of their reactivity ratios was near to zero. The formation of hydrogen bonds between the carboxylic acid groups that cover the surface of the AgNPs and the amide groups pendant to the main chain of the copolymers, was confirmed by solid-state <sup>1</sup>H-NMR. The hydrogel-nanosilver composites with a lower percentage of MBA retained more silver. The hydrogel-NPsAg composite with highest antibacterial effect and lowest cytotoxicity was that prepared from the poly[VP-*co*-AMPSNa] [1:1] less crosslinked (3 mol% MBA), therefore, it could be much more appropriate than others ones as potential candidate for the treatment of deep and exudative wounds.

# Tabla de contenido

<b>Resumen</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	4
<b>Capítulo 1 : Introducción</b> .....	13
1.1    Marco teórico .....	13
1.1.1    Nanopartículas de plata y sus actividades biológicas.....	13
1.1.2    Dispersión de nanopartículas de plata y sus aplicaciones biomédicas .....	17
1.1.3    Hidrogeles como matriz de soporte de nanopartículas de plata .....	18
1.1.4    Estrategias para la obtención de compositos de hidrogel-NPsAg .....	20
1.1.5    Métodos de obtención de nanopartículas de plata.....	21
1.2    Problemática y antecedentes de la propuesta doctoral .....	23
1.3    Hipótesis.....	26
1.4    Objetivos .....	26
1.4.1    Objetivo general .....	26
1.4.2    Objetivos específicos .....	26
<b>Capítulo 2 : Materiales y Métodos</b> .....	28
2.1    Reactivos .....	28
2.2    Síntesis y caracterización de NPsAg.....	28
2.3    Síntesis de copolímeros y preparación de compositos .....	30
2.3.1    Síntesis de copolímeros entrecruzados (hidrogeles) .....	30
2.3.2    Síntesis de copolímeros lineales.....	31
2.3.3    Preparación de los compositos .....	31
2.4    Caracterización de copolímeros y compositos .....	32
2.4.1    Caracterización espectroscópica .....	32
2.4.2    Microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de energía dispersiva.....	33
2.4.3    Caracterización termogravimétrica (TGA) .....	33
2.4.4    Cuantificación de plata total liberada por los compositos hidrogel-NPsAg.....	34

2.4.5	Ensayos de absorción de líquidos: agua y PBS .....	34
2.5	Material biológico y bioensayos .....	35
2.5.1	Cultivos celulares .....	35
2.5.2	Ensayos de Actividad Antibacteriana .....	35
2.5.3	Ensayo de citotoxicidad .....	37
<b>Capítulo 3 : Resultados y Discusión .....</b>		<b>39</b>
3.1	Nanopartículas de plata .....	39
3.2	Hidrogeles y copolímeros lineales .....	45
3.2.1	Elucidación estructural de los hidrogeles mediante <sup>1</sup> H-RMN en estado sólido .....	46
3.2.2	Composición molar de los monómeros en los sistemas poliméricos .....	48
3.2.3	Reactividad de los comonómeros en los sistemas poliméricos .....	51
3.3	Compositos hidrogel-nanoplatina.....	56
3.3.1	Análisis de los compositos por <sup>1</sup> H-RMN en estado sólido y ATR-FTIR.....	57
3.3.2	Microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de energía dispersiva.....	59
3.3.3	Análisis termogravimétrico.....	63
3.3.4	Capacidad de absorción de líquidos: agua y PBS .....	64
3.4	Actividad antibacteriana y capacidad de liberación de plata de los compositos .....	71
3.5	Citotoxicidad de los compositos .....	83
<b>Conclusiones y Perspectivas .....</b>		<b>87</b>
<b>Referencias Bibliográficas .....</b>		<b>90</b>
<b>Anexos .....</b>		<b>99</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Escala comparativa de tamaños entre NPsAg y bacterias tales como <i>E. coli</i> . Las NPs que tienen un tamaño entre 100 y 1000 veces menor que una bacteria, pueden atravesar la membrana celular bacteriana.....	13
<b>Figura 1.2.</b> La disminución del radio de la NP, incrementa su “relación superficie/volumen”. Esto implica que entre dos grupos de NPs con similares masas totales, el grupo con NPs de menor radio (tamaño) tiene mayor contacto con las bacterias.....	14
<b>Figura 1.3.</b> Micrográficas electrónicas de barrido de NPsAg con diferentes morfologías: (A) cubos, (B) barras y bastones [9], (C, D) esferas [10], (E) alambres [11] y (F) placas triangulares y triangulares truncadas [12]. .....	15
<b>Figura 1.4.</b> Esquemización de algunos mecanismos de acción antibacterianos de las NPsAg. ....	16
<b>Figura 1.5.</b> Ejemplos de hidrogeles usados como vehículo para liberación controlada de plata en el tratamiento de heridas. ....	20
<b>Figura 1.6.</b> Fórmula estructural de los monómeros utilizados en la síntesis de los hidrogeles copoliméricos: (a) 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio, (b) <i>N</i> -vinilpirrolidona, (c) acrilamida y (d) <i>N,N</i> -metilen-bis-acrilamida.....	25
<b>Figura 2.1.</b> Esquema de síntesis de las nanopartículas de plata. ....	29
<b>Figura 2.2.</b> Esquema de la reacción de polimerización para la obtención de poli[VP- <i>co</i> -AMPSNa]....	30
<b>Figura 2.3.</b> Esquema de la reacción de polimerización para la obtención de poli[AAM- <i>co</i> -AMPSNa].....	31
<b>Figura 3.1.</b> Espectro UV-visible del coloide N°2 (izquierda) y efecto Tyndall que confirma la obtención de una dispersión coloidal de nanopartículas de plata (derecha).....	39
<b>Figura 3.2.</b> Distribución de tamaños respecto a la Intensidad de luz dispersada (DLS) de las NPsAg del coloide N°1 (izquierda) y el coloide N°2 (derecha).....	40

<b>Figura 3.3.</b> Distribución de tamaño de NPsAg en el coloide N°1 (arriba) y coloide N°2 (abajo) analizado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (300 partículas medidas). Medias: $16\pm 20$ y $11\pm 12$ nm, respectivamente. Dimensión de la barra en las micrografías: 20 nm.....	42
<b>Figura 3.4.</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido del hidrogel 15.....	46
<b>Figura 3.5.</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido del hidrogel 7.....	47
<b>Figura 3.6.</b> Región vinílica de algunos espectros de $^1\text{H}$ -RMN representativos de la reacción de copolimerización a diferentes tiempos del sistema AAm: AMPSNa (30: 70). ....	51
<b>Figura 3.7.</b> Región vinílica de algunos espectros de $^1\text{H}$ -RMN representativos de la reacción de copolimerización a diferentes tiempos del sistema VP: AMPSNa (30: 70).....	52
<b>Figura 3.8.</b> Diagramas de relaciones de reactividad de los sistemas: (a) VP:AMPSNa y (b) AAm:AMPSNa. Rombos vacíos: reacción con composición inicial de monómeros (30:70); triángulos sólidos: reacción con composición inicial de monómeros (50:50); y cuadrados sólidos: reacción con composición inicial de monómeros (70:30).....	53
<b>Figura 3.9.</b> Fracción molar instantánea de VP en el copolímero para el sistema poli[VP-co-AMPSNa] en función de la conversión y la composición de VP en la alimentación. Las líneas negras representan el curso que seguiría una reacción de copolimerización para una determinada concentración de VP en el alimento ( $f_{VP} = 0.3, 0.5, 0.7$ ) y la línea gris representa el curso de la reacción para el punto azeotrópico ( $PAZ = f_{VP} = 0.478$ ).....	54
<b>Figura 3.10.</b> Fracción molar instantánea de AAm en el copolímero para el sistema poli[AAm-co-AMPSNa] en función de la conversión y la composición de AAm en la alimentación. Las líneas negras representan el curso que seguiría la reacción para determinadas fracciones molares de AAm en la alimentación ( $f_{AAm} = 0.3, 0.5, 0.7$ ). ....	55
<b>Figura 3.11.</b> Comparación de los espectros de $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido entre: (a) composito 13 e hidrogel 15, (b) composito 5 e hidrogel 7. La intensidad de la señal de los protones amídicos (mostrada en el círculo) es mayor en los compositos.....	57



<b>Figura 3.12.</b> Representación esquemática de un enlace de hidrógeno (sugerido [75]) entre el grupo amídico lateral del copolímero poli[AAm-co-AMPSNa] y NPsAg estabilizadas con citrato.....	58
<b>Figura 3.13.</b> Comparación de los espectros ATR-FTIR entre: (a) composito 13 e hidrogel 15, (b) composito 5 e hidrogel 7. Los estiramientos $\nu$ N-H de los compositos (mostrados en los círculos) presentan bandas de mayor intensidad. ....	59
<b>Figura 3.14.</b> Micrografías electrónicas de barrido de la superficie externa de los compositos hidrogel-NPsAg: (a) 5, (b) 9, (c) 13 y (d) 18.....	60
<b>Figura 3.15.</b> Micrografías electrónicas de barrido de la superficie externa de los compositos hidrogel-NPsAg: (a) 6, (b) 10, (c) 14 y (d) 19.....	61
<b>Figura 3.16.</b> Espectros EDS de una sección de corte de los compositos hidrogel-NPsAg: (a) 5, (b) 9, (c) 13 y (d) 18.....	62
<b>Figura 3.17.</b> Efecto del tipo de unidades monoméricas (VP:AMPSNa, AAm:AMPSNa) y cantidad de entrecruzador (3 mol%, 6 mol%) en el comportamiento termogravimétrico de los compositos preparados con el coloide N°1 (compositos: 5, 9, 13 y 18).....	64
<b>Figura 3.18.</b> Efecto del tipo de unidades monoméricas (VP:AMPSNa, AAm:AMPSNa) y cantidad de entrecruzador (3 mol%, 6 mol%) en el comportamiento termogravimétrico de los compositos preparados con el coloide N°2 (compositos 6, 10, 14 y 19).....	64
<b>Figura 3.19.</b> Absorción de agua UP en función del tiempo para los compositos hidrogel-nanoplatina preparados con el coloide N°1 (a, b), coloide N°2 (c, d) y sus hidrogeles de procedencia con diferentes unidades monoméricas (VP:AMPSNa, AAm:AMPSNa) y cantidades de entrecruzador MBA (3 mol%, 6 mol%). Hidrogel 7 y compositos 5, 6: VP:AMPSNa-3 mol%; Hidrogel 11 y compositos 9, 10: VP:AMPSNa-6 mol%; Hidrogel 15 y compositos 13, 14: AAm:AMPSNa-3 mol%; Hidrogel 22 y compositos 18, 19: AAm:AMPSNa-6 mol%.....	66

**Figura 3.20.** Absorción de tampón fosfato salino (PBS) en función del tiempo para los compositos hidrogel-nanoplatina preparados con el coloide N°1 (a, b), coloide N°2 (c, d) y sus hidrogeles de procedencia con diferentes unidades monoméricas (VP:AMPSNa, AAm:AMPSNa) y cantidades de entrecruzador MBA (3 mol%, 6 mol%). Hidrogel 7 y compositos 5, 6: VP:AMPSNa-3 mol%; Hidrogel 11 y compositos 9, 10: VP:AMPSNa-6 mol%; Hidrogel 15 y compositos 13, 14: AAm:AMPSNa-3 mol%; Hidrogel 22 y compositos 18, 19: AAm:AMPSNa-6 mol%.....69

**Figura 3.21.** Zonas de inhibición (mm) producidas por los compositos hidrogel-NPsAg procedentes del coloide N°1 y los controles positivos ( $Ag^+$ ) en las placas de agar sembradas con: *E. coli* (barras grises) y *S. aureus* (barras blancas). Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (n=3) y las diferencias significativas obtenidas con ANOVA ( $p < 0.05$ ) frente a: 108 ppm de  $Ag^+$  (\*) y el composito 5 (+).....72

**Figura 3.22.** Imágenes de las zonas de inhibición del crecimiento de *E. coli* (ATCC 25922) generadas por los compositos: (a) 5, (b) 9, (c) 13 y (d) 18, después de 18 h de incubación a 37 °C.....73

**Figura 3.23.** Imágenes de las zonas de inhibición del crecimiento de *S. aureus* (ATCC 6538P) generadas por los compositos: (a) 5, (b) 9, (c) 13 y (d) 18, después de 18 h de incubación a 37 °C.....74

**Figura 3.24.** Zonas de inhibición (mm) producidas por los compositos hidrogel-NPsAg procedentes del coloide N°2 y los controles positivos ( $Ag^+$ ) en las placas de agar sembradas con: *E. coli* (barras grises) y *S. aureus* (barras blancas). Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (n=3) y las diferencias significativas obtenidas con ANOVA ( $p < 0.05$ ) frente a: 108 ppm de  $Ag^+$  (\*) y el composito 6 (+).....75

**Figura 3.25.** Porcentajes de viabilidad celular respecto al TMX generados por los extractos (en medio MEM) de los compositos hidrogel-NPsAg del tipo poli[VP-co-AMPSNa] preparados con el coloide N°1 (5 y 9), coloide N°2 (6 y 10) y sus respectivos hidrogeles de procedencia (7 y 11), sobre fibroblastos embrionarios humanos. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (n=8) y las diferencias significativas obtenidas con ANOVA frente a TMX (\*:  $p < 0.05$ ).....84

**Figura 3.26.** Porcentajes de viabilidad celular respecto al TMX generados por los extractos (en medio MEM) de los compositos hidrogel-NPsAg del tipo poli[AAm-co-AMPSNa] preparados con el coloide N°1 (13 y 18), coloide N°2 (14 y 19) y sus respectivos hidrogeles de procedencia (15 y 22), sobre fibroblastos embrionarios humanos. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (n=8) y las diferencias significativas obtenidas con ANOVA frente a TMX (\*:  $p < 0.05$ ). .....85

**Figura 3.27.** Porcentajes de viabilidad celular generados por disoluciones seriadas de  $\text{AgNO}_3$  sobre fibroblastos humanos. Las concentraciones de las disoluciones de  $\text{AgNO}_3$  se expresan en función del ión plata. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (n=3). .....86



## Índice de Tablas

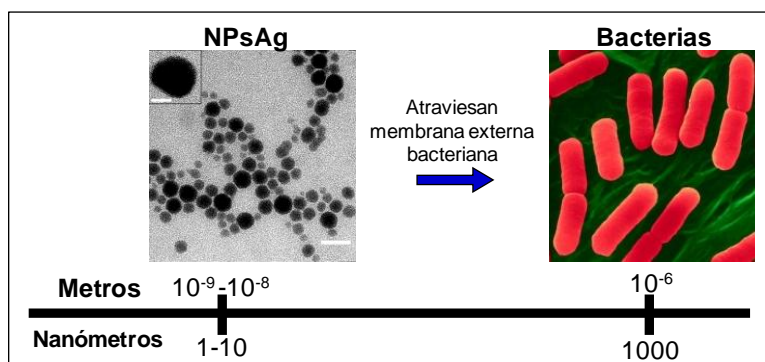
<b>Tabla 1.</b> Diámetros promedio ( $\phi$ ) y porcentajes (%) de las diferentes poblaciones de partícula que conforman cada coloide obtenido. N.A: No aplica. ....	41
<b>Tabla 2.</b> Rendimientos de reacción obtenidos en la síntesis de los hidrogeles. ....	45
<b>Tabla 3.</b> Identificación de las señales del espectro $^1\text{H-RMN}$ del copolímero poli[AAm-co-AMPSNa]. ....	49
<b>Tabla 4.</b> Identificación de las señales del espectro $^1\text{H-RMN}$ del copolímero poli[VP-co-AMPSNa]. ....	49
<b>Tabla 5.</b> Volumen de coloide absorbido por gramo de xerogel y numeración asignada al composito resultante. ....	56
<b>Tabla 6.</b> Identificación de los picos en los espectros ATR-FTIR de los hidrogeles poli[VP-co-AMPSNa] y poli[AAm-co-AMPSNa]. ....	59
<b>Tabla 7.</b> Zonas de inhibición producidas por los compositos e hidrogeles sobre la superficie de placas de agar TSA sembradas con <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> y porcentajes de plata liberada por los compositos después de sumergirlos en agua UP durante 4 días. ....	71
<b>Tabla 8.</b> Recuento estándar en placa de bacterias <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> cultivadas previamente en caldo TS y expuestas durante 24 y 48 horas a 10 mg de muestra por mililitro de cultivo. El número de bacterias viables de <i>E. coli</i> en el tiempo cero de contacto para todas las muestras evaluadas fue igual a $5 \times 10^7$ UFC mL <sup>-1</sup> . En el caso de las bacterias <i>S. aureus</i> fue de $2 \times 10^6$ UFC mL <sup>-1</sup> . ....	78

## Capítulo 1: Introducción

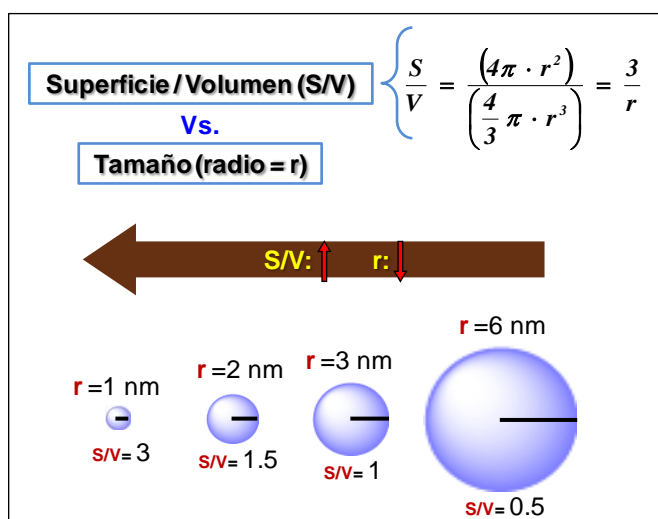
### 1.1 Marco teórico

#### 1.1.1 Nanopartículas de plata y sus actividades biológicas

Los metales con tamaño a escala nanométrica tienen características únicas, que están ausentes en sus contrapartes de tamaño macroscópico, y que los convierten en materiales con aplicaciones potenciales en las áreas de fotónica, electrónica, química, catálisis, biosensores y medicamentos [1]. Los nanomateriales de plata, en particular, tienen dimensiones inferiores a 100 nm y se les conoce desde hace más de 100 años por su excelente actividad antibacteriana, como es el caso de la “plata coloidal”, cuyo nombre hace referencia a las primeras suspensiones de nanopartículas de plata (NPsAg). Desde antes de la invención de la penicilina en 1928, la plata coloidal se ha utilizado para el tratamiento de infecciones bacterianas [2]. Morones y colaboradores demostraron que la actividad antibacteriana de las NPsAg depende de su distribución de tamaños y que solamente las NPsAg menores de 10 nm pueden ingresar en las bacterias y causar su muerte (ver Figuras 1.1 y 1.2) [3]. Otros investigadores afirman que dicha actividad solo se encuentra presente en las NPsAg parcialmente oxidadas, debido probablemente a la liberación de los iones  $\text{Ag}^+$  quimisorbidos sobre su superficie. Así, una de las grandes ventajas de las nanopartículas de plata es que se comportan como nano-transportadores de iones  $\text{Ag}^+$  que se dosifican de manera estable en el tiempo [4].



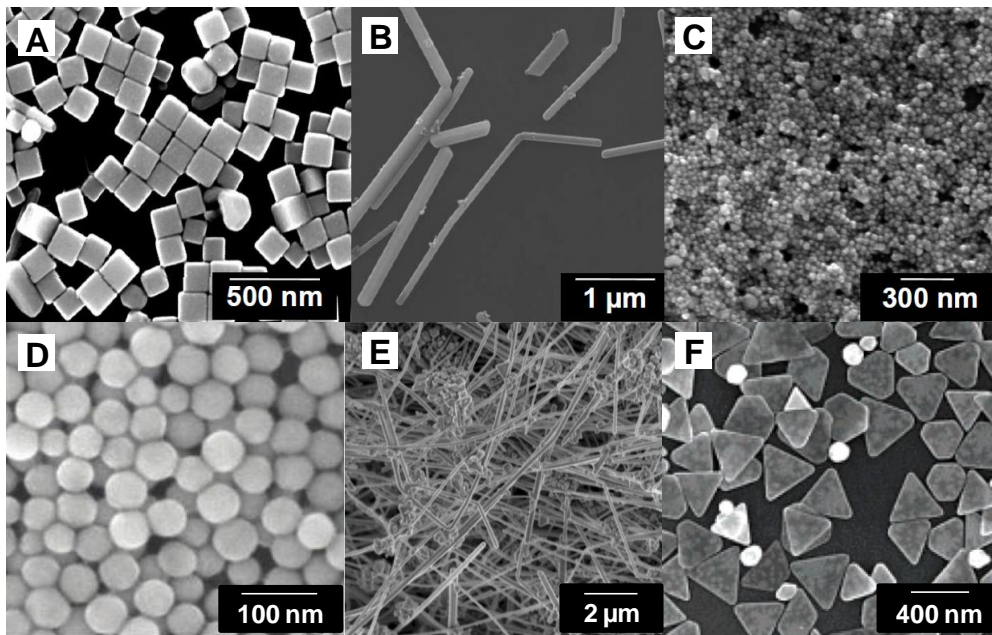
**Figura 1.1.** Escala comparativa de tamaños entre NPsAg y bacterias tales como *E. coli*. Las NPs que tienen un tamaño entre 100 y 1000 veces menor que una bacteria, pueden atravesar la membrana celular bacteriana.



**Figura 1.2.** La disminución del radio de la NP, incrementa su “relación superficie/volumen”. Esto implica que entre dos grupos de NPs con similares masas totales, el grupo con NPs de menor radio (tamaño) tiene mayor contacto con las bacterias.

Las diferencias de actividad antibacteriana entre las NPs<sub>Ag</sub> de distintos tamaños, también pueden explicarse a partir de los niveles de iones  $\text{Ag}^+$  quimisorbidos. Mientras más pequeñas son las nanopartículas, mayor es su relación superficie-masa, y por lo tanto poseen mayor concentración relativa de  $\text{Ag}^+$  quimisorbidos [5]. Además del tamaño de las nanopartículas, otros aspectos que influyen en la velocidad y el grado de liberación de iones  $\text{Ag}^+$  en medio acuoso, son: la presencia o ausencia de un agente estabilizante, la naturaleza química del agente estabilizante (estabilización por cargas o por impedimento estérico), la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la exposición al oxígeno molecular, a la luz (especialmente luz ultravioleta) y a otras sales (sulfuros, sulfatos, cloruros). En el caso de NPs<sub>Ag</sub> estabilizadas con citrato y/o polivinilpirrolidona (PVP) a 37 °C, la liberación de iones  $\text{Ag}^+$  se procede lentamente, en una escala de tiempo de varios días [6].

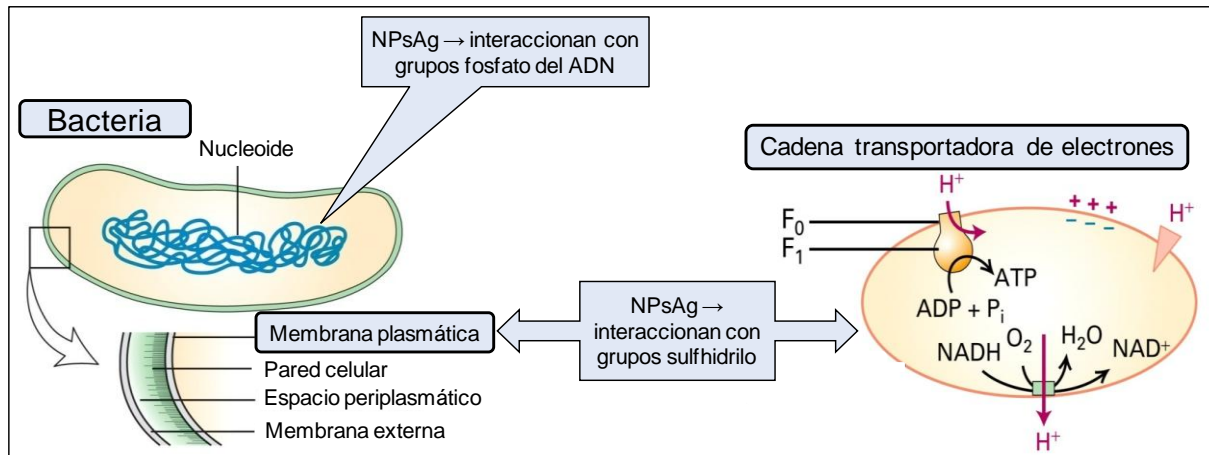
Adicionalmente, se ha logrado desarrollar nanopartículas de plata de diferentes formas (ver Figura 1.3), tales como: esferas, cubos, barras, alambres, en forma de bastón y placas triangulares truncadas. Estas últimas, muestran una fuerte actividad antibacteriana debido a su gran superficie con respecto al volumen y a sus estructuras de superficie cristalográfica; entre las distintas formas, la esférica es la más producida ya que tiene la mínima superficie para un volumen dado y otorga a las nanopartículas mayor estabilidad termodinámica [7, 8].



**Figura 1.3.** Micrografías electrónicas de barrido de NPsAg con diferentes morfologías: (A) cubos, (B) barras y bastones [9], (C, D) esferas [10], (E) alambres [11] y (F) placas triangulares y triangulares truncadas [12].

Por otro lado, la concentración efectiva de las NPsAg contra bacterias es mucho menor en comparación con la plata iónica (niveles del orden nanomolar versus milimolar, respectivamente) [13] a pesar de que ambas especies químicas poseen mecanismos de acción muy similares sobre las bacterias. Tales mecanismos implican la interacción de dichas especies químicas con las proteínas de membrana y con la bicapa fosfolipídica de las bacterias, colapsando la fuerza protón-motriz e impidiendo el intercambio metabólico de sustancias. También interactúan con los grupos sulfhidrilos de algunas enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa (NADH deshidrogenasas), evitando la transferencia eficiente de electrones al oxígeno molecular, lo que conduce a la interrupción de la síntesis de ATP y a la producción descontrolada de especies reactivas de oxígeno (anión radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) las cuales producen daños al ADN. Las NPsAg e iones  $\text{Ag}^+$  también pueden unirse a los grupos fosfato del ADN, interrumpiendo así su replicación y provocando la muerte de la bacteria (ver Figura 1.4) [3, 14, 15].





**Figura 1.4.** Esquematación de algunos mecanismos de acción antibacterianos de las NPsAg.

En la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha, se concluye que la toxicidad de las NPsAg es mucho menor que la de una masa equivalente de alguna sal de plata. El hecho de que las células humanas sean menos sensibles al efecto tóxico de las NPsAg (y de los iones plata) en comparación con las células bacterianas, probablemente se deba a su mayor complejidad estructural y funcional. La anterior afirmación puede ser ilustrada considerando las diferencias estructurales de la cadena transportadora de electrones (CTE) entre células bacterianas y humanas. La CTE bacteriana está localizada en la envoltura celular (capa exterior de la célula) mientras que la CTE de células humanas se encuentran en el interior de la célula, específicamente en las mitocondrias y por lo tanto, la plata iónica (o NPsAg) accede más fácilmente a la CTE bacteriana con el fin de inactivarla. Para lograr una inactivación comparable de las proteínas de la CTE mitocondrial, se requieren mayores concentraciones de plata, ya que la membrana celular actúa como una barrera de difusión que debe ser superada en primer lugar, antes de alcanzar las mitocondrias. Además, en contraste con la única CTE de cada célula bacteriana, cada célula humana generalmente posee varias mitocondrias, lo cual le permite seguir produciendo energía biológica incluso cuando algunas de ellas han sido inactivadas por los iones  $Ag^+$  o NPsAg [16].

El reconocido efecto bactericida de las NPsAg cubre un amplio espectro de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluyendo cepas resistentes a antibióticos. Entre las bacterias Gram-negativas se incluyen los géneros: *Acinetobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Vibrio*. Las especies *Acinetobacter* están asociadas con las infecciones



nosocomiales, es decir, infecciones que surgen de los tratamientos hospitalarios. Entre las bacterias Gram-positivas se incluyen los géneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* [17, 18, 7]. Y por último, en el grupo de bacterias resistentes a los antibióticos, se incluyen a las cepas: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y resistentes a la vancomicina y *Enterococcus faecium* [19, 20]. El uso simultáneo de NPsAg (5-32 nm de diámetro) y algunos antibióticos (penicilina G, amoxicilina, eritromicina, clindamicina) contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, potencializa el efecto de los antibióticos [21].

Además del efecto bactericida descrito anteriormente, se ha reportado la capacidad fungicida de las NPsAg de aproximadamente 13.4 nm de diámetro en concentraciones entre 6.6 y 33 nM frente a levadura [22]. La actividad antifúngica del fluconazol contra *C. albicans*, *P. glomerata* y *Trichoderma sp.*, también se incrementa en presencia de NPsAg [23]. Por otro lado, Sun y colaboradores demostraron que NPsAg con una concentración 50  $\mu$ M ejercen un potente efecto inhibitorio de la replicación del virus HIV-1 [24], que probablemente se origina por la interacción entre las NPs y la glicoproteína gp120, lo cual bloquea la capacidad del virus para unirse a células receptoras [3].

Una de las propiedades más importantes de las NPsAg, desde el punto de vista de su potencial aplicación, es su actividad cicatrizante. Algunos investigadores han demostrado que la actividad cicatrizante de las NPsAg insertadas en los vendajes, es mayor que la del compuesto sulfadiazina de plata, ampliamente usado para este objetivo. El estudio muestra que las NPsAg, además de sus propiedades antimicrobianas son capaces de controlar procesos inflamatorios mediante la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias [25].

### **1.1.2 Dispersión de nanopartículas de plata y sus aplicaciones biomédicas**

La tendencia de las NPsAg a aglomerarse rápidamente en soluciones acuosas y la dificultad para unirse a diversas superficies sigue siendo uno de los principales desafíos en el desarrollo de nuevas aplicaciones [26, 27]. Para mejorar la estabilización o dispersión de las NPsAg en medios líquidos, se utilizan diversos agentes protectores y/o estabilizantes que interactúan con

las nanopartículas mediante procesos de adsorción y aseguran una distribución homogénea por largos períodos de tiempo.

Entre los agentes estabilizantes (líquidos) más usados se destacan los ligandos orgánicos de cadena alquílica larga con grupos funcionales como tioles [28, 29, 30], carboxilatos [31, 32], fosfinas oxidadas [33] o aminas [34, 35]. También son utilizados polímeros cuya estructura molecular contiene los mismos grupos funcionales mencionados previamente. Además, éstos polímeros pueden tener una arquitectura molecular: lineal, ramificada, entrecruzada o dendrímica [36, 37, 38]. Dependiendo de la aplicación que se desee otorgar a las NPsAg, se elige un tipo particular de agente estabilizante u otro.

Se ha sugerido incorporar NPsAg en algunos polímeros entrecruzados con forma de membrana, ya que la matriz polimérica, además de cumplir su función como agente estabilizante, retardaría la oxidación de las NPsAg y el movimiento de los iones  $\text{Ag}^+$ , permitiendo su uso como apósito para quemaduras con liberación controlada de plata [39, 40]. Este tipo de apósito sería una buena alternativa para sustituir los tradicionales apósitos de tela impregnada con soluciones de nitrato de plata, los cuales liberan iones  $\text{Ag}^+$  mucho más rápido, lo que implica mayor absorción de plata y toxicidad para los pacientes [41, 42].

Hasta la fecha se han desarrollado apósitos del tipo “polímero-plata” constituidos por: quitosano con sulfadiazina de plata, nanocompositos y complejos dendrímico-plata, fibras compuestas de acetato de celulosa y NPsAg, nylon con NPsAg, e hidrogeles cargados con NPsAg [43].

Otros materiales compuestos “polímero-NPsAg” son utilizados actualmente como revestimiento de superficies en dispositivos médicos, tales como catéteres urinarios, cánulas y guantes quirúrgicos, para evitar infecciones bacterianas [44] y en la fabricación de sistemas de purificación de agua y otros productos para el cuidado sanitario.

### **1.1.3 Hidrogeles como matriz de soporte de nanopartículas de plata**

Los hidrogeles consisten en redes poliméricas tridimensionales hidrofílicas, capaces de incorporar gran cantidad de agua sin disolverse en ella. La capacidad de incorporación de agua

y la insolubilidad de los hidrogeles en medios acuosos tienen orígenes distintos. La primera propiedad se debe principalmente a la presencia en su estructura molecular de grupos funcionales hidrófilos como, por ejemplo: -OH, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -CONH-, -SO<sub>3</sub>H, etcétera, y la segunda propiedad se debe al entrecruzamiento de las cadenas poliméricas mediante fuerzas cohesivas débiles (fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno) y enlaces covalentes o iónicos [45, 46]. Las propiedades de hinchamiento y contracción que presentan los hidrogeles son altamente dependientes de factores tales como, la temperatura, el pH, la presión y los campos eléctricos, y se aprovechan actualmente en una serie de aplicaciones, que incluyen, la liberación controlada de fármacos, biosensores, simuladores de músculos (prótesis), el flujo de microfluidos e interruptores electrónicos [47, 48]. Los hidrogeles para aplicaciones biomédicas deben ser biodegradables y sus productos de degradación deben ser lo menos tóxicos posible. Esto se traduce en que los compuestos que se formen, puedan eliminarse por las diferentes rutas metabólicas o excretarse vía renal [49].

A pesar de la biodegradabilidad de los hidrogeles basados en polímeros naturales, tales como la quitina, alginatos y carragenatos [50], sus propiedades mecánicas no son muy buenas, pero frecuentemente son mejoradas mezclándolos con otros polímeros de origen sintético y biodegradables, como: poli[alcohol vinílico] (PVA), poli[N-vinilpirrolidona] (PVP), poli[etilenglicol] (PEG), poli[acrilamida] (PAAm), entre otros [51]. PVP es uno de los polímeros más usados en la medicina debido a que es soluble en agua y a que posee muy baja toxicidad [43].

En general, cuando los hidrogeles se encuentran en contacto con fluidos biológicos, las proteínas y células NO tienden a adherirse a su superficie, lo que permite considerarlos como materiales con elevado grado de biocompatibilidad. Además, al ser blandos y gomosos, no irritan los tejidos circundantes [49].

Una tendencia creciente en el tratamiento de quemaduras y heridas infectadas con bacterias, es el uso de apósitos de hidrogel que liberan nanopartículas de plata (apósitos hidrogel-NPsAg, ver Figura 1.5), las cuales ejercen una excelente actividad antibacteriana sobre un amplio espectro de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Además, el hidrogel absorbe los exudados de la herida, mantiene un ambiente húmedo y permite una liberación sostenida de

las NPsAg, evitando su frecuente sustitución y la irritación de la herida, como ocurre con otros apósitos basados en materiales textiles [52, 46].



**Figura 1.5.** Ejemplos de hidrogeles usados como vehículo para liberación controlada de plata en el tratamiento de heridas.

Las dos razones principales que motivan al desarrollo de materiales compuestos de hidrogel, cargados con NPsAg como agentes antibacterianos, son: (1) la excelente estabilidad que proporcionan las redes de hidrogel a las nanopartículas de plata y su capacidad de almacenamiento a temperatura ambiente, y (2) la alta biocompatibilidad de los hidrogeles en la naturaleza [44].

#### 1.1.4 Estrategias para la obtención de composites de hidrogel-NPsAg

Las estrategias más utilizadas para preparar composites de hidrogel-NPsAg (o polímero-NPsAg), son: (1) incorporación de NPsAg en un xerogel sometándolo a un proceso de hinchamiento-deshinchamiento con una dispersión acuosa de NPsAg; (2) incorporación y reducción química de plata iónica en un xerogel mediante dos etapas consecutivas de hinchamiento-deshinchamiento, utilizando nitrato de plata acuoso en primer lugar y posteriormente, un agente reductor en solución (formación de nanocomposites asistida por hidrogeles) [53]; (3) polimerización de monómeros vinílicos con reducción química

simultánea de plata iónica [54]; (4) polimerización en emulsión libre de surfactante (SFEP, siglas en inglés) para encapsular NPsAg en micropartículas esféricas de hidrogel; (5) polimerización radicalaria por transferencia de átomo (ATRP, siglas en inglés) de monómeros vinílicos mediada por NPsAg estabilizadas con ditioalcanoatos de 2-bromoisobutirilo; y por último, (6) la mezcla de un polímero en disolución y una dispersión coloidal de NPsAg, seguido por la evaporación del disolvente [55]. La última estrategia se conoce como “método de la evaporación”, y su principal desventaja es la frecuente distribución heterogénea de las partículas en el polímero.

Algunos composites “polímero-nanopartículas metálicas” que han sido desarrollados hasta la fecha, son: poli[alcohol vinílico]-Ag, poli[acrilamida]-Ag, poli[acrilonitrilo]-Ag, poli[alcohol vinílico]-Ag<sub>2</sub>Se, poli[imida]-Ag, poli[anilina]-Au y poli[ácido acrílico]-Cu [56, 57].

Cabe señalar que en la preparación de composites hidrogel-NPsAg para aplicaciones biomédicas, es necesario evitar el uso de disolventes orgánicos y reactivos tóxicos [55] ya que pueden ocasionar efectos deletéreos para la salud humana.

### **1.1.5 Métodos de obtención de nanopartículas de plata**

Debido a que algunos métodos para preparar composites hidrogel-NPsAg implican la obtención del hidrogel y de las NPsAg por separado, es pertinente comentar algunas formas de obtener estas últimas. Los métodos de obtención de NPsAg pueden ser clasificados en dos grupos según la fuente de plata utilizada. En el primer grupo se utiliza plata metálica “en masa” la cual se subdivide hasta la escala nanométrica mediante procedimientos tales como: síntesis electroquímica, vaporización láser, arco eléctrico, descomposición térmica, pulverización iónica (ion sputtering) y pulverización magnetron (magnetron sputtering). En el segundo grupo se utilizan sales de plata en disolución (medio acuoso u orgánico) cuyos iones Ag<sup>+</sup> son transformados a NPsAg (cerovalente) mediante distintos mecanismos, tales como la reducción: química, sonoquímica, radiolítica, fotolítica y bioquímica (mediada por material biológico).

En sistemas acuosos el agente reductor puede ser adicionado o generado *in situ*, pero en los sistemas orgánicos (no acuosos) el solvente y el agente reductor son uno mismo. Solventes o líquidos que son fácilmente oxidados como por ejemplo los alcoholes pueden así funcionar tanto como agentes reductores y como el agente dispersor. En la reducción química, en contraste con los otros métodos mencionados, el solvente no actúa como agente reductor y por tanto es necesaria la adición de un agente reductor externo (soluble) al medio, que en algunos casos también puede actuar como un agente dispersor.

Entre todos los métodos anteriores, el de reducción química es el más apropiado para producir partículas con tamaños menores de 10 nm, distribuciones de tamaño estrechas, morfología y composición controladas y, además, no necesita equipos complicados ni costosos [54]. En los métodos de reducción química, la reacción entre la plata iónica y el agente reductor puede desarrollarse en la interfase de un sistema bifásico de solventes, en el seno de un sistema homogéneo (monofásico) o en el interior de micelas inversas de un determinado surfactante formadas en una mezcla agua/solvente apolar. Dicho método se lleva a cabo con el empleo de los siguientes componentes: i) sal precursora de plata; ii) agente reductor; iii) agente estabilizante. El tamaño y la forma de las nanopartículas pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción, tales como concentración de reactivos, temperatura, pH, poder reductor, velocidad de agitación, etc. [58, 59, 60].

Las soluciones acuosas de nitrato de plata son la fuente principal de los iones  $\text{Ag}^+$  que posteriormente son transformados a plata metálica (NPsAg) [61]. Los agentes de reducción química más utilizados para la síntesis de NPsAg, son borohidruro de sodio, citrato de sodio, reactivo de Tollens, dimetilformamida, ácido ascórbico, hidracina e hidroxilaminas, entre otros [8].

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de E.E.U.U recomienda el uso de metodologías ambientalmente “amigables” para la síntesis de NPsAg, las cuales se caracterizan por evitar reactivos y sub-productos de reacción que sean tóxicos para el medio ambiente.

## 1.2 Problemática y antecedentes de la propuesta doctoral

A pesar de los importantes avances en el campo de los apósitos hidrogel-plata para el tratamiento de heridas, el principal desafío sigue siendo la optimización del equilibrio entre poder antibacteriano y citotoxicidad, y por ello hasta la fecha muchos investigadores han ensayado una gran variedad de métodos y materiales para su obtención [2, 44].

Aunque actualmente se encuentran comercialmente disponibles para su uso varios apósitos hidrogel-nanoplate, existen diversos estudios contradictorios en cuanto a su eficacia antibacteriana y citotoxicidad [2, 62].

Los diferentes grados de actividad antibacteriana y citotoxicidad (en células humanas) que presentan dichos apósitos, se relacionan directamente con la cantidad de plata total incorporada y liberada por su matriz polimérica (hidrogel), lo que a su vez depende de la naturaleza química de grupos laterales de la cadena principal del polímero y del grado de entrecruzamiento [44]. En consecuencia, durante los últimos años se ha continuado con la búsqueda de apósitos hidrogel-NPsAg más eficientes, centrándose especialmente en la obtención de una matriz polimérica que permita la liberación controlada de las NPsAg.

La incorporación de NPsAg en un xerogel sometiéndolo a un proceso de hinchamiento-deshinchamiento con una dispersión acuosa de NPsAg (métodos *ex situ*), es una de las estrategias preferidas para la obtención de composites hidrogel-NPsAg, debido a su simplicidad y bajo costo. Además, ofrece una amplia gama de posibilidades en relación a las metodologías que pueden aplicarse en la obtención del hidrogel y las nanopartículas de plata, por separado. Cualquier polímero que se utilice en dicha estrategia debe presentar una alta capacidad de absorción, que le permita retener suficiente cantidad de NPsAg después de sumergirlo en el coloide acuoso de plata, lo cual le otorgará mejores propiedades antibacterianas al composite resultante.

Los polímeros que contienen el monómero 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio (AMPSNa) presentan una alta capacidad de absorción de agua (independiente del pH del medio) y conductividad eléctrica, debido a su grupo sulfonato fuertemente ionizable que los hace ideales para aplicaciones tales como apósitos para el cuidado de heridas, liberación

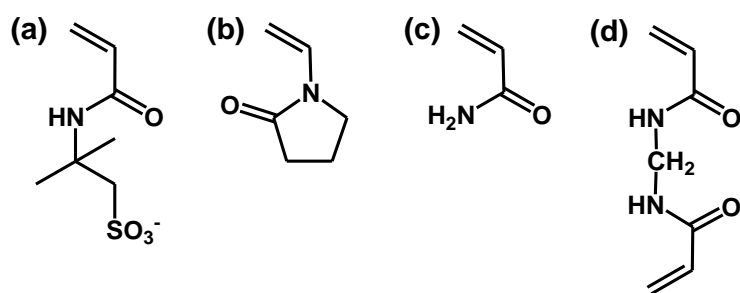


controlada de fármacos, parches transdérmicos y electrodos para electrocardiografía. Otras propiedades mejoradas por el AMPSNa, son: estabilidad térmica, resistencia a la hidrólisis, blandura, flexibilidad, transparencia y facilidad para remover con agua cualquier monómero residual que no haya reaccionado durante polimerizaciones en medio acuoso [63, 64].

Igualmente importantes son las aplicaciones médicas de los copolímeros basados en *N*-vinilpirrolidona (VP) y los copolímeros basados en acrilamida (AAm). Los copolímeros basados en VP son usados como sustitutos de plasma, portadores de fármacos solubles en agua y bioadhesivos UV-curables debido a su buena biocompatibilidad, baja toxicidad, buena formación de películas y características adhesivas; estas propiedades están asociadas al carácter anfifílico de la unidad monomérica VP, ya que ésta contiene un grupo amida altamente polar (hidrofílico) junto con grupos metileno y metino apolares (hidrofóbicos) en la cadena principal y el anillo [65, 66, 67]. Por otro lado, los copolímeros basados en AAm son empleados como implantes de tejidos blandos, soportes para enzimas, proteínas e inmovilización celular, hidrogeles para la liberación controlada de fármacos y otros usos [68, 69, 70], debido a que ellos exhiben una alta capacidad de absorción de agua, permeabilidad al oxígeno y poseen buena biocompatibilidad [68].

Los antecedentes previamente mencionados dieron origen a la presente investigación, en la cual se describe la preparación, mediante un método *ex situ*, de ocho (8) compositos hidrogel-NPsAg basados en copolímeros de AMPSNa con VP y AAm. También se informan los resultados de actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. coli* de estos compositos y su efecto citotóxico *in vitro* sobre fibroblastos humanos. El estudio comparativo entre compositos del tipo poli[VP-*co*-AMPSNa] y poli[AAm-*co*-AMPSNa] ayuda a comprender cómo se ve afectada la actividad antibacteriana, citotoxicidad, hinchamiento y liberación de NPsAg, cuando se cambia un monómero con grupo tipo N-C=O cíclico (anillo pirrolidona del VP, ver Figura 1.6 (b)), por otro monómero con grupo tipo O=C-N acíclico (amida primaria de la acrilamida, ver Figura 1.6 (c)) en copolímeros de AMPSNa portadores de NPsAg. Además, se discute el efecto de dos concentraciones distintas de entrecruzador y de plata total empleadas en la preparación de los compositos, sobre las mismas propiedades mencionadas anteriormente.





**Figura 1.6.** Fórmula estructural de los monómeros utilizados en la síntesis de los hidrogeles copoliméricos: (a) 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio, (b) *N*-vinilpirrolidona, (c) acrilamida y (d) *N,N*-metilen-bis-acrilamida.

Por otro lado, la importancia de las “relaciones de reactividad” en la caracterización de un copolímero radica en que sus valores, permiten predecir mediante el “modelo terminal de copolimerización”, la tendencia de los monómeros a formar una estructura alternante, en bloque, o al azar, en el copolímero resultante. En varios trabajos científicos se han informado las relaciones de reactividad de los copolímeros poli[VP-*co*-AMPSNa] y poli[AAM-*co*-AMPSNa] [71, 72, 73, 74], pero los valores no muestran concordancia entre sí, especialmente en el caso de poli[VP-*co*-AMPSNa]; es por esto que, en la presente tesis se determinan nuevamente las “relaciones de reactividad” de estos sistemas copoliméricos (sin entrecruzador) bajo las condiciones experimentales de trabajo y luego se contrastan con los de la literatura.

En la actualidad existen diversos estudios sobre compositos tipo polímero/nanopartículas metálicas que sugieren interacciones de distinta naturaleza en la interfase polímero/metal [75, 76], pero en pocos se muestra evidencia mediante <sup>1</sup>H-RMN en estado sólido, que confirme tales aseveraciones. Por ello, en la presente investigación también se realiza un análisis comparativo de los hidrogeles y sus respectivos compositos hidrogel-nanoplatina mediante resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H-RMN) en estado sólido, demostrándose la efectividad de esta técnica analítica para detectar enlaces de hidrógeno en la interfase polímero/metal.

Aunque los dos sistemas copoliméricos mencionados han sido sintetizados por otros grupos de investigación [71, 72, 73, 74], cabe destacar que hasta la fecha y después de una revisión bibliográfica exhaustiva, no se ha informado la utilización del poli[VP-*co*-AMPSNa] como

soporte de NPsAg. Por lo tanto, es probable que el presente estudio sea el primero en evaluar dicha capacidad para el copolímero, y en demostrar su potencial aplicación como apósito antibacteriano en polvo.

### 1.3 Hipótesis

- Los hidrogeles cargados con coloides de plata mostrarán actividad antibacteriana.
- La cantidad de “plata total” liberada en medio acuoso por los compositos hidrogel-nanoplate, será mayor para aquellos con menor cantidad de entrecruzador y viceversa.

### 1.4 Objetivos

#### 1.4.1 Objetivo general

Obtener compositos antibacterianos hidrogel-plata incorporando nanopartículas de plata en copolímeros sintetizados a partir de 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio (AMPSNa).

#### 1.4.2 Objetivos específicos

- Sintetizar hidrogeles entrecruzados mediante copolimerización de AMPSNa con monómeros potencialmente activos en la inmovilización de NPsAg.
- Obtener NPsAg mediante un método de reducción química convencional.
- Preparar compositos de hidrogel-NPsAg por incorporación de las NPsAg en los hidrogeles entrecruzados.

- Caracterizar física y estructuralmente los hidrogeles entrecruzados y los compositos de hidrogel-NPsAg, mediante técnicas analíticas y ensayos experimentales, tales como:  $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido, ATR-FTIR, SEM, EDS, TGA, cuantificación por EAA de plata total liberada en medio acuoso, capacidad de absorción de agua y PBS.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los compositos hidrogel-NPsAg sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* de los compositos sobre fibroblastos humanos usando un ensayo tipo MTT.



## Capítulo 2: Materiales y Métodos

### 2.1 Reactivos

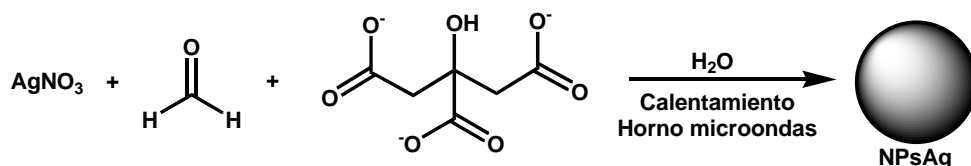
El monómero AMPSNa fue preparado por neutralización (pH 7) de una solución acuosa de ácido 2-acrilamido-2-metilpropansulfónico (>99%, Sigma) con hidróxido de sodio 1 M (Merck). El monómero VP (99%, Sigma) fue destilado bajo presión reducida. AAm (>98%, Fluka), persulfato de potasio (KPS; >99%, Sigma), MBA (>99%, Sigma), formaldehído (37%, Merck), citrato trisódico dihidratado (citrato, >99%, Merck) y  $\text{AgNO}_3$  (>99%, Merck) se usaron sin purificación adicional. El tampón fosfato salino (PBS) de pH 7.4 y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) fueron suministrados por Sigma y usados sin purificación adicional. Se utilizó agua ultrapura (agua UP) obtenida de un sistema de purificación de agua Milli-Q®.

### 2.2 Síntesis y caracterización de NPsAg

La síntesis química de las NPsAg se realizó calentando intermitentemente en un horno microondas (2.45 GHz, 800 W) 1000 mL de una solución acuosa 1 mM de  $\text{AgNO}_3$ , 1mM de citrato y 5 mM de formaldehído (contenida en un cristizador Pyrex® de 190x100 mm con tapa de vidrio). Después de 24 ciclos de calentamiento ON-OFF de 20-20 segundos (que coincidió con la aparición de un color amarillo tenue en la mezcla de reactivos) se suspendió el calentamiento, se sometió a agitación magnética vigorosa por 30 segundos e inmediatamente después, el reactor fue sumergido en un baño de agua-hielo para detener la reacción. El coloide de plata producido se almacenó en condiciones de oscuridad a 4°C en un recipiente de vidrio ámbar. La concentración de plata total (iónica y cerovalente) en este primer coloide fue de 105.8 ppm y se rotuló con el nombre de “coloide N°1”. Luego, se sintetizó el “coloide N°2” utilizando el mismo procedimiento pero con concentraciones de reactivos reducidas a la mitad respecto al primero, lo que corresponde a una concentración de plata total de 53.7 ppm (0.5 mM  $\text{AgNO}_3$  + 0.5 mM de citrato + 2.5 mM de formaldehído).

Se obtuvo el espectro de absorción UV-visible de ambos coloides de plata en el rango 200-800 nm con un espectrómetro Lambda 35 (Perkin Elmer), usando agua UP para ajustar la línea

base. Se tomaron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los coloides con un microscopio JEOL JEM 1200 EX II (4 Å de resolución) equipado con un espectrómetro de energía dispersiva de rayos X (EDS). Una gota de cada coloide fue ubicada sobre una malla de cobre 150-mesh y secada a 35°C para la obtención de las imágenes y el respectivo análisis elemental por EDS.



**Figura 2.1.** Esquema de síntesis de las nanopartículas de plata.

Con el equipo Zetasizer (Malvern Instruments Ltd.) se realizaron experimentos de movilidad electroforética y dispersión de luz dinámica (DLS) para determinar el tipo de carga eléctrica próxima a la superficie de las NPsAg (potencial zeta), su tamaño promedio y distribución de tamaño en el coloide.

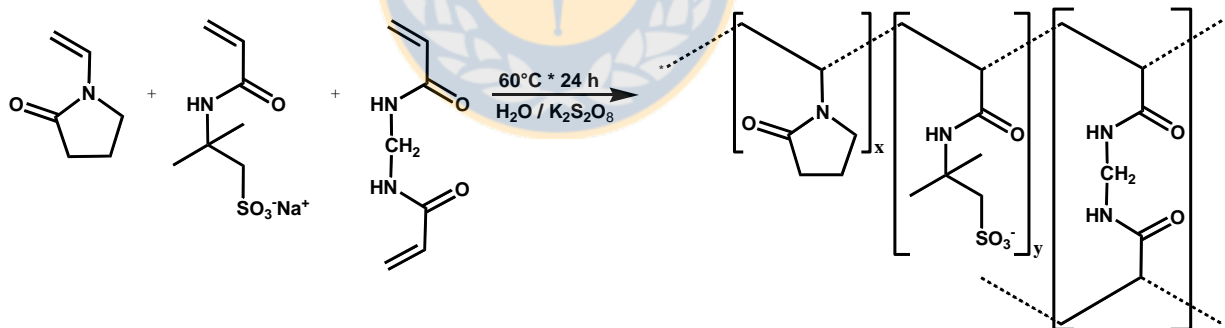
El rendimiento de la reacción se determinó mediante potenciometría con un electrodo ión selectivo de plata/sulfuro de plata (combinado). Además del coloide, se analizó una alícuota de la misma solución de  $\text{AgNO}_3$  utilizada en su síntesis, la cual fue guardada previo al inicio de la reacción. Para iniciar, se mezcló en un beaker 0.2 mL de nitrato de sodio 5 M (como ajustador de la fuerza iónica) y 10 mL del coloide respectivo manteniendo la mezcla en agitación suave y luego de introducir el electrodo en el beaker, se registró la diferencia de potencial del sistema en milivoltios. También se aplicó el mismo procedimiento anterior a la solución de  $\text{AgNO}_3$  usada como reactivo en la síntesis del coloide. Posteriormente, se calculó la concentración de plata iónica en el coloide ( $C_{\text{coloide}}$ ) y en la solución de  $\text{AgNO}_3$  ( $C_{\text{AgNO}_3}$ ), introduciendo los respectivos valores de potencial eléctrico obtenidos, en la ecuación de la curva de calibración elaborada previamente con soluciones de plata de concentración conocida (diluciones seriales de solución stock de plata MERCK de 1000 ppm en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5M). Finalmente, después de corregir la concentración de la solución de  $\text{AgNO}_3$  con el respectivo factor de dilución, se calculó el rendimiento de reacción por medio de la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{C_{\text{AgNO}_3} - C_{\text{coloide}}}{C_{\text{AgNO}_3}} \times 100 \quad (1)$$

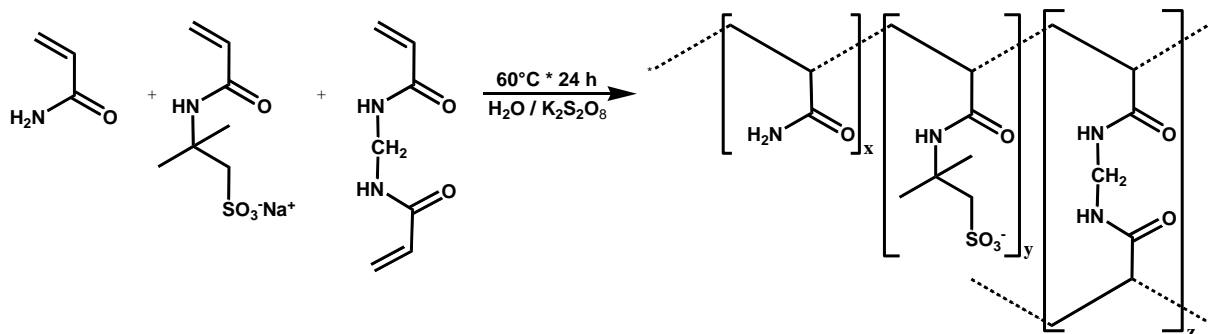
## 2.3 Síntesis de copolímeros y preparación de compositos

### 2.3.1 Síntesis de copolímeros entrecruzados (hidrogeles)

Los copolímeros entrecruzados fueron sintetizados en medio acuoso (agua UP) utilizando los siguientes pares de monómeros en proporción molar [1:1]: VP-AMPSNa y AAm-AMPSNa. La concentración total de comonómeros en la solución de reacción fue de 15% en peso (equivalente a 1 M) y por cada sistema copolimérico se utilizaron 3 y 6 mol% de MBA como entrecruzador. En todos los casos, la mezcla de reactivos (contenida en tubos de teflón de 40 mL) fue desoxigenada burbujando nitrógeno puro durante 10 minutos y luego, la reacción fue inducida térmicamente a 60 °C con 1 mol % KPS como iniciador radical libre (sin agitación). Después de 24 horas, los productos de reacción fueron extraídos de los tubos, cortados en forma de discos y sumergidos en agua ultrapura durante 2 días para eliminar los residuos solubles en agua; finalmente fueron secados a 60°C hasta peso constante en un horno con circulación de aire. El rendimiento de la síntesis de los hidrogeles fue determinado gravimétricamente. Todas las muestras de hidrogel fueron almacenadas en recipientes herméticos.



**Figura 2.2.** Esquema de la reacción de polimerización para la obtención de poli[VP-co-AMPSNa].



**Figura 2.3.** Esquema de la reacción de polimerización para la obtención de poli[AAm-co-AMPSNa].

### 2.3.2 Síntesis de copolímeros lineales

Se siguió la misma metodología aplicada para los copolímeros entrecruzados, pero no se utilizó entrecruzador y se redujo la concentración total de monómeros a 0.175 M (2.5% en peso). Los copolímeros lineales obtenidos, fueron purificados mediante diálisis (con una membrana de 3.5 KDa) y secados en un liofilizador.

### 2.3.3 Preparación de los compositos

A partir de cada hidrogel sintetizado según el método 2.3.1 (cuatro en total), se tomaron tres fracciones de 3 gramos completamente secas. La primera y segunda fracciones se sumergieron por separado (a 25°C) en 500 mL del “coloide N°1” y “coloide N°2”, respectivamente. Después de 24 horas fueron retirados del coloide y secados a 60°C en un horno con circulación de aire, no sin antes medir el volumen resultante del coloide en cada recipiente. Las dos primeras fracciones procesadas (cargadas con NPsAg) y la tercera fracción intacta (libre de NPsAg), se molieron y tamizaron hasta obtener, por cada muestra, 1 gramo de partículas con tamaños entre 100 y 250  $\mu\text{m}$ . Este rango de tamaño de partícula fue el utilizado en todas las técnicas de caracterización del material, con excepción de los análisis SEM-EDS. Todas las muestras se mantuvieron en recipientes sellados para su posterior caracterización.

## 2.4 Caracterización de copolímeros y compositos

### 2.4.1 Caracterización espectroscópica

Los polímeros entrecruzados (hidrogeles) y sus compositos fueron analizados mediante la técnica de resonancia magnética nuclear de protón con “giro al ángulo mágico” de alta resolución ( $^1\text{H}$ -HRMAS-NMR, en inglés) con un espectrómetro Avance TM 400 (Bruker) dotado de un imán superconductor de boca ancha (89 mm) que opera a 9.4 Teslas. En lo sucesivo, en el presente documento la técnica  $^1\text{H}$ -HRMAS-NMR será identificada como  $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido. Veinte miligramos (20 mg) de cada muestra fueron impregnados con aproximadamente 100  $\mu\text{l}$  de agua deuterada e introducidas en un rotor de zirconio de 4 mm de diámetro. Todos los espectros fueron obtenidos a temperatura ambiente, usando una sonda de polarización cruzada al ángulo mágico (CP-MAS) para muestras sólidas, un pulso de  $90^\circ$  por 3.5  $\mu\text{s}$  y una velocidad de giro de 5 kHz. La amplitud espectral fue de 5 kHz, puntos de datos de 16K y 16 scans con velocidad de repetición de 5 s. Los desplazamientos químicos se referenciaron respecto al agua deuterada (4.86 ppm).

Los copolímeros lineales se disolvieron en  $\text{D}_2\text{O}$  a una concentración de 10 mg  $\text{mL}^{-1}$  y sus espectros de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) fueron obtenidos en un equipo Mercury 400-BB trabajando a una frecuencia de 400 MHz. Con el análisis de los espectros se estimó la composición de cada monómero en el copolímero.

Se realizó el seguimiento de la copolimerización mediante  $^1\text{H}$ -RMN *in situ* para cada uno de los dos sistemas copoliméricos en estudio (AAM:AMPSNa y VP:AMPSNa); para ello se prepararon dos reacciones con distintas composiciones monoméricas de partida y utilizando agua deuterada como disolvente. Las composiciones de partida escogidas para el sistema AAM:AMPSNa, fueron 30:70 y 70:30; y las escogidas para el sistema VP:AMPSNa fueron, 30:70 y 50:50. La concentración total de monómeros fue de 0.175 M (2.5% en peso) y se utilizó KPS al 1 mol% como iniciador. Cada reacción se realizó dentro de un tubo de resonancia previamente desoxigenado con nitrógeno y ubicando en su interior un tubo capilar con diclorobenceno en dimetilsulfóxido deuterado que se consideró como señal de referencia. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN fueron obtenidos a  $60^\circ\text{C}$  en un espectrómetro Varian Inova 400



programado con los siguientes parámetros: secuencia de pulsos de 2.8  $\mu\text{s}$ , lo que equivale a un pulso de 90°; obtención de un espectro (punto experimental) cada 120 segundos y velocidad de giro de 7 Hz. Los espectros obtenidos fueron normalizados e integrados usando el programa MestReNova (Versión 6.0.2) con el fin de obtener las concentraciones instantáneas de monómeros en la alimentación, que a su vez fueron procesadas por un modelo matemático (Ecuación del Modelo Terminal de Copolimerización en su forma integrada) que permitió calcular las relaciones de reactividad de los comonómeros [77].

Los espectros infrarrojo de los copolímeros entrecruzados y los compositos, se obtuvieron con un espectrómetro Spectrum One (PerkinElmer) mediante la técnica de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Los espectros se registraron con 32 barridos y una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **2.4.2 Microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de energía dispersiva**

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los compositos fueron obtenidas con un microscopio Hitachi Modelo SU-8000 funcionando en alto vacío. Las muestras secas no fueron recubiertas con materiales conductivos y se analizaron a bajo voltaje (1.0 kV). Los espectros de energía dispersiva de rayos X (EDS) se obtuvieron con un espectrómetro Bruker modelo Quantax 200 acoplado al microscopio electrónico de barrido. Mediante fractura por impacto se realizaron cortes de sección en partículas con tamaños entre 0.3-0.5 mm. Tamaños menores dificultaron la diferenciación entre el área del corte transversal y la superficie externa por parte del analista.

#### **2.4.3 Caracterización termogravimétrica (TGA)**

Las medidas termogravimétricas (TGA) se realizaron en una termobalanza TA-Q500 de TA Instruments. Los experimentos se realizaron bajo un flujo de nitrógeno de 50  $\text{mL min}^{-1}$  y a una velocidad de calentamiento de 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , desde 40 a 550  $^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4.4 Cuantificación de plata total liberada por los compositos hidrogel-NPsAg

Diez miligramos (10 mg) de cada uno de los compositos preparados (secos) se sumergieron independientemente, en 20 mL de agua UP (recipientes sellados) a 25°C y con agitación constante. Después de 96 horas, el material insoluble fue separado del medio acuoso por filtración con malla de nylon de 80  $\mu\text{m}$  (poro); los filtrados se sometieron a digestión ácida con 5 mL de ácido nítrico concentrado (65% p/p) y calentamiento suave, hasta alcanzar un volumen final 10 mL. También se preparó una serie de soluciones patrón de plata iónica aplicando las mismas condiciones de digestión ácida anteriores. Por último, todas las muestras fueron diluidas con agua UP hasta un volumen final de 50 mL y analizadas mediante espectroscopía de absorción atómica (EAA) para determinar las concentraciones de plata en cada una de ellas. Se utilizó una lámpara de cátodo hueco de plata, una longitud de onda para absorción directa de 328.1 nm y una mezcla de aire-acetileno para la llama.

#### 2.4.5 Ensayos de absorción de líquidos: agua y PBS

La cantidad de líquido (agua o PBS) absorbido por los hidrogeles y compositos (muestras) se midió gravimétricamente mediante el método conocido en la literatura como “tea bag”. El procedimiento consistió en depositar aproximadamente 0.03 g de muestra seca en una pequeña bolsa fabricada con un filtro de nylon (80  $\mu\text{m}$  de poro y 47 mm de diámetro), y posteriormente sumergirla en el líquido por un tiempo determinado. Finalizado el tiempo de inmersión, la bolsa se transfirió a un tubo de centrifuga (manteniéndola separada del fondo del tubo), se centrifugó durante 3 minutos a 1400 rpm (en una centrifuga Rotofix 32A Hettich) y luego se pesó en una balanza analítica. Para tener en cuenta la capacidad de absorción de la bolsa misma se determinó un valor en blanco, es decir, el peso de la bolsa sin muestra. Las mediciones se realizaron por triplicado. El procedimiento anterior se realizó 10 veces en forma consecutiva durante 18 horas para una misma muestra. Los tiempos de inmersión iniciales se fijaron cada 5 minutos y luego fueron aumentados en forma progresiva. La capacidad de absorción de agua (CAA) de las muestras fue evaluada a  $20\pm 2$  °C y con valores de conductividad y pH para el agua de  $0.055 \mu\text{S cm}^{-1}$  y 6.3, respectivamente. Por otro lado, la capacidad de absorción de PBS (CAPBS) de las muestras fue evaluada a 37 °C y con valores de conductividad y pH para el PBS de  $15700 \mu\text{S cm}^{-1}$  y 7.4, respectivamente.

El cálculo de la capacidad de absorción de líquidos (agua y PBS) para los hidrogeles y compositos se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$CAA[g/g] = CAPBS[g/g] = \frac{(B_{IM} - B_I - M)}{M} \quad (2)$$

donde  $B_{IM}$  es el peso en gramos de la “bolsa con muestra después de la inmersión”,  $B_I$  el peso en gramos de la “bolsa sin muestra después de la inmersión” (valor del blanco) y  $M$  los gramos de muestra seca antes de la primera inmersión [78].

## 2.5 Material biológico y bioensayos

### 2.5.1 Cultivos celulares

Los cultivos primarios de fibroblastos embrionarios humanos fueron suministrados por el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España). Las células fueron mantenidas a 37 °C con una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> en frascos de cultivo de 25 mL (Sarstedt). El medio de cultivo usado (medio completo) fue medio mínimo esencial de Eagle (MEM) modificado con 15 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES; Sigma) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco), 200 mM de L-glutamina, 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina, y 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomycin (Sigma). Las células fueron subcultivadas con medio completo fresco cada 7 días desde la siembra, en una proporción de 1 a 3.

### 2.5.2 Ensayos de Actividad Antibacteriana

#### *Método de pozos en agar modificado*

Una versión modificada del método de pozos en agar [79] fue utilizada para evaluar la actividad antibacteriana de los 8 compositos, sus respectivos 4 hidrogeles de procedencia (sin nanoplata) y soluciones acuosas de nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) con concentraciones de plata iónica de 108 ppm y 5720 ppm, utilizadas como control positivo.

Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P). Cien microlitros (100  $\mu\text{L}$ ) de la respectiva suspensión bacteriana en caldo tripticasa de soya (TSB), preparadas con densidades celulares de:  $4.5 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  para *E. Coli* y  $1.8 \times 10^7$  para *S. aureus*, fueron esparcidos uniformemente sobre placas de agar tripticasa de soya (TSA).

Con la ayuda de un sacabocados estéril de 9 mm de diámetro se hicieron 4 pozos sobre la superficie de agar, ubicándolos de manera equidistante y a 20 mm del borde de la placa de agar. 2.5 mg de cada muestra sólida (seca) y 100  $\mu\text{L}$  de cada solución de  $\text{AgNO}_3$ , fueron ubicados en sendos pozos sobre la placa de agar; luego se adicionó 150  $\mu\text{L}$  de agua milli-Q a los pozos que contenían las muestras sólidas.

Se mantuvo la placa a  $4^\circ\text{C}$  por 1.5 horas para permitir la difusión de la plata presente en las muestras; posteriormente, se incubaron las placas a  $37^\circ\text{C}$  durante 18 horas. Por último, se calcularon las zonas de inhibición restando los diámetros del pozo (9 mm) y su respectiva área circular externa (generada por la difusión de los componentes de las muestras). Placas de agar con y sin inóculo también fueron incluidas como control. Las muestras fueron evaluadas por triplicado y se realizaron análisis de varianza (ANOVA) a una vía para comparar las zonas de inhibición (ZIs) medias generadas por las mismas. Para determinar la diferencia entre las ZIs medias de los distintos tratamientos, se utilizó la prueba de Fischer (o LSD) con una significancia estadística de 0.05.

#### ***Método de recuento estándar en placa***

El siguiente procedimiento basado en el método AATCC 100 [80], fue utilizado para evaluar la actividad antibacteriana sobre *E. coli* y *S. aureus* de los 8 compositos hidrogel-nanoplata, sus respectivos 4 hidrogeles de procedencia (sin nanoplata) y dos soluciones acuosas de  $\text{AgNO}_3$  con concentraciones de  $\text{Ag}^+$  de 108 ppm y 5720 ppm (control positivo). Para cada bacteria evaluada, se separaron inicialmente dos porciones de 10 mg por cada muestra sólida y dos alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  por cada solución de  $\text{AgNO}_3$ , ubicándolas en sendos tubos de ensayo esterilizados (tubos falcon de 15 mL); luego se adicionó a cada muestra contenida en los tubos, 1 mL de suspensión bacteriana en caldo TSB (inóculo) con un número de células viables de  $5 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  en el caso de *E. Coli* y  $2 \times 10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  en el caso de *S. aureus*. La primera porción o alícuota de muestra, fue mantenida a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas y la segunda

porción, a la misma temperatura durante 48 horas, para determinar el efecto del tiempo de contacto sobre el crecimiento bacteriano. Al cumplirse los dos tiempos de contactos preestablecidos, las muestras fueron diluidas en proporción 1:10, adicionando 9 mL de solución salina isotónica; después de agitar suavemente por algunos segundos, se tomaron 100 microlitros de la dilución 1:10 para realizar una dilución seriada en base 10 utilizando el mismo diluyente, obteniéndose 7 diluciones adicionales: desde la dilución 1:10<sup>2</sup> hasta la 1:10<sup>8</sup>. 20 microlitros de cada una de las ocho diluciones obtenidas fueron ubicadas sobre una placa de agar TSA, en forma de gotas equidistantes y manteniéndolas en una incubadora a 37°C durante 48 horas. Posteriormente, se seleccionó en la placa de agar, la zona correspondiente a la dilución que presentó entre 30 y 300 colonias, y mayor facilidad para contarlas individualmente; luego se contabilizó el número de UFC de dicha zona y el valor resultante se multiplicó por el factor de dilución respectivo, para expresarlo en UFC mL<sup>-1</sup>. Se calculó el valor promedio de las UFC mL<sup>-1</sup> de tres mediciones independientes.

### 2.5.3 Ensayo de citotoxicidad

Se evaluó el potencial efecto citotóxico de los compositos y sus hidrogeles de procedencia en cultivos de fibroblastos embrionarios humanos, mediante un ensayo de MTT indirecto, el cual se realizó por triplicado para cada muestra. Inicialmente se adicionaron 5 mg de cada muestra sólida (compositos e hidrogeles) y un disco de TMX (Poliestireno Thermanox®, Labclinics) usado como control negativo, en sendos tubos conteniendo 5 mL de medio completo libre de FBS y se mantuvieron en agitación durante 1 día a 37 °C; seguidamente se retiró el medio en contacto con las muestras o “eluyente” y se guardó a -20°C hasta su posterior utilización. También se obtuvieron los eluyentes de muestras sumergidas en medio completo sin FBS durante 2 y 14 días.

Posteriormente, se tomaron placas de cultivo con 96 pozos y se adicionaron en cada pozo 100 µL del cultivo de fibroblastos a una densidad de 8×10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>. Después de incubar durante 24 horas las placas de cultivo a 37 °C y con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, se reemplazó el medio de cultivo de cada pozo por 100 µL de los respectivos eluyentes previamente obtenidos (ocho tratamientos) y por 100 µL de una disolución 20 mM de peróxido de hidrógeno en MEM, utilizada como control positivo.

Transcurridas otras 24 h de incubación en las mismas condiciones anteriores, se sustituyeron los eluyentes y el medio del control positivo, por 100  $\mu\text{L}$  de una disolución 0.5  $\text{mg mL}^{-1}$  de MTT en PBS y nuevamente se mantuvieron las células a 37  $^{\circ}\text{C}$ , durante 4 horas adicionales.

Tras este tiempo se retiró la disolución de MTT y se añadió 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pozo con el fin de disolver los cristales azules formados. Las placas se agitaron durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Biotek ELX808IU. Los valores de absorbancia registrados fueron reemplazados en la siguiente ecuación, para calcular los porcentajes de viabilidad celular de cada replica respecto al control negativo TMX:

$$\%VC = \frac{DO_M}{DO_C} \times 100 \quad (3)$$

donde,  $DO_M$  y  $DO_C$  son las medidas de densidad óptica de la muestra y el control negativo, respectivamente. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) a una vía para comparar los porcentajes de viabilidad medios generados por los compositos, hidrogeles y control negativo.

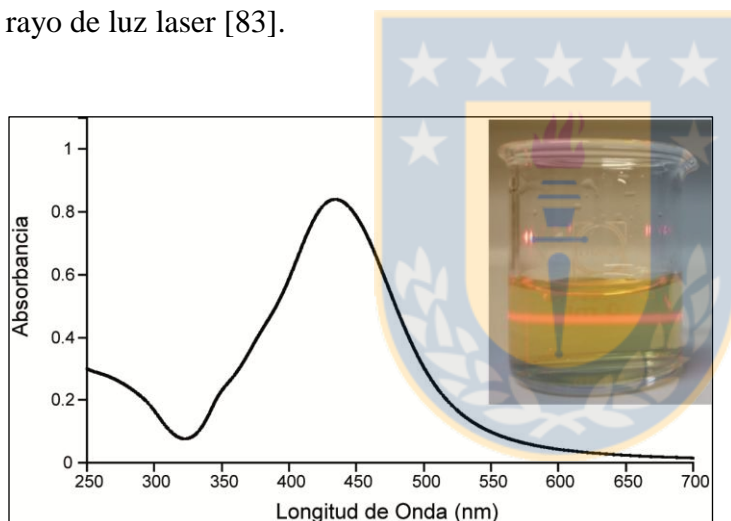
Para determinar la diferencia entre los porcentajes de viabilidad promedio de los distintos tratamientos, se utilizó la prueba LSD. En todos los análisis se tuvo en cuenta una significancia estadística de 0.05.

En forma simultánea se aplicó el mismo procedimiento descrito anteriormente, a once disoluciones de plata iónica en MEM, preparadas por dilución seriada en base dos a partir de una concentración de 572 ppm, las cuales se utilizaron como un segundo control positivo.

## Capítulo 3: Resultados y Discusión

### 3.1 Nanopartículas de plata

Los coloides obtenidos presentaron el color amarillo traslúcido y brillante característico de los coloides de plata y el cual se debe a la “resonancia del plasmón de superficie” (SPR, en inglés) generada por las nanopartículas de plata presentes; este fenómeno se confirmó por la aparición de un pico pronunciado a 434 nm en el espectro de absorción de luz UV-visible del coloide (ver Figura 3.1), correspondiente a la banda SPR de la plata coloidal [81]. La “resonancia del plasmón de superficie” se define como la oscilación de la densidad de carga que puede existir en una interfase metal/dieléctrico [82]. Además, se confirmó la formación de una dispersión coloidal, ya que el líquido obtenido experimentó el efecto Tyndall cuando se irradió con un rayo de luz laser [83].



**Figura 3.1.** Espectro UV-visible del coloide N°2 (izquierda) y efecto Tyndall que confirma la obtención de una dispersión coloidal de nanopartículas de plata (derecha).

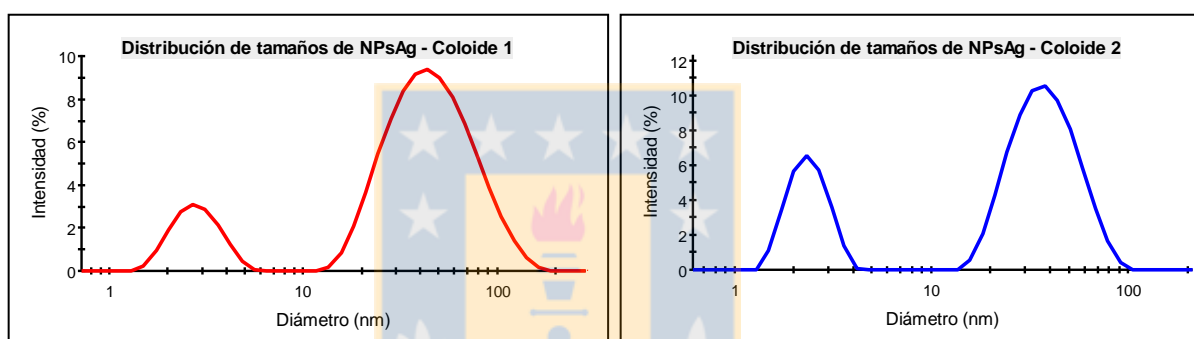
El potencial Z fue negativo e inferior a -45 mV para ambos coloides, indicando una alta estabilidad de las nanopartículas y tendencia a mantener su tamaño nanométrico inicial sin formar agregados [84]. Los valores de potencial Z obtenidos fueron los siguientes:  $-47.2 \pm 1.31$  mV para el coloide N°1 y  $-48.4 \pm 0.954$  mV para el coloide N°2.

La carga eléctrica negativa próxima a la superficie de las NPsAg, se origina posiblemente por la presencia de iones citrato que rodean la superficie de la partícula y cumplen la función de agente estabilizante de las nanopartículas [85]. A partir del pH de 6.5 observado para ambos



coloides y las constantes de disociación del ácido cítrico ( $pK_{a1} = 3.13$ ,  $pK_{a2} = 4.76$ ,  $pK_{a3} = 6.40$ ) registradas en la literatura, se dedujo la coexistencia de un 44% de especies de citrato divalente ( $HA^{2-}$ ) y un 56% de las trivalentes ( $A^{3-}$ ) [86].

Los resultados de “dispersión de luz dinámica” (Dynamic Light Scattering, DLS) obtenidos con el equipo NanoZetasizer mostraron las distribuciones de tamaño de partícula de los coloides N°1 y N°2, expresadas en función de la intensidad de luz láser dispersada. Estas distribuciones presentaron formas bimodales y fueron significativamente amplias (ver Figura 3.2), lo que es congruente con los índices de polidispersidad superiores a 0.5 [84] registrados (0.596 para el coloide N°1 y 0.562 para el coloide N°2).



**Figura 3.2.** Distribución de tamaños respecto a la Intensidad de luz dispersada (DLS) de las NPsAg del coloide N°1 (izquierda) y el coloide N°2 (derecha).

Tales distribuciones bimodales sugieren la existencia de dos poblaciones de partículas con tamaños muy diferentes en cada uno de los coloides [87]. A pesar del error en que se pueda incurrir, algunos investigadores aconsejan reportar la distribución bimodal completa, especificando el diámetro medio de cada población y el diámetro medio total con sus respectivas desviaciones estándar, sin importar que en algunos casos la desviación estándar sea mayor que la media. La recomendación se fundamenta desde una perspectiva biológica, ya que omitir cualquier fracción de partículas en estudios como los de toxicidad, puede ser crítico para una interpretación adecuada de los datos [87]. Es por esto que en la Tabla 1 se registran los parámetros estadísticos anteriores de ambas poblaciones y del total de partículas que conforman cada coloide obtenido (N°1 y N°2).



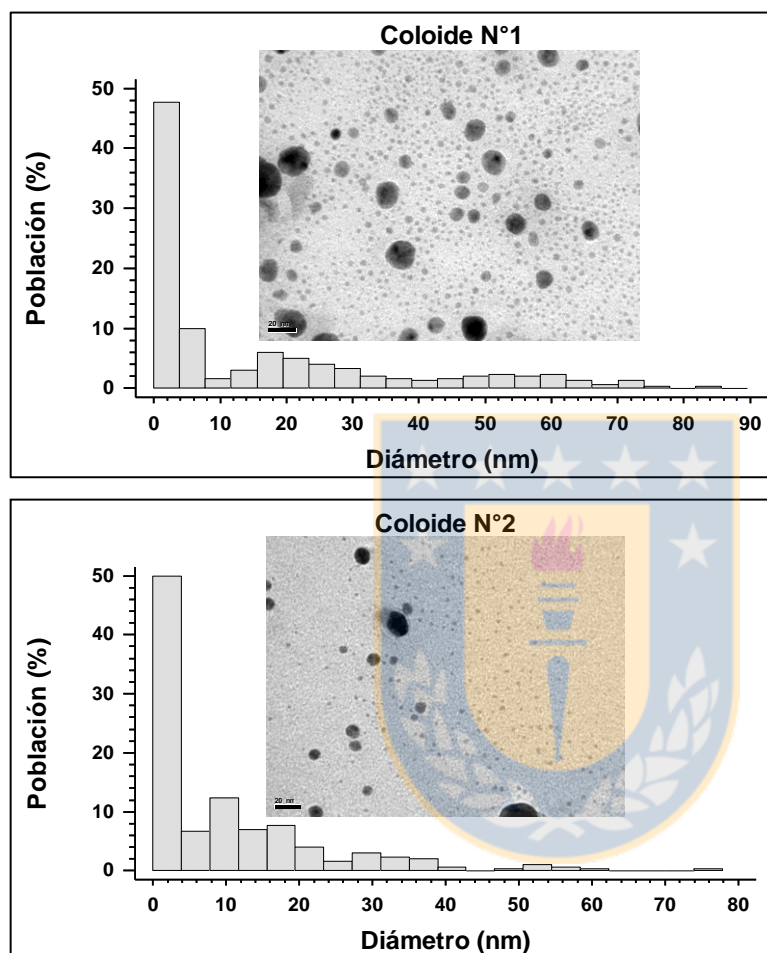
**Tabla 1.** Diámetros promedio ( $\phi$ ) y porcentajes (%) de las diferentes poblaciones de partícula que conforman cada coloide obtenido. N.A: No aplica.

Muestra	Técnica	Población 1			Población 2			Población total			
		Rango	$\phi$ (nm)	%	Rango	$\phi$ (nm)	%	$\phi < 10$ (%)	$10 < \phi < 25$ (%)	$\phi > 25$ (%)	$\phi$ (nm)
Coloide N°1	TEM	1.2-7.4	3±1.0	58	8.7-82.7	35±19	42	59	16	25	16±20
	DLS	1.5-5.6	3.1±0.4	N.A	14-164	50.7±0.8	N.A	N.A	-----	N.A	23.1±0.3
Coloide N°2	TEM	1.3-6.4	2.7±0.8	53	6.5-75.9	20±13	47	61.7	26.7	11.6	11±12
	DLS	1.3-4.2	2.5±0.1	N.A	11.7-106	39.7±0.1	N.A	N.A	-----	N.A	13.5±0.1

En ambos coloides analizados con la técnica DLS, el diámetro medio de partícula de la población N°1 es aproximadamente 16 veces menor que el de la población N°2; destacándose una ligera disminución del diámetro y amplitud de distribución de las poblaciones del coloide N°2 respecto a las del coloide N°1. Las dos poblaciones de NPsAg en cada coloide, también fueron observadas mediante la técnica de TEM y los resultados tienen la misma tendencia que los obtenidos por DLS: la amplitud de la distribución de tamaños y el diámetro medio total de las partículas presentes en el coloide N°1, son considerablemente mayores que las registradas para el coloide N°2 (ver Figura 3.3 y Tabla 1); además se pudo establecer que la mayoría de las NPs poseen forma esférica.

Aunque ambas técnicas coinciden en la bimodalidad de la distribución, es necesario resaltar que la técnica DLS tiene un poder de discriminación de tamaños de partícula de 1:3 en muestras multimodales [88] y como consecuencia de lo anterior, los valores de diámetro promedio de cada población obtenidos por DLS, variaron respecto a los obtenidos con la técnica TEM. El bajo poder de discriminación de tamaños de la técnica DLS se relaciona con el hecho que una partícula grande muestra una intensidad de luz dispersada más alta si se le compara con una pequeña, puesto que la Intensidad es proporcional a la sexta potencia del radio de la partícula ( $I \propto r^6$ ). Lo anterior explica los resultados similares entre las técnicas DLS y TEM para el diámetro medio de la población N°1 (partículas pequeñas) y la gran diferencia existente para el diámetro medio de la población N°2 (partículas grandes), donde los valores obtenidos con DLS superan casi por el doble a los obtenidos por TEM. También es necesario resaltar en la Figura 3.2, que las intensidades de luz dispersada (% Intensidad) no representan el número de NPs con el diámetro indicado, ya que en una muestra bimodal como la obtenida,

un número bajo de partículas grandes pueden generar una señal de mayor intensidad que la generada por un número alto de partículas pequeñas [89]. Este inconveniente se supera con la observación directa de las NPs mediante la técnica de TEM, la cual permite contarlas y medir su diámetro sin ninguna ambigüedad.



**Figura 3.3.** Distribución de tamaño de NPsAg en el coloide N°1 (arriba) y coloide N°2 (abajo) analizado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (300 partículas medidas). Medias:  $16\pm 20$  y  $11\pm 12$  nm, respectivamente. Dimensión de la barra en las micrografías: 20 nm.

Incluso con estas diferencias entre técnicas, se sigue observando que en cada coloide, el diámetro medio de partícula de la población N°1 es menor que el de la población N°2, y otro resultado igual de interesante, es que la amplitud de la distribución de tamaños y el diámetro

medio total de las partículas presentes en el coloide N°1, son considerablemente mayores que las registradas para el coloide N°2.

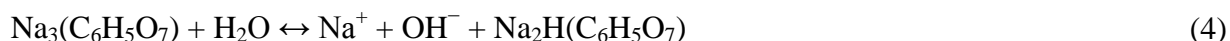
La presencia de las dos poblaciones de NPs en cada coloide se debe a que los cationes plata, antes de ser reducidos por el formaldehído, se encuentran agrupados como dos especies químicas diferentes en la solución inicial de reacción, en virtud de la relación equimolar con los aniones citrato; la primera especie y la más abundante, es el “citrato de plata coloidal”, mientras que la segunda se conoce como “complejos de plata”, donde los iones plata están coordinados con aniones citrato [90, 91]. El “citrato de plata coloidal” favorece la formación de NPs de plata con diámetro medio bajo y distribución de tamaños estrecha, mientras que los “complejos de plata” fomentan la formación de NPs con diámetro medio alto y distribución de tamaños amplia, vía reducción con formaldehído [92].

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, el aumento del diámetro medio y la amplitud de la distribución de tamaños del coloide N°1 en comparación con el coloide N°2, se debe a la mayor concentración de especies iónicas presentes en el coloide N°1, lo que significa una fuerza iónica mayor que tiene un efecto ligeramente desestabilizante de las dobles capas eléctricas que rodean las nanopartículas (y que las mantienen separadas) y por ende, éstas coalescen y forman otras de mayor tamaño.

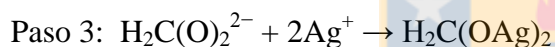
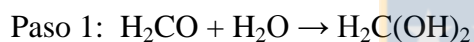
Es importante resaltar que más del 50% del total de NPs presentes en el coloide tienen diámetros menores de 10 nm (ver Tabla 1, resultados de TEM) y por lo tanto cumplen con los requerimientos de tamaño para presentar actividad antibacteriana según Morones y colaboradores [3].

A pesar de la extensa revisión bibliográfica realizada en busca de un posible mecanismo de reacción que explique la síntesis de plata metálica ( $\text{Ag}^0$ ) a partir de  $\text{AgNO}_3$ , formaldehído y citrato, no se encontraron estudios al respecto. Sin embargo, con base en el estudio de Benet y colaboradores [93], donde proponen uno de los escasos mecanismos de reacción existentes de la prueba de Tollens (ensayo analítico específico para aldehídos), se puede dar un indicio del mecanismo molecular implicado en la síntesis de  $\text{Ag}^0$  realizada en el presente trabajo. La deducción de este mecanismo a partir del propuesto por Benet, se basa en que ambas

reacciones producen  $\text{Ag}^0$  a partir de reactantes similares, tales como: complejo de  $\text{Ag}^+$ , aldehído e iones hidroxilos en medio acuoso. Es preciso recordar que las moléculas de amoníaco son ligandos del complejo de plata en la prueba de Tollens, mientras que las moléculas de citrato lo son en la reacción del presente estudio [90, 91], en el que además no hay presencia de amoníaco. Por otro lado, la sal citrato de sodio, que proviene de la reacción entre un ácido débil (ácido cítrico) y una base fuerte (hidróxido de sodio), genera iones hidroxilos libres ya que experimenta hidrólisis en medio acuoso [94]. Esto se indica en la siguiente ecuación:



Considerando lo previamente expuesto, se propuso el siguiente mecanismo de reacción:



La explicación de este mecanismo es la siguiente: la adición nucleofílica de agua al carbono  $\text{C}=\text{O}$  del formaldehído genera un *gem* diol con geometría tetraédrica [95] (paso 1), el cual es atacado por dos hidroxilos libres produciendo un ión alcóxido y dos moléculas de agua (paso 2). Cada grupo alcóxido coordina un catión  $\text{Ag}^+$ , el cual a su vez, se encuentra hidratado o coordinado con aniones citrato, generando la especie  $\text{H}_2\text{C}(\text{OAg})_2$  (paso3). Un tercer anión hidroxilo remueve el protón de un enlace  $\text{C}-\text{H}$  de la especie  $\text{H}_2\text{C}(\text{OAg})_2$ , promoviendo en el interior de esta última, la transferencia de los dos electrones del enlace a sendos átomos de oxígeno, y simultáneamente, cada átomo de oxígeno cede uno de sus electrones para reducir el ión  $\text{Ag}^+$  adyacente. Como resultado se obtiene el anión formiato y dos átomos de plata eléctricamente neutros (paso 4). También es probable que la ruptura homolítica de los dos enlaces  $\text{O}-\text{Ag}$  ocurra en dos pasos separados, generando sendos intermediarios radicales, en lugar de ocurrir en un solo paso junto con la remoción del protón del enlace  $\text{C}-\text{H}$  por parte del ión hidroxilo libre. El mecanismo propuesto previamente tiene un carácter ilustrativo y en estricto rigor, es necesario realizar un estudio de cinética química para corroborarlo.

El rendimiento de la conversión de iones plata a nanopartículas de plata, fue del 23% para el coloide N°1 y del 24% para el coloide N°2. Aunque estos rendimientos son relativamente bajos, las características de las NPsAg obtenidas fueron las más apropiadas para el propósito de esta investigación, entre una serie de previos procedimientos de síntesis explorados en nuestro laboratorio. La ecuación de la curva de calibración potenciométrica construida (con 4 disoluciones estándar de plata: 1, 10, 100 y 1000 ppm) para estimar la concentración de plata iónica en los coloides obtenidos, fue la siguiente:  $y = 56.2 \cdot \log_{10}[\text{Ag}^+] + 264.2$  ( $R^2=0.9902$ ), donde “y” es la diferencia de potencial del sistema en milivoltios y  $[\text{Ag}^+]$ , la concentración (ppm) de plata iónica en la muestra. Esta ecuación corresponde a la ecuación de Nerst del sistema estudiado.

### 3.2 Hidrogeles y copolímeros lineales

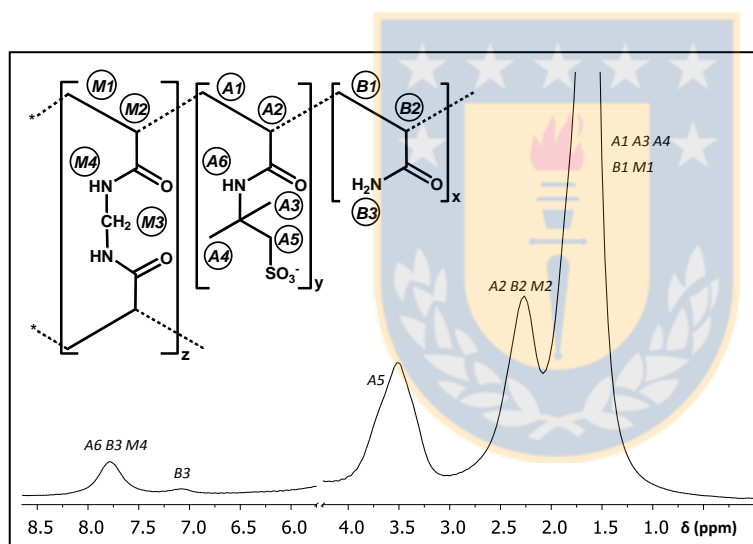
Los hidrogeles obtenidos fueron sólidos blandos, de apariencia transparente y tomaron la forma del recipiente de reacción (cilíndrica). Luego de ser cortados en forma de discos y sumergidos en agua ultrapura para eliminar los residuos de reacción, incrementaron drásticamente su volumen y también, su tendencia a fracturarse. Durante el secado de los hidrogeles en la estufa, éstos se fragmentaron parcialmente y redujeron su tamaño hasta convertirse en sólidos duros y compactos de color blanco. En la Tabla 2 se registran los rendimientos de reacción para los cuatro hidrogeles sintetizados (copolímeros entrecruzados) y los números asignados a cada uno para facilitar su identificación.

**Tabla 2.** Rendimientos de reacción obtenidos en la síntesis de los hidrogeles.

Hidrogel número	Composición en la alimentación	Rendimiento de reacción (%)
7	VP:AMPSNa[1:1] - 3 mol%MBA	45
11	VP:AMPSNa[1:1] - 6 mol%MBA	68
15	AAm:AMPSNa[1:1] - 3 mol%MBA	97
22	AAm:AMPSNa[1:1] - 6 mol%MBA	98

### 3.2.1 Elucidación estructural de los hidrogeles mediante $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido

La Figura 3.4 corresponde al espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido del hidrogel 15, en el que se pueden ver tres regiones de señales que confirman la polimerización de los monómeros AAm, AMPSNa y MBA. También se confirma la ausencia de monómeros residuales ya que no aparecen las señales vinílicas entre 5.5 y 6.5 ppm [96]. La Región 1 de señales, ubicada a campo alto entre 1.0 y 3.0 ppm, es generada por todos los protones de la cadena principal del polímero (señales A1, A2, B1, B2, M1) y por los metilos geminales del residuo monomérico del AMPSNa (A3, A4). La Región 2, localizada entre 3.0 y 4.2 ppm, se debe exclusivamente al metileno vecino del grupo sulfonato del AMPSNa polimerizado (señal A5). Finalmente, la Región 3 está localizada a campo bajo entre 7.0 y 8.0 ppm, y es generada por los grupos amida de los monómeros AAm, AMPSNa y MBA polimerizados (A6, B3, M4) [97].

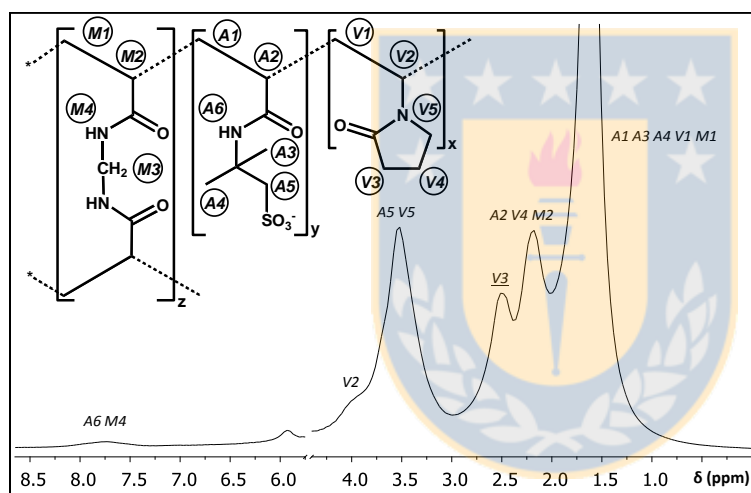


**Figura 3.4.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido del hidrogel 15.

En la Figura 3.5 se observa el espectro  $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido del hidrogel 7. La señal a 5.93 ppm probablemente corresponde a uno de los dos grupos de protones vinílicos del MBA, que no reaccionó durante la polimerización y quedó como un grupo lateral de la cadena principal del copolímero [98]. No se observan otras señales vinílicas entre 5.5 y 6.5 ppm, confirmando la ausencia de monómeros residuales. También se evidencian tres regiones de señales con los mismos rangos de desplazamiento químico (ppm) que el caso anterior y también fueron numeradas de la misma manera (Región 1, 2 y 3). La Región 1 tiene un variado origen, que incluye los protones de la cadena principal del polímero (señales A1, A2,

V1, M1) con excepción del grupo CH unido al anillo pirrolidona (señal V2), los metilenos más protegidos de dicho anillo (señales V3, V4) y los metilos geminales del residuo monomérico del AMPSNa (señales A3, A4). La Región 2 es generada por los grupos CH<sub>2</sub> y CH unidos al nitrógeno del anillo pirrolidona (V5, V2) y por el metileno vecino del grupo sulfonato del AMPSNa polimerizado (A5). Por último, la Región 3 es generada por la señal de los protones amídicos del AMPSNa y del MBA polimerizados (A6, M4) [99, 72, 97].

Los protones metilénicos designados como “M3” en la Figura 3.4 y 3.5, los cuales se localizan en las unidades -CONHCH<sub>2</sub>CONH- del MBA polimerizado, no pudieron ser asignados a su respectiva señal en el espectro (a 4.6 ppm) debido a la superposición entre esta señal y la generada por el solvente (D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, 4.4 to 5.4 ppm) cuya intensidad y amplitud son mayores. Adicionalmente, la señal del solvente fue borrada para mayor claridad.



**Figura 3.5.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en estado sólido del hidrogel 7.

Los espectros <sup>1</sup>H-RMN en estado sólido de los hidrogeles 22 y 11 fueron muy similares a los generados por los hidrogeles 15 y 7 respectivamente (mostrados en la Figura 3.4 y 3.5), lo cual está de acuerdo con lo esperado, ya que solo un 3 mol% de MBA a favor de los primeros es la única diferencia entre ellos. Además, el hidrogel 11 no generó la señal a 5.93 ppm observada en el espectro del hidrogel 7 (ver Figura 3.5).

Cabe destacar que es imposible determinar mediante <sup>1</sup>H-RMN en estado sólido la composición exacta de los tres monómeros en cada copolímero **entrecruzado** obtenido, ya que solo existen dos regiones de señales cuantificables (Región 1 y Región 2) y los cálculos requieren mínimo



de tres regiones (uno por cada monómero). La Región 3 (entre 6.5-8.5 ppm) no puede utilizarse en los cálculos porque pertenece a señales de protones intercambiables con el agua deuterada [100]; por lo tanto, las áreas integradas de dichas señales representan menos protones que los realmente existentes en la macromolécula.

### 3.2.2 Composición molar de los monómeros en los sistemas poliméricos

Con la intención de obtener la composición aproximada de cada monómero en los copolímeros entrecruzados, se sintetizaron sus respectivos copolímeros lineales sin entrecruzador (MBA) y luego se analizaron por medio de  $^1\text{H}$ -RMN en solución. Los copolímeros lineales poli[VP-*co*-AMPSNa] [1:1] y poli[AAm-*co*-AMPSNa] [1:1] obtenidos, fueron sólidos con aspecto de escamas finamente divididas, altamente solubles en agua y sus rendimientos de reacción fueron 81% y 74%, respectivamente.

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los copolímeros lineales disueltos en agua deuterada, fueron muy parecidos a los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido de sus correspondientes versiones entrecruzadas (hidrogeles), tanto en la forma de las señales como en sus desplazamientos químicos; por lo tanto, la identificación de las señales en los copolímeros lineales se realizó de igual forma que en los hidrogeles (ver Figuras 3.4 y 3.5). Aunque los hidrogeles se diferencian de los copolímeros lineales por la presencia de MBA, la similitud de sus espectros  $^1\text{H}$ -RMN se debe a: (i) la superposición de señales que ocurre entre el MBA y los demás comonómeros polimerizados, y (ii) la baja concentración de MBA respecto a los demás monómeros en los hidrogeles. Es importante destacar que las señales de los sistemas lineales presentaron mejor resolución y que los protones amídicos no fueron detectados, a diferencia de lo observado en los espectros de los hidrogeles respectivos. La ausencia de señales de protones amídicos en los espectros de ambos sistemas lineales, se debe al intercambio “total” de protones entre los grupos amida y el agua deuterada [100]; esto último ocurre en forma parcial en los hidrogeles, debido a que los puntos de entrecruzamiento facilitan la formación de enlaces de hidrógeno intracatenarios que disminuyen el intercambio protónico con el agua deuterada.

Al igual que en sus versiones entrecruzadas, los copolímeros lineales también presentaron las mismas regiones de señales (Región 1, 2 y 3). Con base en las asignaciones de los grupos de



protones de las Regiones 1 y 2 a la estructura molecular de cada copolímero (ver Tablas 3 y 4), se formularon ecuaciones para calcular la correspondiente composición monomérica en función del área de las señales de las regiones mencionadas. Las áreas de las Regiones 1 y 2 fueron normalizadas e integradas mediante el programa MestReNova (Versión 6.0.2). Los valores de las integrales fueron reemplazados en las respectivas ecuaciones de composición y los cálculos dieron como resultado las fracciones molares (acumuladas) de los monómeros en cada copolímero.

**Tabla 3.** Identificación de las señales del espectro  $^1\text{H-RMN}$  del copolímero poli[AAm-co-AMPSNa].

Regiones del espectro poli[AAm-co-AMPSNa]	Señales	Originada por	Tipo de protón	Número de protones
Región 1 (1-3 ppm)	A1, A2	AMPSNa	CH <sub>2</sub> y CH de la cadena principal	3
	A3, A4	AMPSNa	CH <sub>3</sub> geminales	6
	B1, B2	AAm	CH <sub>2</sub> y CH de la cadena principal	3
Región 2 (3-4.2 ppm)	A5	AMPSNa	CH <sub>2</sub> vecino del grupo sulfonato	2

**Tabla 4.** Identificación de las señales del espectro  $^1\text{H-RMN}$  del copolímero poli[VP-co-AMPSNa].

Regiones del espectro poli[VP-co-AMPSNa]	Señales	Originada por	Tipo de protón	Número de protones
Región 1 (1-3 ppm)	A1, A2	AMPSNa	CH <sub>2</sub> y CH de la cadena principal	3
	A3, A4	AMPSNa	CH <sub>3</sub> geminales	6
	V1	VP	CH <sub>2</sub> de la cadena principal	2
	V3, V4	VP	CH <sub>2</sub> más protegidos del anillo	4
Región 2 (3-4.2 ppm)	A5	AMPSNa	CH <sub>2</sub> vecino del grupo sulfonato	2
	V2, V5	VP	CH y CH <sub>2</sub> vecinos del anillo	3

Las ecuaciones de composición formuladas a partir del espectro del copolímero poli[VP-co-AMPSNa] son:

$$[VP] = \frac{V}{A + V} \quad (5)$$

$$[AMPS] = \frac{A}{A + V} \quad (6)$$

$$V = \frac{(I_{A1.A2.A3.A4.V1.V3.V4}) - 9A}{6} \quad (7)$$

$$A = \frac{(I_{A5.V2.V5}) - 3V}{2} \quad (8)$$

Donde, [VP] y [AMPSNa] son las fracciones molares de VP y AMPSNa en el copolímero, respectivamente; “V” es el valor de la integral de un protón procedente de todos los residuos de VP en el copolímero; “A” es el valor de la integral de un protón procedente de todos los residuos AMPSNa en el copolímero; “ $I_{A5.V2.V5}$ ” es el valor de la integral de la Región 2 (3-4.2 ppm) y “ $I_{A1.A2.A3.A4.V1.V3.V4}$ ” es el valor de la integral de la Región 1 (1-3 ppm).

Para el caso del copolímero poli[AAm-co-AMPSNa] se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$[AAm] = \frac{B}{A + B} \quad (9)$$

$$[AMPS] = \frac{A}{A + B} \quad (10)$$

$$B = \frac{(I_{A1.A2.A3.A4.B1.B2}) - 9A}{3} \quad (11)$$

$$A = \frac{(I_{A5})}{2} \quad (12)$$



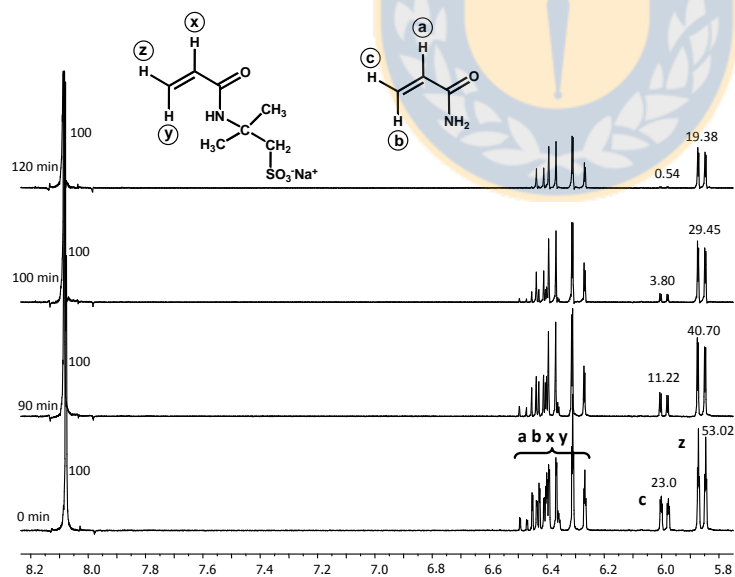
Donde, [AAm] y [AMPSNa] son las fracciones molares de AAm y AMPSNa en el copolímero, respectivamente; “B” es el valor de la integral de un (1) protón procedente de todos los residuos de AAm en el copolímero; “A” es el valor de la integral de un (1) protón procedente de todos los residuos AMPSNa en el copolímero; “ $I_{A5}$ ” es el valor de la integral de la Región 2 (3-4.2 ppm) del espectro y “ $I_{A1.A2.A3.A4.B1.B2}$ ” es el valor de la integral de la Región 1 (1-3 ppm).

Los resultados de los cálculos de composición para el copolímero poli[VP-co-AMPSNa], produjeron las siguientes fracciones molares de los monómeros VP y AMPSNa: 0.42 y 0.58,

respectivamente. Para el caso del copolímero poli[AAm-*co*-AMPSNa], las fracciones molares de AAm y AMPSNa fueron: 0.55 y 0.45, respectivamente.

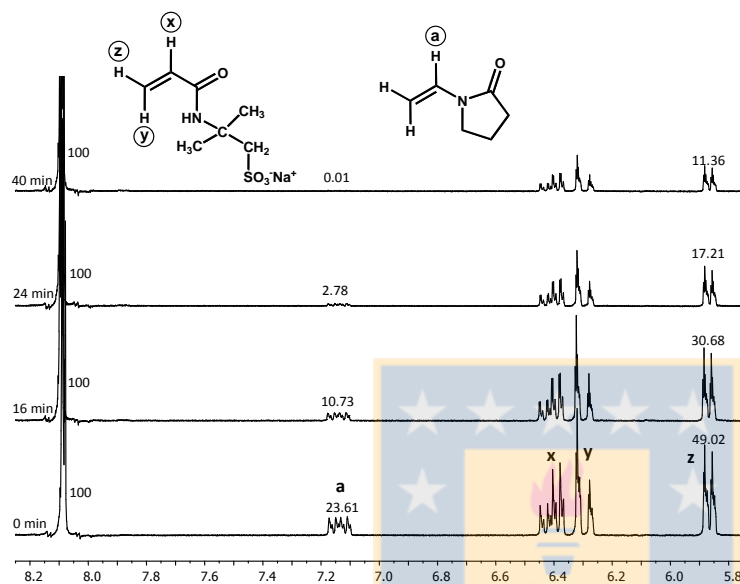
### 3.2.3 Reactividad de los comonómeros en los sistemas poliméricos

Como se mencionó en la sección 2.4.1 del presente documento, se llevó a cabo el seguimiento de las reacciones de copolimerización mediante  $^1\text{H-RMN}$  *in situ* cuantificando las concentraciones de monómeros a diferentes tiempos, con el objetivo de obtener las relaciones de reactividad de los comonómeros. Inicialmente se ensayó una concentración total de monómeros en la alimentación de 15% p/v, que corresponde a la concentración de nuestros sistemas entrecruzados (hidrogeles), pero no se pudieron cuantificar los comonómeros ya que la mezcla de reacción gelificó rápidamente (por un posible efecto de autoaceleración), impidiendo su análisis por la técnica  $^1\text{H-RMN}$ , la cual exige la solubilidad total de la muestra. Para solucionar este inconveniente, se prepararon las reacciones de copolimerización con 2.5% p/v de monómeros en la alimentación, lo cual garantizó la solubilidad de las mezclas de reacción en cada sistema copolimérico en estudio.



**Figura 3.6.** Región vinílica de algunos espectros de  $^1\text{H-RMN}$  representativos de la reacción de copolimerización a diferentes tiempos del sistema AAm: AMPSNa (30: 70).

A manera de ejemplo, en las Figuras 3.6 y 3.7 se muestran los espectros de los sistemas AAm:AMPSNa [30:70] y VP:AMPSNa [30:70] a diferentes tiempos de reacción, junto con la asignación de los protones empleados para la determinación de las concentraciones de los monómeros. También se observa la señal del diclorobenceno que se utilizó como referencia para el análisis cuantitativo (a 8.1 ppm aproximadamente).



**Figura 3.7.** Región vinílica de algunos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN representativos de la reacción de copolimerización a diferentes tiempos del sistema VP: AMPSNa (30: 70).

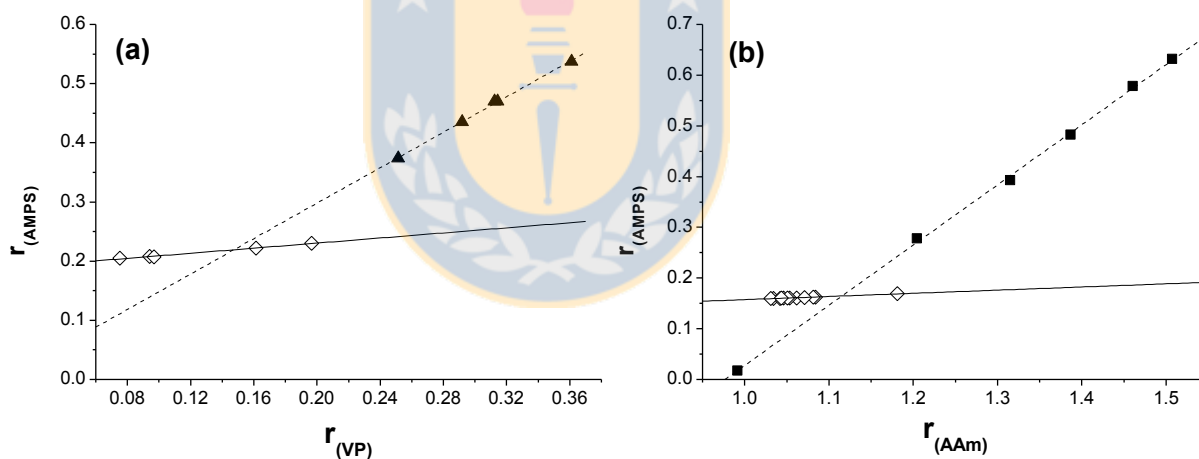
A las concentraciones de monómeros obtenidas ( $[M_1]$  y  $[M_2]$ ) se les aplicó un “ajuste no-lineal de mínimos cuadrados” usando la “Ecuación del Modelo Terminal de Copolimerización” en su forma integrada, la cual se muestra a continuación:

$$y = y_0 \left( \frac{x}{x_0} \right)^{\frac{b}{1-b}} \cdot \left[ \frac{1-b+(a-1)x}{1-b+(a-1)x_0} \right]^{\frac{ab-1}{(1-a)(1-b)}} \quad (13)$$

Siendo  $x = [M_1]/[M_2] = [\text{VP}]/[\text{AMPSNa}]$  ó  $[\text{AAm}]/[\text{AMPSNa}]$ ;  $y = [M_2] = [\text{AMPSNa}]$ ;  $a = r_1$  ( $r_{\text{VP}}$  ó  $r_{\text{AAm}}$ );  $b = r_2$  ( $r_{\text{AMPS}}$ ).

La aplicación de la Ecuación 13 tomando distintos valores de  $x_0$ - $y_0$ , es decir, considerando distintos puntos experimentales  $x_t$ - $y_t$  como puntos iniciales de la reacción del sistema objeto de

estudio, condujo a la obtención de distintos valores de  $r_1$  y  $r_2$  para cada uno de los ajustes. Los valores de  $r_1$  y  $r_2$  obtenidos para las distintas composiciones de partida (dos por cada sistema copolimérico), presentaron una tendencia lineal y cuando fueron graficados se obtuvo un punto de corte (ver Figura 3.8) que corresponde al valor óptimo de las relaciones de reactividad [77]. La intersección de las dos rectas en la Figura 3.8 (a) generó valores de  $r_{VP}=0.15$  y  $r_{AMPS}=0.22$  para el sistema poli[VP-co-AMPSNa]. La relaciones de reactividad de este sistema fueron previamente estudiadas por Kurenkov y Zhelonkina [71] pero con un 10% p/v de monómeros en la alimentación, y los valores de  $r_{VP}$  y  $r_{AMPS}$  ( $r_1$  y  $r_2$ ) reportados fueron de 0.15 y 0.35, respectivamente. En el caso del sistema poli[AAm-co-AMPSNa], la intersección de las dos rectas en la Figura 3.8 (b) generó valores de  $r_{AAm}=1.1$  y  $r_{AMPS}=0.16$ . Travas-Sejdic y Easteal [73] encontraron para éste sistema valores de  $r_{AAm} = 1.05$  ( $r_1$ ) y  $r_{AMPS} = 0.42$  ( $r_2$ ), pero en su experimento utilizaron una concentración total de monómeros en la alimentación de 0.85 M, la cual es aproximadamente 5 veces mayor que la utilizada en nuestro experimento (0.175 M = 2.5% p/v).

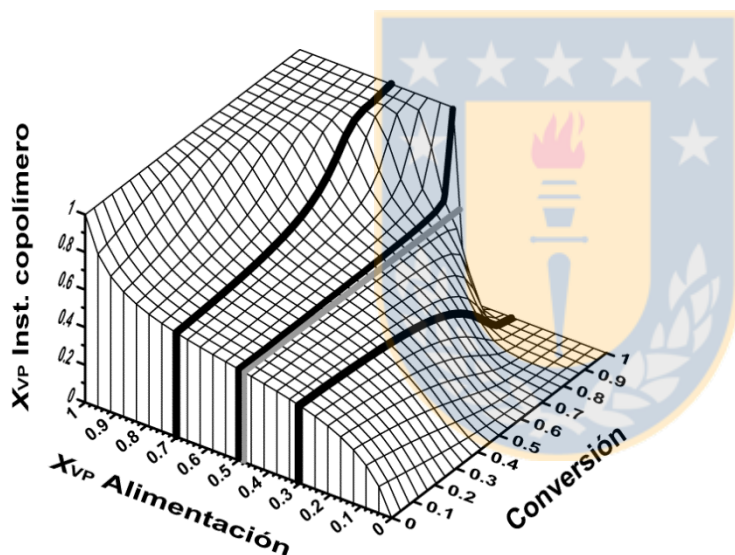


**Figura 3.8.** Diagramas de relaciones de reactividad de los sistemas: (a) VP:AMPSNa y (b) AAm:AMPSNa. Rombos vacíos: reacción con composición inicial de monómeros (30:70); triángulos sólidos: reacción con composición inicial de monómeros (50:50); y cuadrados sólidos: reacción con composición inicial de monómeros (70:30).

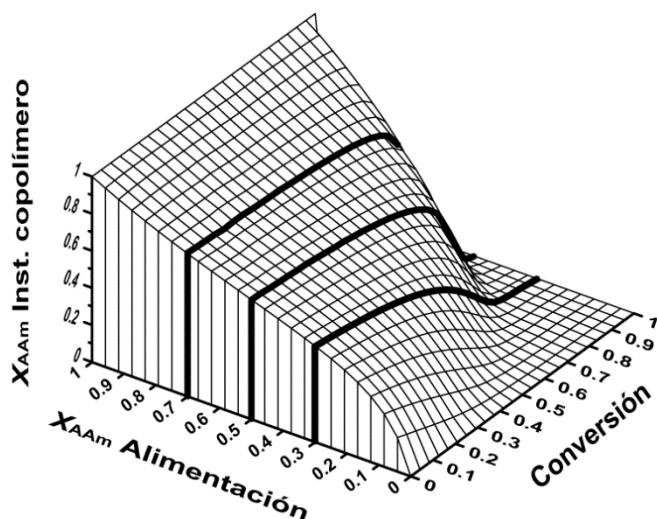
En ambos sistemas copoliméricos estudiados, se observa que sus valores de  $r_{AMPS}$  ( $r_2$ ) son menores que los reportados a mayores concentraciones totales de monómeros para los mismos sistemas. Lo anterior puede explicarse por la disminución de la fuerza iónica del medio al

reducir la concentración total de monómeros; a menor fuerza iónica, menor apantallamiento de las cargas del monómero aniónico ( $\text{AMPS}^-$ ) y del radical en crecimiento, el cual es parcialmente aniónico, y por ende se incrementan las repulsiones electrostáticas, lo que conduce a un aumento de la velocidad de heteropropagación  $K_{21}$  respecto a la de homopropagación  $K_{22}$  y por ende, el valor de  $r_2 = K_{22}/K_{21}$  decrece [101].

El algoritmo “Conversion” desarrollado por Gallardo y colaboradores [102] (el cual está basado en el modelo terminal de copolimerización), fue aplicado a los valores de relaciones de reactividad obtenidos; como resultado se generaron gráficos 3D que predicen la evolución de la fracción molar instantánea de monómeros en el copolímero ( $F_{M1}$ ), en función de la conversión y la fracción molar en la alimentación ( $f_{M1}$ ) (ver Figuras 3.9 y 3.10).



**Figura 3.9.** Fracción molar instantánea de VP en el copolímero para el sistema poli[VP-co-AMPSNa] en función de la conversión y la composición de VP en la alimentación. Las líneas negras representan el curso que seguiría una reacción de copolimerización para una determinada concentración de VP en el alimento ( $f_{VP} = 0.3, 0.5, 0.7$ ) y la línea gris representa el curso de la reacción para el punto azeotrópico ( $\text{PAZ} = f_{VP} = 0.478$ ).



**Figura 3.10.** Fracción molar instantánea de AAm en el copolímero para el sistema poli[AAm-co-AMPSNa] en función de la conversión y la composición de AAm en la alimentación. Las líneas negras representan el curso que seguiría la reacción para determinadas fracciones molares de AAm en la alimentación ( $f_{AAm} = 0.3, 0.5, 0.7$ ).

Ambos monómeros del sistema poli[VP-co-AMPSNa] presentan relaciones de reactividad menores que la unidad ( $r_{VP} = 0.15$  y  $r_{AMPS} = 0.22$ ), lo cual es característico de una copolimerización azeotrópica. En este tipo de copolimerización existe una sola composición de monómeros en la alimentación que genera la misma composición de monómeros en el copolímero ( $f_{VP} = F_{VP} = 0.478$ ) y dicho comportamiento se observa para todos los porcentajes de conversión (ver línea gris de la Figura 3.9). Esta composición monomérica se denomina “punto azeotrópico” [103]. Para composiciones diferentes al punto azeotrópico, los copolímeros producidos tienen una composición diferente a la de la alimentación. Otra importante característica del sistema es la moderada tendencia a formar una estructura alternante, ya que ambas especies en propagación reaccionan preferiblemente con la especie opuesta.

En la Figura 3.9 se observa el avance de la copolimerización respecto a la conversión para el sistema poli[VP-co-AMPSNa]. Para composiciones en la alimentación mayores y menores que el punto azeotrópico (línea gris), la composición instantánea de las cadenas poliméricas en crecimiento son aproximadamente constantes pero solo hasta conversión intermedia; a altas conversiones el comportamiento es completamente opuesto, ya que incrementan las

composiciones de las cadenas poliméricas procedentes de composiciones iniciales mayores que el azeótropo y disminuyen las que provienen de composiciones iniciales menores que el azeótropo. Lo anterior implica secuencias finales ricas en VP para el primer caso, mientras que para el segundo caso, las secuencias finales son ricas en AMPSNa.

El tipo de copolimerización que siguió el sistema poli[AAm-co-AMPSNa] también puede considerarse como “moderadamente alternante”, puesto que el producto de sus relaciones de reactividad tiende a cero ( $r_{AAm} \times r_{AMPS} = 0.18$ ); pero no existe un punto azeotrópico, como en el caso de poli[VP-co-AMPSNa] debido a que  $r_{AAm} \geq 1$  (1.1) y  $r_{AMPS} \leq 1$  (0.16) [103]. El valor de  $r_{AAm} = 1.1$ , implica una leve tendencia a la homopropagación de las cadenas radicalarias del tipo AAm. Las composiciones instantáneas de AAm en el copolímero para las reacciones con diferentes composiciones en la alimentación, fueron aproximadamente constantes hasta 30% de conversión, y luego disminuyeron progresivamente. Dicho comportamiento implica secuencias finales ricas en el componente menos reactivo, AMPSNa (ver Figura 3.10).

### 3.3 Compositos hidrogel-nanoplata

Los hidrogeles sintetizados presentaron alta capacidad de hinchamiento al sumergirlos en los coloides de plata, durante la preparación de los respectivos compositos hidrogel-NPsAg. Los mililitros de coloide absorbidos por gramo de hidrogel seco (xerogel), se registran en la Tabla 5. Los compositos secos presentaron un color más oscuro que sus respectivos hidrogeles de procedencia.

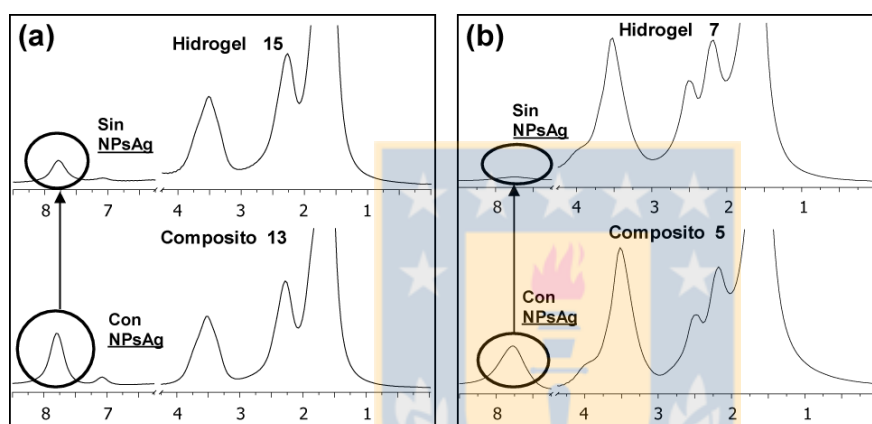
**Tabla 5.** Volumen de coloide absorbido por gramo de xerogel y numeración asignada al composito resultante.

Hidrogel N°	Composición en la alimentación	Sumergido en	Coloide/Xerogel (mL/g)	Composito N°
7	VP:AMPSNa[1:1] - 3 mol%MBA	coloide N°1	115	5
		coloide N°2	115	6
11	VP:AMPSNa[1:1] - 6 mol%MBA	coloide N°1	40	9
		coloide N°2	40	10
15	AAm:AMPSNa[1:1] - 3 mol%MBA	coloide N°1	40	13
		coloide N°2	40	14
22	AAm:AMPSNa[1:1] - 6 mol%MBA	coloide N°1	20	18
		coloide N°2	20	19



### 3.3.1 Análisis de los compositos por $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido y ATR-FTIR

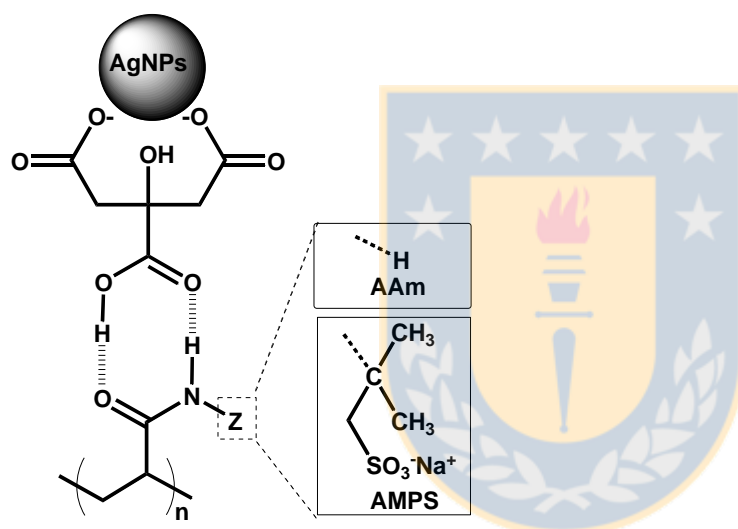
Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido de los compositos 13 y 14 fueron muy similares al obtenido del hidrogel 15, con la diferencia que los dos primeros presentaron una mayor intensidad en la señal de los protones amídicos (ver Figura 3.11(a), composito 13 versus hidrogel 15; además, la señal del 13 es más intensa que la del 14). Se llegó al mismo resultado, al comparar los espectros de los compositos 18 y 19 con el espectro del hidrogel 22. Nótese que la única diferencia entre estos tres últimos materiales y los tres primeros mencionados, es la cantidad de MBA usado durante la síntesis (6 mol% versus 3 mol%).



**Figura 3.11.** Comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido entre: (a) composito 13 e hidrogel 15, (b) composito 5 e hidrogel 7. La intensidad de la señal de los protones amídicos (mostrada en el círculo) es mayor en los compositos.

Al igual que en los casos anteriores, cuando se compararon los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido de los compositos 5 y 6 frente al proveniente del hidrogel 7, la única diferencia observada fue la mayor intensidad de la señal del protón amídico en los compositos (ver Figura 3.11(b), composito 5 versus hidrogel 7; además, la señal del 5 es más intensa que la del 6). La presencia de las NPsAg en los compositos sería la causante de la diferencia espectral observada, ya que tanto éstos como el hidrogel fueron sintetizados a partir de idénticas fracciones molares de VP, AMPSNa y MBA en la alimentación (50, 50 y 3 mol%, respectivamente). Se obtuvo un resultado muy similar al anterior, cuando se compararon los espectros de los compositos 9 y 10 con el espectro del hidrogel 11, los cuales fueron sintetizados a partir de 6 mol% MBA.

Una posible explicación del comportamiento observado entre los hidrogeles cargados con nanopartículas de plata y los no cargados, es la siguiente: las NPsAg se encuentran rodeadas en su superficie con moléculas de citrato que pueden formar enlaces de hidrógeno con los grupos amino pendientes de la cadena principal del copolímero [76]. Al formarse dichos enlaces de hidrógeno, se reduce sustancialmente el intercambio de protones de los grupos amino con el agua deuterada y por lo tanto, mayor número de protones son detectados en el experimento de resonancia magnética [100]. Además de los grupos amino, los carbonilos adyacentes también pueden participar en la formación de dichos enlaces de hidrógeno (ver Figura 3.12).



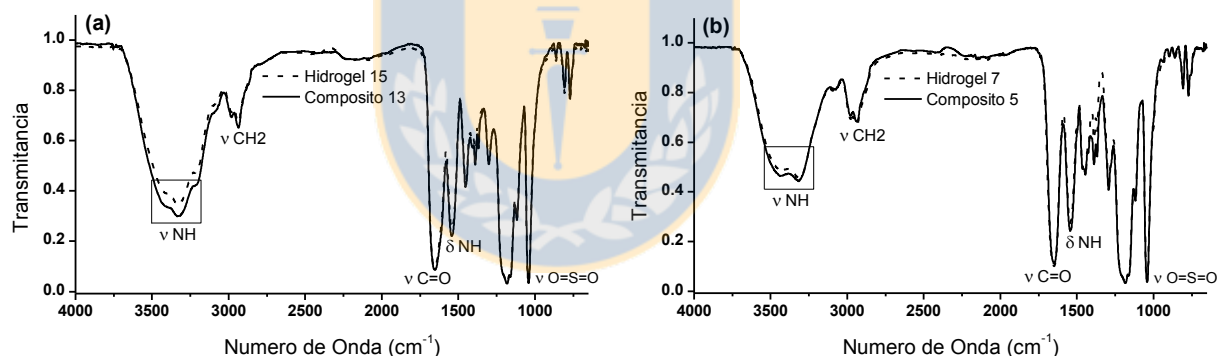
**Figura 3.12.** Representación esquemática de un enlace de hidrógeno (sugerido [75]) entre el grupo amídico lateral del copolímero poli[AAM-*co*-AMPSNa] y NPsAg estabilizadas con citrato.

En la Figura 3.13 se presenta a manera de ejemplo, un análisis comparativo de los espectros ATR-FTIR entre algunos compositos y los respectivos hidrogeles de procedencia; se encontraron diferencias de intensidad en las señales correspondientes a los estiramientos ( $\nu$ ) N-H de los grupos amino (entre 3439 y 3220  $\text{cm}^{-1}$ ); dichas señales fueron más intensas para los compositos [104], lo que sugiere junto con los previos análisis de  $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido, una posible interacción entre las NPsAg y los grupos amino de la matriz polimérica. Los espectros IR de todas las muestras indicaron la presencia de grupos funcionales

característicos del copolímero esperado (ver Tabla 6) y la ausencia de señales vinílicas ( $\nu$  C=C a 1635–1620  $\text{cm}^{-1}$ ) [105]. Lo anterior es evidencia de la copolimerización de los monómeros y de la pureza del producto obtenido. Resultados similares se obtuvieron para los demás compositos e hidrogeles.

**Tabla 6.** Identificación de los picos en los espectros ATR-FTIR de los hidrogeles poli[VP-co-AMPSNa] y poli[AAM-co-AMPSNa].

Pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuido a
3439-3220	Estiramientos ( $\nu$ ) N-H de los grupos amino
2980-2936	Estiramientos ( $\nu$ ) CH <sub>2</sub> simétricos y asimétricos
1655-1650	Estiramientos ( $\nu$ ) C=O de las amidas
1544-1543	Flexiones ( $\delta$ ) N-H de los grupos amino
1183-1182	Estiramientos ( $\nu$ ) O=S=O asimétricos
1040	Estiramientos ( $\nu$ ) O=S=O simétricos

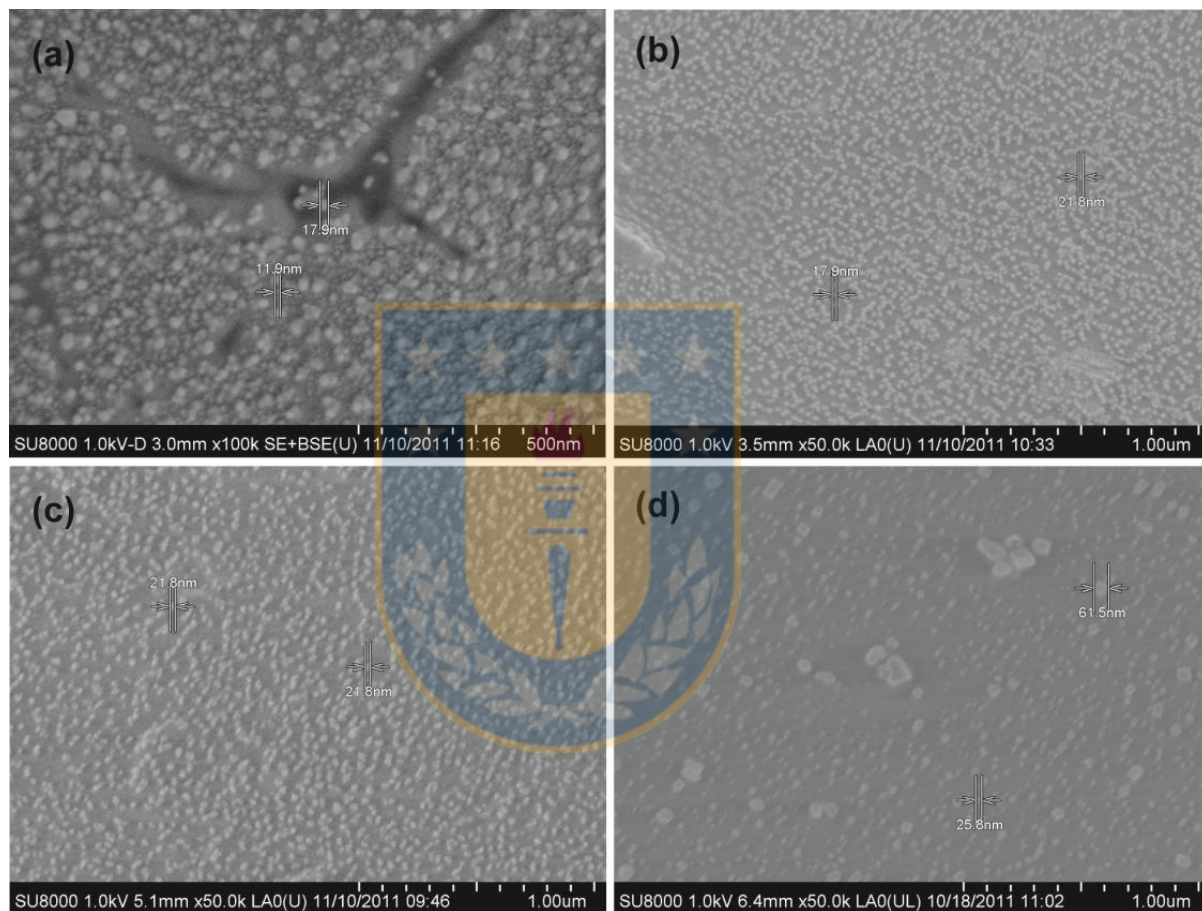


**Figura 3.13.** Comparación de los espectros ATR-FTIR entre: (a) composito 13 e hidrogel 15, (b) composito 5 e hidrogel 7. Los estiramientos  $\nu$ N-H de los compositos (mostrados en los círculos) presentan bandas de mayor intensidad.

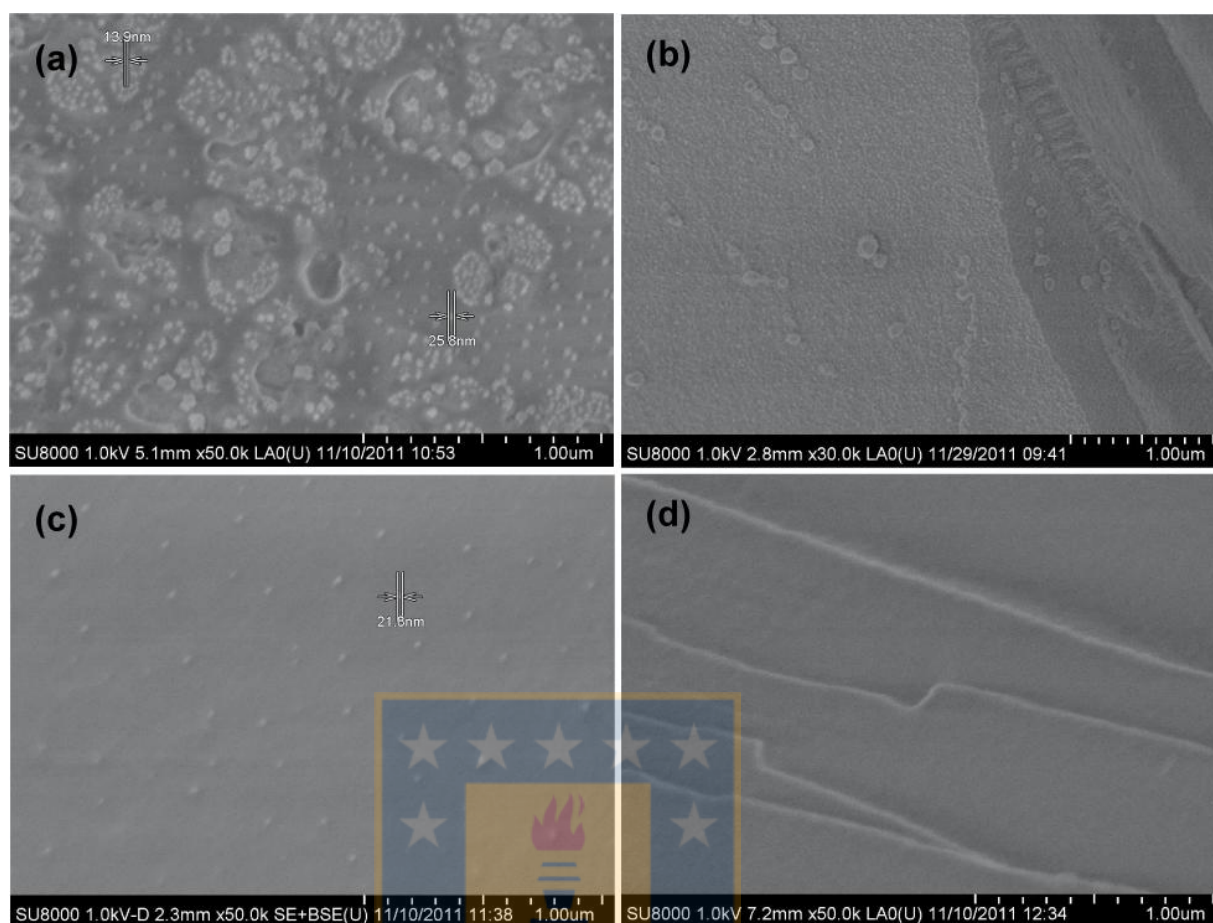
### 3.3.2 Microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de energía dispersiva

Las micrografías electrónicas de barrido (imágenes SEM) permitieron observar nanopartículas (NPs) mayores de 6 nm de diámetro, distribuidas homogéneamente y muy cercanas unas de otras, sobre la superficie externa de los compositos 5, 9, 13 (ver Figura 3.14), 6 y 10 (ver Figura 3.15), sin embargo, en los compositos 14 y 18 se observaron más disgregadas y en

menor cantidad; mientras que en el compuesto 19 no se observaron NPsAg. Tampoco se observaron NPs en los cortes de sección de todos los compositos. En contraste, las micrografías electrónicas de transmisión (TEM) tomadas a los coloides (utilizados en la preparación de los compositos) mostraron altos porcentajes de NPs menores de 6 nm, por lo tanto es necesario explicar la ausencia de éstas NPs en los compositos a través de sus análisis EDS.



**Figura 3.14.** Micrografías electrónicas de barrido de la superficie externa de los compositos hidrogel-NPsAg: (a) 5, (b) 9, (c) 13 y (d) 18.

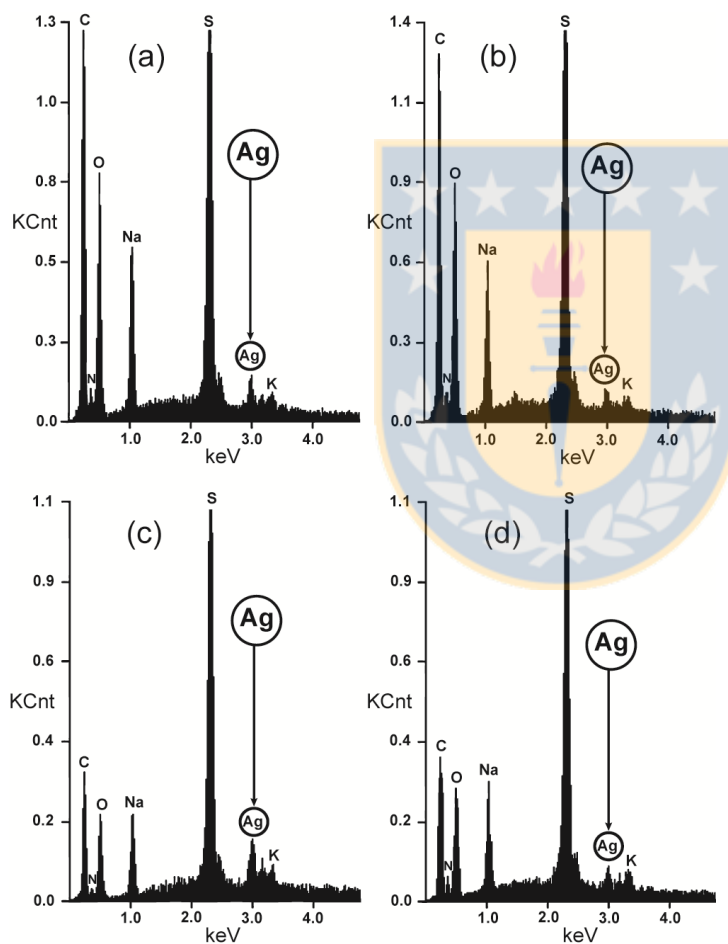


**Figura 3.15.** Micrografías electrónicas de barrido de la superficie externa de los composites hidrogel-NPsAg: (a) 6, (b) 10, (c) 14 y (d) 19.

Los espectros EDS de la superficie externa y de los cortes de sección de cada composite, fueron casi idénticos y mostraron una señal a  $\sim 3$  keV que corresponde a la plata incorporada (ver Figura 3.16). En el caso de la superficie externa, es probable que esta señal sea generada simultáneamente por las NPsAg  $> 6$  nm observadas con SEM y por los iones plata que no reaccionaron durante la síntesis de los coloides. La ausencia de NPs con diámetros menores de 6 nm en todos los composites, sugiere una posible agregación cuando entran en contacto con la superficie del hidrogel, convirtiéndose en otras de mayor tamaño incapaces de difundirse en el interior del mismo. En el caso de los cortes de sección, la señal de plata detectada por EDS puede atribuirse a la fracción de iones plata que no reaccionaron y lograron difundirse al interior del material. También es probable que las nanopartículas menores de 6 nm se encuentren tanto en el interior de los composites como en su superficie, pero las condiciones

de análisis de la muestra y la capacidad de detección del equipo de SEM utilizado, no permitan observarlas.

Es importante tener en cuenta que los microanálisis elementales cuantitativos de materiales mediante la técnica EDS exigen la ausencia de irregularidades superficiales en la muestra, y en caso que estas existan, solo se obtendrán resultados cualitativos. Como los composites preparados en la presente investigación tienen superficies irregulares, solo pudieron ser analizados cualitativamente.



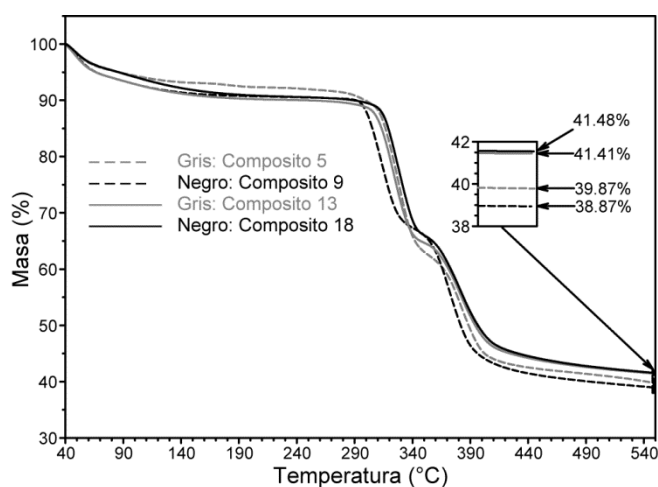
**Figura 3.16.** Espectros EDS de una sección de corte de los composites hidrogel-NPsAg: (a) 5, (b) 9, (c) 13 y (d) 18.



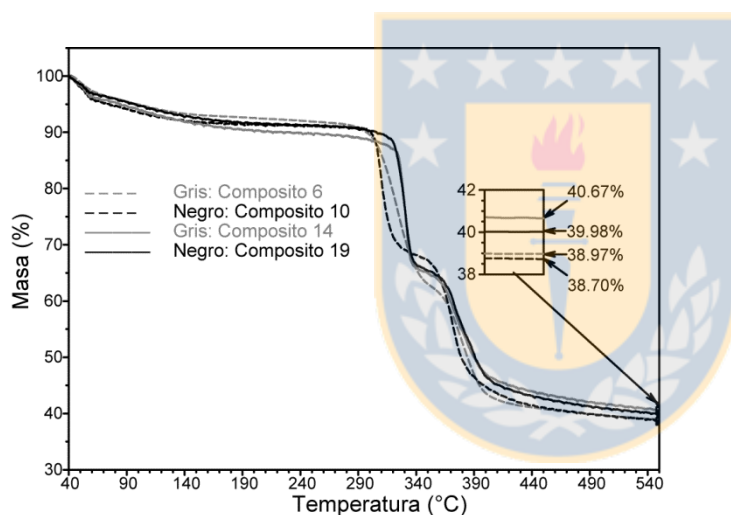
### 3.3.3 Análisis termogravimétrico

Los diagramas termogravimétricos de los compositos procedentes del coloide N°1 y del coloide N°2 se muestran en las Figuras 3.17 y 3.18, respectivamente. En el rango de temperatura entre 40-300°C todos los compositos son estables térmicamente, pero experimentan una pérdida gradual de masa entre 40 y 150°C, como consecuencia de la liberación del agua absorbida del aire, debido a las características higroscópicas de estos materiales. El calentamiento continuado conduce a dos etapas de descomposición, las cuales corresponden probablemente a: i) la degradación de cadenas ricas en secuencias alternadas sintetizadas a baja y media conversión (ver Figuras 3.9 y 3.10), la cual comienza entre 310 y 330 °C; y ii) la degradación de cadenas ricas en secuencias VP, para los compositos del tipo poli[VP-co-AMPSNa] (5, 9, 6 y 10) y ricas en secuencias AMPSNa, para aquellos del tipo poli[AAm-co-AMPSNa] (13, 14, 18 y 19), la cual se identifica en ambos casos como un hombro cercano a 373°C en las respectivas curvas [72].

Al comparar los diagramas de las Figuras 3.17 y 3.18, se evidencia en cada grupo de compositos con iguales tipos de monómeros (5, 9 y 6, 10 versus 13, 18 y 14, 19), que a menor porcentaje de entrecruzador (3 mol% versus 6 mol%) un mayor porcentaje de peso residual es generado (se cumple para ambos coloides, N°1 y N°2). Esto se debe a que aumenta la capacidad de hinchamiento con la disminución del grado de entrecruzamiento, y por ende el volumen de coloide retenido es mayor, lo que se traduce en una mayor cantidad de NPsAg cargadas [104, 44]. La afirmación anterior coincide con los datos mostrados en la Tabla 5. Solo en el caso de los compositos 13 y 18 (ver Figura 3.17), donde el contenido de agente entrecruzante es mayor en el último, no se encuentran diferencias apreciables en los porcentajes de peso residual, lo que podría haber sido causado por inhomogeneidades en la distribución de plata en la muestra.



**Figura 3.17.** Efecto del tipo de unidades monoméricas (VP:AMPSNa, AAm:AMPSNa) y cantidad de entrecruzador (3 mol%, 6 mol%) en el comportamiento termogravimétrico de los compositos preparados con el coloide N°1 (compositos: 5, 9, 13 y 18).



**Figura 3.18.** Efecto del tipo de unidades monoméricas (VP:AMPSNa, AAm:AMPSNa) y cantidad de entrecruzador (3 mol%, 6 mol%) en el comportamiento termogravimétrico de los compositos preparados con el coloide N°2 (compositos 6, 10, 14 y 19).

### 3.3.4 Capacidad de absorción de líquidos: agua y PBS

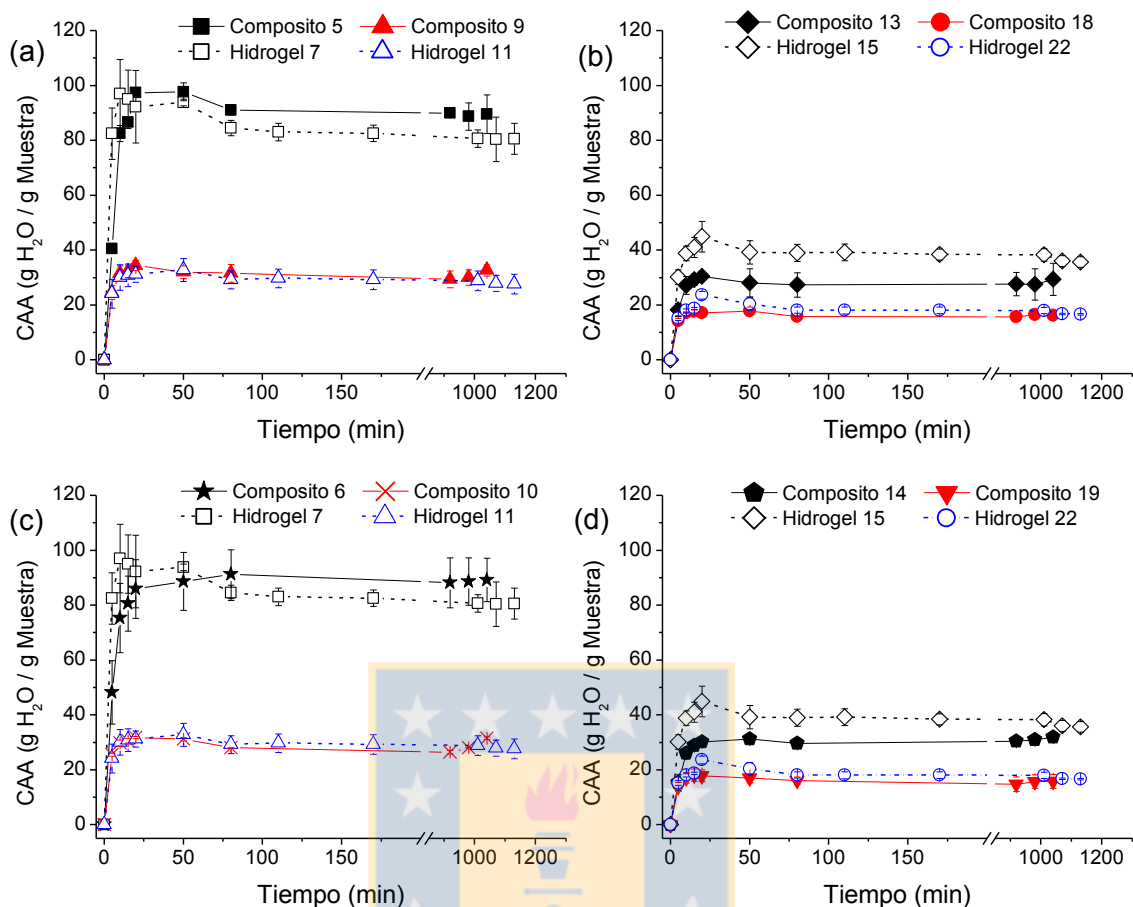
Con el fin de evaluar las características del proceso de absorción de líquidos de los hidrogeles y compositos preparados, se realizaron experimentos de absorción de agua UP y tampón fosfato salino (PBS) en función del tiempo.



Como se mencionó en la parte introductoria de la presente tesis, una de las potenciales aplicaciones de los sistemas poliméricos estudiados, es la de coadyuvantes en el tratamiento de heridas profundas y exudativas, lo que implicaría el contacto de estos materiales con fluidos biológicos constituidos principalmente de plasma sanguíneo, el cual tiene características similares a las del PBS usado en los experimentos de absorción mencionados previamente. Algunas de estas características compartidas, son: conductividad eléctrica de  $15700 \mu\text{S cm}^{-1}$  [106], pH 7.4 y  $37^\circ\text{C}$  de temperatura, además de la presencia de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y fosfato, en una concentración total 149 mM que mantienen el pH estable, pero a diferencia del PBS, el plasma sanguíneo contiene moléculas orgánicas adicionales.

Por lo tanto, la utilización del PBS en lugar de plasma sanguíneo en nuestros experimentos, sería un modelo experimental adecuado para predecir de manera aproximada la máxima cantidad de exudado que cada composito absorbería y con base en este dato, se podría seleccionar el composito más apropiado de acuerdo al nivel de exudados que presente una herida particular. Además, el PBS es utilizado frecuentemente por investigadores como modelo experimental para estudiar de manera preeliminar y bajo condiciones controladas de laboratorio, la capacidad de absorción de fluidos biológicos por parte de diversos tipos de hidrogeles con potenciales aplicaciones biomédicas [107].

Antes de empezar a discutir los resultados de los experimentos de absorción de PBS en función del tiempo, es importante tener como parámetro de comparación los resultados obtenidos en agua UP cuya conductividad eléctrica, pH y temperatura durante los ensayos, fueron:  $0.055 \mu\text{S cm}^{-1}$ , 6.3 y  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Cabe destacar el evidente aumento de volumen o hinchamiento que experimentaron todos los compositos e hidrogeles estudiados cuando se sumergieron en agua y en PBS.



**Figura 3.19.** Absorción de agua UP en función del tiempo para los compositos hidrogel-nanoplata preparados con el coloide N°1 (a, b), coloide N°2 (c, d) y sus hidrogelos de procedencia con diferentes unidades monoméricas (VP:AMPSNa, AAm:AMPSNa) y cantidades de entrecruzador MBA (3 mol%, 6 mol%). Hidrogel 7 y compositos 5, 6: VP:AMPSNa-3 mol%; Hidrogel 11 y compositos 9, 10: VP:AMPSNa-6 mol%; Hidrogel 15 y compositos 13, 14: AAm:AMPSNa-3 mol%; Hidrogel 22 y compositos 18, 19: AAm:AMPSNa-6 mol%.

Al comparar los gráficos (a) y (b) de la Figura 3.19 correspondientes a los compositos preparados con el coloide N°1 que contienen *N*-vinilpirrolidona (5 y 9) y a los que contienen acrilamida (13 y 18) respectivamente, se observa que la capacidad de absorción de agua (CAA) entre pares con igual porcentaje de entrecruzador (5 versus 13 y 9 versus 18) a 980 minutos de inmersión es mayor para los primeros, destacándose la diferencia de CAA entre el par de compositos con 3 mol% de entrecruzador (5 versus 13), la cual fue aproximadamente 3 veces mayor en favor del que contiene *N*-vinilpirrolidona y cerca de 2 veces mayor, en el caso

del par de compositos con 6 mol% de entrecruzador (9 versus 18). También se evidencia en cada grupo de compositos con iguales tipos de monómeros, que a menor porcentaje de entrecruzador (3 mol% versus 6 mol%) la absorción de agua es mayor. Por otro lado, las curvas de absorción de agua en el tiempo de los compositos referenciados en la Figura 3.19 (a) y (b), fueron casi idénticas a las obtenidas para los compositos mencionados en la Figura 3.19 (c) y (d) respectivamente, a pesar de que ambos grupos difieren en que los primeros fueron preparados con el coloide N°1 y los segundos con el coloide N°2.

El mecanismo de absorción de agua de los compositos e hidrogeles evaluados, se puede interpretar de la siguiente forma: (i) los grupos sulfonato presentes en ambos sistemas copoliméricos se ionizaron al sumergirlos en el agua UP, debido a que su pKa es mucho menor que el pH del agua utilizada. (ii) La ionización de los grupos sulfonato generó cargas fijadas a la red polimérica que provocaron un incremento de las repulsiones electrostáticas entre las cadenas, así como, una distribución desigual de los iones móviles ( $\text{Na}^+$  y/o  $\text{Ag}^+$ ) en la red y la disolución externa, causando una diferencia de presión osmótica entre las dos fases (potencial de Donnan) [108]. Todo esto ocasionó una progresiva expansión de la red y, por tanto, su hinchamiento o aumento de la hidrofilia, hasta el punto en que fue interrumpida por la fuerza retráctil que ejercen los entrecruzamientos covalentes de las cadenas y por la caída de la presión osmótica causada por una nueva distribución homogénea de los iones entre ambas fases (gel y líquida). Esta última etapa del proceso es conocida como “equilibrio de hinchamiento” y se caracteriza por un valor de CAA de la muestra (composito o hidrogel en estudio) que se mantiene constante en el tiempo [45]. Este valor fue alcanzado aproximadamente 75 minutos después de sumergir en agua UP cada una de las muestras evaluadas (ver Figura 3.19). Siguiendo el mismo orden de ideas, mientras más entrecruzada se encuentre la matriz polimérica, las cadenas reducirán su capacidad de expansión e ingresará menor cantidad de agua, lo cual explica las diferencias de absorción de agua encontrada entre compositos con iguales tipos de monómeros y distintos porcentajes de entrecruzador.

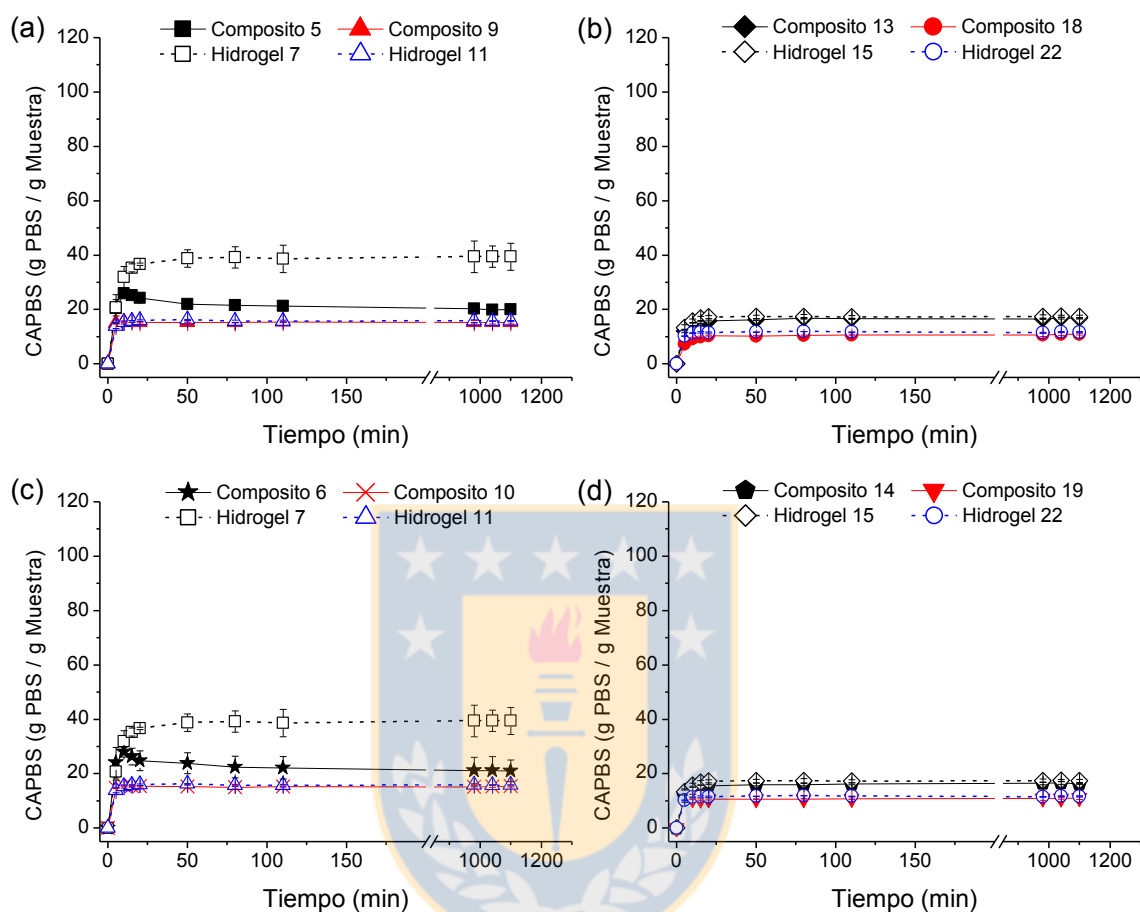
Otro aspecto que llama la atención en la Figura 3.19, es el comportamiento anómalo que muestran la mayoría de las curvas de hinchamiento durante los primeros 75 minutos. Dicho comportamiento consiste, en un sobrehinchamiento inicial seguido de una disminución del mismo hasta alcanzar el hinchamiento de equilibrio del hidrogel o composito respectivo. Este

fenómeno ha sido observado previamente por algunos investigadores, en los hidrogeles: poli[HEMA] (poli[2-hidroxietil-metacrilato]), poli[HEMA-*co*-*N*-vinilpirrolidona], poli[metil-metacrilato], poli[cloruro de (2-[acriloloxi]etil) trimetilamonio-*co*-ácido acrílico], poli[isopropilacrilamida-*co*-ácido metacrílico], poli[HEMA-*co*-estirensulfonato sódico] y poli[*N*-vinilimidazol-*co*-estirensulfonato sódico]. Katime y colaboradores [45] revisaron las interpretaciones de estos investigadores al respecto y se refirieron a ellas textualmente, con las siguientes palabras: “Este comportamiento lo han intentado explicar Peppas, Valencia y Pierola, Barrales-Rienda, y otros autores empleando diversos modelos. Estos modelos tienen sus puntos fuertes y débiles, lo que significa que ninguno de ellos es totalmente satisfactorio y capaz de explicar todos los resultados experimentales observados hasta el momento”.

Los mayores valores de CAA para los compositos del tipo poli[VP-*co*-AMPSNa] frente a los del tipo poli[AAm-*co*-AMPSNa] entre pares con igual porcentaje de entrecruzador (ver Figura 3.19), se debe a dos posibles causas: i) la mayor fracción molar de AMPSNa en el primer sistema copolimérico, estimada en 0.58 frente al valor de 0.45 obtenido para el segundo sistema y ii) el menor número de enlaces de hidrógeno intra- e inter-catenarios entre grupos amídicos laterales de la matriz polimérica del sistema poli[VP-*co*-AMPSNa], como consecuencia de la ausencia de hidrógeno en el grupo amídico de la unidad monomérica VP; esto condujo a una mayor relajación de las cadenas poliméricas y por ende, una mayor cantidad de agua pudo ingresar a este sistema [100].

Por otro lado, las comparaciones entre compositos realizadas a partir de la Figura 3.19 también son válidas para la Figura 3.20, aunque en este caso, en donde el medio líquido de inmersión es PBS, los valores de máxima capacidad de hinchamiento fueron significativamente menores; además, la diferencia de CAPBS a 980 min entre pares con 3 mol% de entrecruzador (5 versus 13), fue aproximadamente 1.2 veces mayor en favor del composito que contiene *N*-vinilpirrolidona y cerca de 1.4 veces mayor, en el caso del par de compositos con 6 mol% de entrecruzador (9 versus 18). Estos mismos valores y diferencias se mantuvieron para los correspondientes compositos procedentes del coloide N°2 (6 versus 14; 10 versus 19). El equilibrio de hinchamiento se alcanzó aproximadamente 50 minutos después de sumergir en PBS cada una de las muestras evaluadas y el “efecto de sobrehinchamiento” estuvo ausente en

la mayoría de las muestras, presentándose solamente de manera muy leve en los composites 5 y 6.



**Figura 3.20.** Absorción de tampón fosfato salino (PBS) en función del tiempo para los composites hidrogel-nanoplatea preparados con el coloide N°1 (a, b), coloide N°2 (c, d) y sus hidrogeles de procedencia con diferentes unidades monoméricas (VP:AMPSNa, AAm:AMPSNa) y cantidades de entrecruzador MBA (3 mol%, 6 mol%). Hidrogel 7 y composites 5, 6: VP:AMPSNa-3 mol%; Hidrogel 11 y composites 9, 10: VP:AMPSNa-6 mol%; Hidrogel 15 y composites 13, 14: AAm:AMPSNa-3 mol%; Hidrogel 22 y composites 18, 19: AAm:AMPSNa-6 mol%.

La gran diferencia en el hinchamiento de los materiales, que surge al comparar los resultados de su inmersión en agua y en PBS (a 980 min), se atribuye a la fuerza iónica del medio de inmersión [109]. Debido a que la fuerza iónica del agua UP es prácticamente nula, las cargas negativas fijadas a la red polimérica presentan un apantallamiento mínimo, lo que permite una

repulsión de máxima intensidad entre ellas y por ende, el hinchamiento aumenta. Mientras que la alta concentración de iones del PBS le otorga a este medio una fuerza iónica mayor que la del agua UP, y genera un gradiente de difusión de iones hacia el interior de la red polimérica que incrementa drásticamente el número de interacciones entre los contraiones y las cargas fijadas a la red (en comparación con el caso del agua UP); de manera que estas últimas experimentan un fuerte efecto de apantallamiento por los contraiones, lo que conduce a la disminución de la repulsión electrostática y finalmente, a la reducción de la capacidad de hinchamiento en el equilibrio del polímero en cuestión [110]. Los valores más altos de CAPBS (a 980 minutos) obtenidos entre los ocho compositos evaluados, fueron:  $20.3 \pm 1.9$ ,  $21.2 \pm 4.9$ ,  $16.6 \pm 0.2$  y  $16.5 \pm 0.5$  gramos de PBS por gramo de muestra, correspondientes a los compositos 5, 6, 13 y 14, respectivamente; dichos compositos contienen el menor porcentaje de entrecruzador (3 mol% de MBA), como era de esperarse.

Cabe señalar que las mediciones de capacidad de hinchamiento, frecuentemente se realizan en materiales poliméricos con una forma geométrica definida. Sin embargo, en el presente trabajo se utilizaron compositos hidrogel-nanoplatina en polvo sin forma geométrica definida (partículas irregulares con tamaños entre 100 y 250  $\mu\text{m}$ ), debido principalmente a que fueron concebidos como potencial material de relleno de heridas cavitativas y exudativas, y por lo tanto desde el punto de vista práctico, es más importante intentar obtener una distribución de tamaños de partícula homogénea en el rango de unos pocos cientos de micrómetros, que alguna forma geométrica en especial para dichas partículas. Una de las razones por la que muchos investigadores prefieren medir el hinchamiento de polímeros con forma geométrica definida, es la posibilidad de describir el proceso de penetración del líquido en el material polimérico mediante modelos matemáticos que a su vez, permitan clasificarlo y compararlo con los de otros materiales. En la literatura existen varios intentos para modelar el proceso de penetración de un líquido en materiales poliméricos, siendo el más sencillo, el descrito por la ecuación:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (14)$$

Donde  $M_t$  y  $M_\infty$  son las cantidades de agua absorbida en un tiempo = t y en el equilibrio, respectivamente. K y n son constantes dependientes de la forma geométrica definida (cilindro, esfera, lámina, etc) que debe tener el material polimérico evaluado y de otras características

del sistema, pero solamente la constante  $n$  o “exponente difusional” permite determinar el tipo de mecanismo de transporte del líquido hacia el interior del polímero. Cuando esta ecuación se aplica a velocidades de hinchamiento bajas, la representación gráfica de  $\log(M_t/M_\infty)$  versus  $\log(t)$  genera una línea recta cuya pendiente es  $= n$ . Con base en el valor del exponente difusional, se puede clasificar el mecanismo de transporte de un líquido en un material polimérico con geometría laminar, como: Fickiano ( $n = 0.5$ ), transporte Caso II ( $n = 1$ ), no-Fickiano o transporte anómalo ( $0.5 < n < 1$ ) y transporte Super Caso II ( $n > 1$ ) [111].

### 3.4 Actividad antibacteriana y capacidad de liberación de plata de los compositos

#### *Pozos en agar y halos de inhibición*

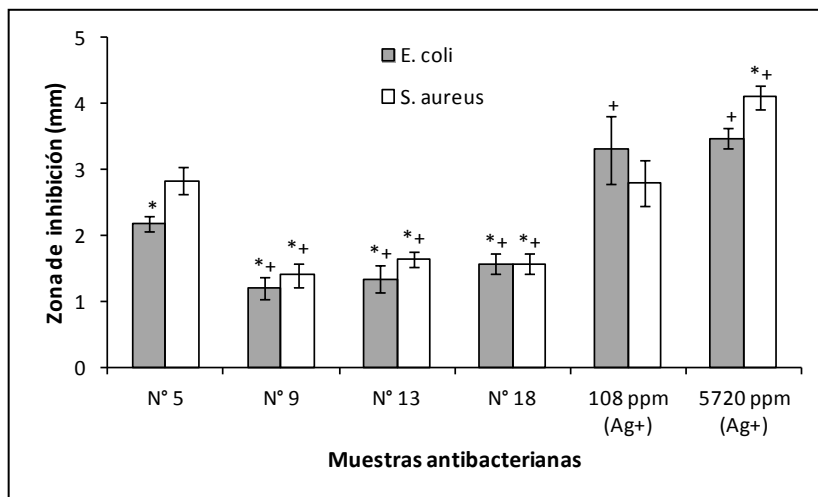
Los resultados registrados en la Tabla 7 y en las Figuras 3.21 a 3.24, indican claramente la presencia de actividad antibacteriana en los compositos, ya que generaron zonas de inhibición (ZI) del crecimiento bacteriano en los respectivos cultivos sobre placas de agar.

**Tabla 7.** Zonas de inhibición producidas por los compositos e hidrogeles sobre la superficie de placas de agar TSA sembradas con *E. coli* y *S. aureus* y porcentajes de plata liberada por los compositos después de sumergirlos en agua UP durante 4 días.

Composito N°	Composición en la alimentación	Ag (%) liberada en agua	Zona de inhibición $\pm$ D. E (mm)	
			<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
5	VP:AMPSNa[1:1] - 3 mol%MBA	2.47 $\pm$ 0.17	2.2 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.2
6	VP:AMPSNa[1:1] - 3 mol%MBA	1.28 $\pm$ 0.18	1.6 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.3
9	VP:AMPSNa[1:1] - 6 mol%MBA	0.89 $\pm$ 0.17	1.2 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.2
10	VP:AMPSNa[1:1] - 6 mol%MBA	0.69 $\pm$ 0.03	1.0 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.5
13	AAm:AMPSNa[1:1] - 3 mol%MBA	1.29 $\pm$ 0.01	1.3 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.1
14	AAm:AMPSNa[1:1] - 3 mol%MBA	0.70 $\pm$ 0.05	1.0 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2
18	AAm:AMPSNa[1:1] - 6 mol%MBA	1.05 $\pm$ 0.02	1.6 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2
19	AAm:AMPSNa[1:1] - 6 mol%MBA	0.56 $\pm$ 0.16	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2
108 ppm (Ag <sup>+</sup> )	No aplica	No aplica	3.3 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.3
5720 ppm (Ag <sup>+</sup> )	No aplica	No aplica	3.5 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.2

Por otro lado, los hidrogeles no inhibieron el crecimiento bacteriano (hidrogeles: 7, 11, 15 y 22), lo que permite señalar a la plata (NPsAg e iones Ag<sup>+</sup>) como la posible responsable del efecto antibacteriano encontrado en los compositos.

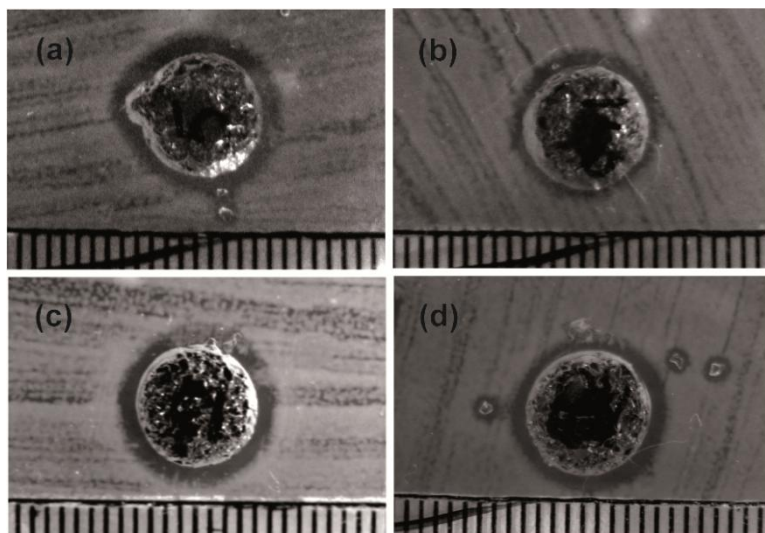




**Figura 3.21.** Zonas de inhibición (mm) producidas por los compositos hidrogel-NPsAg procedentes del coloide N°1 y los controles positivos (Ag<sup>+</sup>) en las placas de agar sembradas con: *E. coli* (barras grises) y *S. aureus* (barras blancas). Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (n=3) y las diferencias significativas obtenidas con ANOVA ( $p < 0.05$ ) frente a: 108 ppm de Ag<sup>+</sup> (\*) y el composito 5 (+).

Cabe recordar que el comportamiento termogravimétrico de los compositos descrito previamente, sugiere una mayor cantidad de plata incorporada en aquellos con menor cantidad de entrecruzador, dentro de cada grupo de compositos con iguales tipos de monómeros y coloide de origen. Esta afirmación toma fuerza al comprobarse que dichos compositos fueron capaces de liberar mayores porcentajes de plata cuando se sumergieron en agua, en comparación con sus contrapartes más entrecruzados (mayor cantidad de entrecruzador), tal y como lo demuestran los resultados registrados en la Tabla 7. Esto fue mucho más evidente para los compositos que contienen VP (5, 9 [coloide N°1] y 6, 10 [coloide N°2]) que para los compositos que contienen AAm (13, 18 [coloide N°1] y 14, 19 [coloide N°2]); ya que en el primer grupo de compositos (los que contienen VP), los de menor contenido de entrecruzador presentaron un porcentaje de liberación de plata entre 2 y 3 veces mayor (aproximadamente) que aquellos con mayor contenido de entrecruzador, lo que explica la gran diferencia entre los diámetros medios de sus zonas de inhibición (en particular cuando se comparan el 5 con el 9, procedentes del coloide N°1). Mientras que en el grupo de compositos que contienen AAm, el porcentaje de liberación de plata fue solo 1.2 veces mayor en favor de los menos entrecruzados, lo que explica los similares diámetros medios de sus zonas de inhibición.

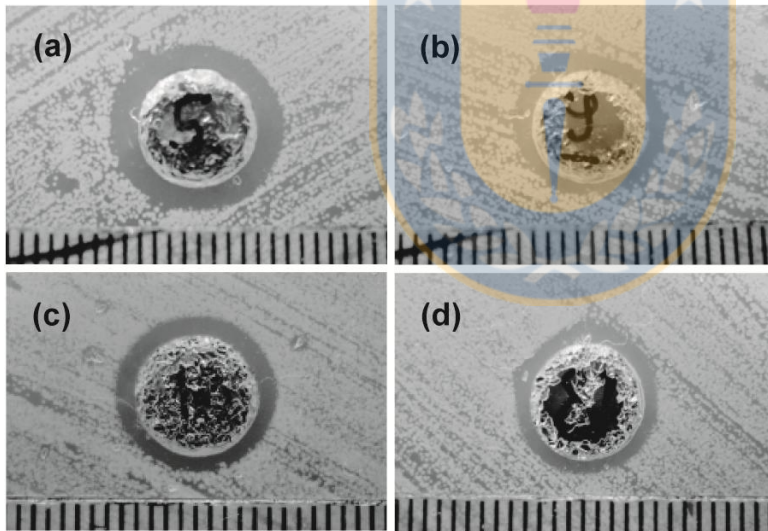




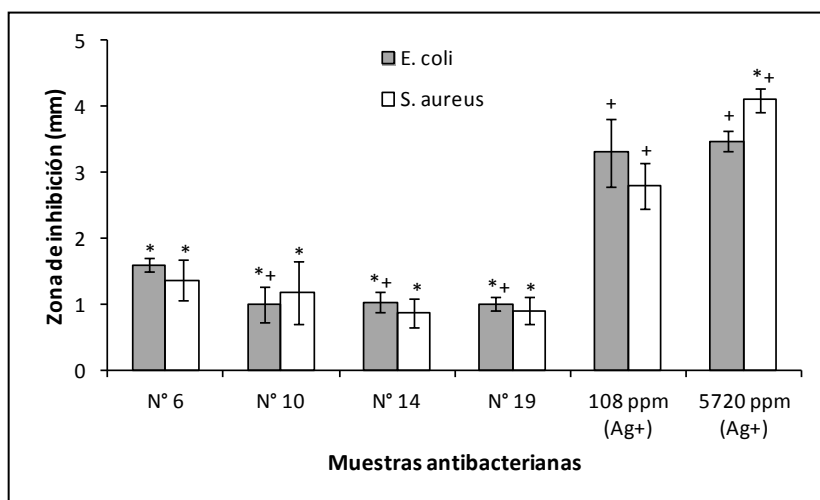
**Figura 3.22.** Imágenes de las zonas de inhibición del crecimiento de *E. coli* (ATCC 25922) generadas por los compositos: (a) 5, (b) 9, (c) 13 y (d) 18, después de 18 h de incubación a 37 °C.

Los valores de ZI obtenidos en el ensayo con *E. coli* para los compositos procedentes del coloide N°1 (ver Figura 3.21 y 3.22), fueron transformados mediante la expresión “ $\log_{10}(x-0.5)$ ” para ajustar los residuales a una distribución normal (Pruebas de bondad de ajuste Chi-cuadrado  $p=0.253551$  y Shapiro-Wilks  $p=0.258984$ , con un nivel de confianza del 90%) y además, se confirmó el cumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianza (Pruebas de Cochran  $p=0.6659$  y Bartlett  $p=0.302855$ , con un nivel de confianza del 95%) para estos datos. Los resultados del ANOVA permiten concluir que hay al menos dos tratamientos (compositos y soluciones control de  $\text{Ag}^+$ ) con diferencias significativas respecto a la zona de inhibición promedio ( $p=0.000$ ), para un nivel de confianza del 95%. Para encontrar esas diferencias se aplicó el método de comparaciones de medias por parejas (de Fischer). Las diferencias más importantes se encontraron entre la zona de inhibición del composito 5 y las generadas por los otros tres compositos (9, 13 y 18), que lo posicionan como el de mayor capacidad antibacteriana, debido a que el tamaño de su zona de inhibición es entre 37% y 83% mayor que la de los otros y 33% menor que la generada por la disolución de plata iónica con 108 ppm Ag (control positivo, ver Figura 3.21). No se encontraron diferencias significativas entre los valores de ZI promedio de los compositos 9, 13 y 18.

En el caso del ensayo realizado con *S. aureus* para los compositos procedentes del coloide N°1 (ver Figura 3.21 y 3.23), los valores de ZI promedio obtenidos fueron transformados con la expresión “ $(0,33 \cdot x)^{\log_{10}(x)}$ ” para ajustar los residuales a una distribución normal (Pruebas de bondad de ajuste Chi-cuadrado  $p=0.253551$  y Shapiro-Wilks  $p=0.147103$ , con un nivel de confianza del 90%); dichos datos también cumplieron el supuesto de homogeneidad de varianza (Pruebas de Cochran  $p=0.429817$  y Bartlett  $p=0.162817$ , con un nivel de confianza del 95%), lo que permitió realizar el ANOVA respectivo que reveló al menos dos tratamientos con diferencias significativas en sus valores promedio de ZI ( $p=0.000$ ), para un nivel de confianza del 95%. Estas diferencias fueron determinadas por medio del método de Fischer, destacándose nuevamente el mayor valor de ZI para el composito 5 respecto a los producidos por los compositos 9, 13 y 18, el cual es entre 75% y 100% más alto que en los últimos pero además, es igual al valor generado por la solución 108 ppm de  $\text{Ag}^+$  (control positivo, ver Figura 3.21). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los valores de ZI promedio de los compositos 9, 13 y 18.



**Figura 3.23.** Imágenes de las zonas de inhibición del crecimiento de *S. aureus* (ATCC 6538P) generadas por los compositos: (a) 5, (b) 9, (c) 13 y (d) 18, después de 18 h de incubación a 37 °C.



**Figura 3.24.** Zonas de inhibición (mm) producidas por los composites hidrogel-NPsAg procedentes del coloide N°2 y los controles positivos (Ag<sup>+</sup>) en las placas de agar sembradas con: *E. coli* (barras grises) y *S. aureus* (barras blancas). Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (n=3) y las diferencias significativas obtenidas con ANOVA ( $p < 0.05$ ) frente a: 108 ppm de Ag<sup>+</sup> (\*) y el composite 6 (+).

La actividad antibacteriana de los composites procedentes del coloide N°2 también fue evaluada mediante el método de pozos en agar sobre las bacterias *E. coli* y *S. aureus* y los resultados se muestran en la Figura 3.24. Los valores de ZI (en mm) obtenidos en el ensayo con *E. coli* para los composites procedentes del coloide N°2, fueron transformados mediante la expresión “ $\log_{10}(x)$ ” para dar cumplimiento a los supuestos de normalidad de errores (Pruebas de bondad de ajuste Chi-cuadrado  $p=0.862344$  y Shapiro-Wilks  $p=0.558323$ , con un nivel de confianza del 90%) y homocedasticidad (Pruebas de Cochran  $p=0.0764079$  y Bartlett  $p=0.231803$ , con un nivel de confianza del 95%). Se determinó mediante ANOVA la existencia de diferencias significativas ( $p=0.0000$ ) entre las zonas de inhibición promedio de al menos dos tratamientos con un nivel de confianza del 95%. Entre las diferencias halladas con el método de Fischer, las más importantes corresponden a las existentes entre la ZI (promedio) del composite 6 y las generadas por los otros tres composites (10, 14 y 19). El diámetro de la zona de inhibición de *E. coli* generada por el composite 6, es un 60% mayor que la del resto de composites y 52% menor que la generada por la disolución de plata iónica con 108 ppm Ag (control positivo, ver Figura 3.24). No se encontraron diferencias entre los valores de ZI promedio de los composites 10, 14 y 19.

Por último, en el caso del ensayo realizado con *S. aureus* para los compositos procedentes del coloide N°2 (ver Figura 3.24), los residuales de los valores ZI obtenidos se ajustaron a una distribución normal sin necesidad de transformar dichos valores con alguna expresión matemática (Pruebas de bondad de ajuste Chi-cuadrado  $p=0.468595$  y Shapiro-Wilks  $p=0.730286$ , con un nivel de confianza del 90%); además, se confirmó el cumplimiento de la hipótesis de homocedasticidad (Pruebas de Cochran  $p=0.443468$  y Bartlett  $p=0.770288$ , con un nivel de confianza del 95%), lo que permitió realizar el ANOVA respectivo que reveló al menos dos tratamientos con diferencias significativas en sus valores promedio de ZI ( $p=0.000$ ), para un nivel de confianza del 95%. Después de aplicar el método de comparaciones de medias de Fischer, no se encontraron diferencias entre las zonas de inhibición (promedio) de *S. aureus* generadas por los cuatro compositos procedentes del coloide N°2 (6, 10, 14 y 19), pero si se encontraron diferencias entre éstas últimas y las correspondientes a los dos controles positivos; como ejemplo, notar que los valores de ZI de los cuatro compositos fueron un 50 y 68% menor que el generado por la disolución de plata iónica con 108 ppm Ag.

Al comparar los diámetros de las zonas de inhibición de ambas bacterias generadas por los compositos procedentes del coloide N°2 (ver Figura 3.24), frente a sus pares procedentes del mismo hidrogel pero cargados con el coloide N°1 (ver Figura 3.21 y Tabla 5), se aprecian valores menores para los primeros, lo cual era de esperarse, ya que la concentración de plata total del coloide N°2 es la mitad que la del coloide N°1 (53.7 ppm versus 105.8 ppm) y volúmenes iguales de ambos coloides fueron absorbidos por cada uno de los 4 tipos de hidrogeles usados en la preparación de los respectivos compositos (ver Tabla 5). Otro resultado esperado de los compositos procedentes el coloide N°2, es la reducción cercana al 50% en los “porcentajes de liberación de plata total” con relación a sus correspondientes pares procedentes del coloide N°1, lo cual si se cumplió para los compositos 6, 14 y 19 con reducciones del 48, 46 y 47%, respectivamente, pero el composito 10 solo presentó una reducción del 22%. Note que dichos porcentajes de reducción fueron similares a los obtenidos para los valores de ZI (en mm), en los casos que involucraron a los compositos 6, 14 y 19 contra *S. aureus*, los cuales fueron: 50, 44 y 44%, respectivamente; mientras que el porcentaje de reducción del valor ZI para el composito 10 (respecto al composito 9) fue de 14%, el cual

es mucho menor que la reducción del 22% experimentada en el “porcentaje de liberación de plata total”.

A diferencia del caso de *S. aureus*, en los ensayos con *E. coli*, los porcentajes de reducción de los valores ZI fueron menores (27, 23 y 37% para compositos 6, 14 y 19, respectivamente) que los obtenidos para los “porcentajes de liberación de plata total”. Con base en el resultado anterior y asumiendo que las concentraciones finales de plata total ( $\text{Ag}^0 + \text{Ag}^+ = \text{Ag}$ ) liberada por los compositos en los pozos de las placas de agar son proporcionales a las concentraciones que éstos generarían en agua UP (las cuales pueden ser estimadas de sus porcentajes de plata liberada en agua UP, registrados en la Tabla 7), se puede inferir que *E. coli* es más propenso que *S. aureus* a sufrir los efectos antibacterianos de la plata total ( $\text{Ag}^0 + \text{Ag}^+$ ) liberada por los compositos, ya que reducciones cercanas al 50% en las concentraciones de plata total, aunque disminuyen el diámetro de los halos de inhibición para ambas bacterias, los reducen de forma más pronunciada para *S. aureus*. El análisis previo coincide con los resultados obtenidos por Feng y colaboradores [112], quienes evidenciaron cambios morfológicos más leves en *S. aureus*, en comparación con *E. coli*, cuando fueron tratados con 10 ppm de  $\text{AgNO}_3$  (6.4 ppm  $\text{Ag}^+$ ), lo que fue atribuido a un probable sistema de defensa de *S. aureus* contra los efectos inhibitorios de los iones de plata. Dicho sistema de defensa se fundamenta en el hecho de que las bacterias Gram-positivas, tales como *S. aureus*, tienen una pared celular compuesta por una capa de peptidoglicanos mucho más gruesa que la presente en la pared celular de una bacteria Gram-negativa como *E. coli* [112]. La pared celular más gruesa de *S. aureus* respecto a *E. coli*, tiene una inmensa importancia práctica en la protección celular frente a la penetración de iones plata y nanopartículas de plata en el citoplasma bacteriano.

### ***Recuento de bacterias viables***

Con el objetivo de cuantificar la proporción de células que permanecieron vivas después de tratar cultivos de *E. coli* y *S. aureus* (durante 24 y 48 horas) con los compositos hidrogel-nanoplatina, se evaluó la actividad antibacteriana de estos últimos mediante el método de recuento estándar en placa y los resultados se registraron en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Recuento estándar en placa de bacterias *E. coli* y *S. aureus* cultivadas previamente en caldo TS y expuestas durante 24 y 48 horas a 10 mg de muestra por mililitro de cultivo. El número de bacterias viables de *E. coli* en el tiempo cero de contacto para todas las muestras evaluadas fue igual a  $5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. En el caso de las bacterias *S. aureus* fue de  $2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Muestra	Ag (%) liberada en agua	<i>E. coli</i> (UFC mL <sup>-1</sup> )		<i>S. aureus</i> (UFC mL <sup>-1</sup> )	
		24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Composito 5	2.47±0.17	0	0	$1.6 \times 10^4$	$8.5 \times 10^4$
Composito 6	1.28±0.18	0	0	$5.8 \times 10^7$	$7.5 \times 10^9$
Hidrogel 7	0	$>5 \times 10^7$	$6 \times 10^8$	$2.3 \times 10^9$	$3.8 \times 10^{11}$
Composito 9	0.89±0.17	0	0	$3.9 \times 10^7$	$4.2 \times 10^9$
Composito 10	0.69±0.03	0	0	$5.9 \times 10^7$	$1.9 \times 10^9$
Hidrogel 11	0	$>5 \times 10^7$	$4 \times 10^8$	$1.3 \times 10^9$	$2.4 \times 10^{11}$
Composito 13	1.29±0.01	0	0	$7.3 \times 10^7$	$2.3 \times 10^9$
Composito 14	0.70±0.05	0	0	$7.3 \times 10^7$	$1.9 \times 10^{10}$
Hidrogel 15	0	$>5 \times 10^7$	$8.7 \times 10^8$	$2.8 \times 10^9$	$3.1 \times 10^{11}$
Composito 18	1.05±0.02	0	0	$6.8 \times 10^7$	$3.5 \times 10^9$
Composito 19	0.56±0.16	0	$1.9 \times 10^4$	$6.0 \times 10^7$	$2.3 \times 10^{10}$
Hidrogel 22	0	$>5 \times 10^7$	$1.2 \times 10^{10}$	$4.3 \times 10^9$	$2.2 \times 10^{11}$
108 ppm (Ag <sup>+</sup> )	No aplica	0	0	$8.3 \times 10^8$	$3.1 \times 10^{11}$
5720 ppm (Ag <sup>+</sup> )	No aplica	0	0	$6.7 \times 10^1$	$1.5 \times 10^3$

De acuerdo a los resultados obtenidos para *E. coli*, los 10 mg de todos los compositos, con excepción del 19, y los 100 µL de ambas soluciones de plata iónica, eliminaron completamente las  $5 \times 10^7$  bacterias viables suspendidas en 1 mL de TSB, después de permanecer en contacto con las bacterias durante 24 y 48 horas. Esto último se dedujo de la ausencia de colonias bacterianas en las 8 zonas de las placas de agar correspondientes a las diluciones de los respectivos cultivos tratados con las muestras en cuestión. Entre todos los compositos hidrogel-nanoplatea evaluados, el composito 19 fue el único que NO eliminó la totalidad de las bacterias, ya que a pesar de no encontrarse colonias en la placa de agar procedente del experimento realizado con 24 horas de tiempo de contacto, si hubo crecimiento bacteriano en la placa de agar del experimento de las 48 horas de contacto, donde se estimaron  $1.9 \times 10^4$  bacterias viables por mililitro. Esto indica una posible generación de resistencia a la plata por parte de estas bacterias, debido a la baja cantidad de plata liberada por el composito 19 al medio de cultivo. El grupo de Atiyeh y colaboradores afirma que niveles bactericidas de plata no producen resistencia, pero concentraciones de plata (Ag<sup>+</sup>) menores que la



concentración mínima inhibitoria (2-4 ppm  $\text{Ag}^+$ ) pueden inducir el desarrollo de la resistencia. Las células resistentes parecen generar permeabilidad parcial a la plata en combinación con un mecanismo mejorado de bombeo que expulsa la plata fuera de la célula [113].

Los resultados del recuento estándar en placa para el cultivo de *S. aureus* señalan al composito 5 como el único tratamiento con propiedades antibacterianas, ya que la población de células viables después de 24 y 48 horas de tratamiento fue 125 y 24 veces menor que la población de partida, respectivamente. Este hecho sugiere que la parte de la población que resistió los efectos nocivos de la plata durante las primeras 24 horas, es capaz de multiplicarse posteriormente debido al desarrollo de algún mecanismo de resistencia bacteriana a la plata. Los demás compositos evaluados permitieron el crecimiento de la población bacteriana entre 20 y 37 veces su tamaño original, cuando estuvieron 24 horas en contacto con los cultivos de *S. aureus*, y entre 950 y 11000 veces su tamaño original cuando estuvieron en contacto por 48 horas.

Al comparar los resultados del recuento estándar en placa entre cultivos de *S. aureus* y *E. coli* tratados con un mismo tipo de composito, se puede inferir que *E. coli* es más propenso que *S. aureus* a sufrir los efectos antibacterianos de la plata total ( $\text{Ag}^0 + \text{Ag}^+$ ) liberada por los compositos, y ésta es la misma conclusión a la que se llegó previamente con los resultados del método de pozos en agar (halos de difusión); por lo tanto, toma fuerza la hipótesis que atribuye a la gruesa capa de peptidoglicanos en la pared celular de *S. aureus*, la capacidad de desarrollar resistencia a la plata, en contraste con la delgada capa de *E. coli* que no la protege suficientemente de la plata [112]. El hecho de que todos los compositos hayan generado halos de inhibición del crecimiento para *S. aureus* en los ensayos de pozos en agar y que por el contrario, en los ensayos de recuento estándar en placa todos los compositos permitieran el crecimiento de esta bacteria (con excepción del composito 5), puede ser explicado por una combinación de tres posibles causas: i) la mayor relación “masa de composito a volumen de medio líquido” en el ensayo de pozos en agar (2.5 mg en 0.15 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , frente a 10 mg en 1 mL de MEM) la cual permitió alcanzar, por lo menos, la concentración mínima de plata total capaz de generar un efecto bactericida en *S. aureus*, ii) por la insuficiente concentración de plata total alcanzada en el ensayo de recuento estándar en placa, lo cual se infiere de su relación “masa de composito a volumen de medio líquido” que es un 40% menor respecto a la



del ensayo de pozos en agar y iii) el mecanismo de protección celular de *S. aureus* contra la plata mencionado previamente, funciona mejor en los niveles de concentración de plata alcanzados en el ensayo de recuento estándar en placa. Además, se puede deducir que *E. coli* tiene una concentración mínima inhibitoria mucho menor que la de *S. aureus* para la plata total ( $\text{Ag}^0 + \text{Ag}^+$ ) liberada por los compositos preparados, y por ello esta bacteria Gram-negativa no creció en ninguno de los dos bioensayos antibacterianos.

Por último, las 4 muestras sólidas sin plata (hidrogeles 7, 11, 15 y 22) NO eliminaron bacterias ni en el cultivo de *E. coli* ni en el de *S. aureus* y por el contrario, permitieron el aumento de su población después de 24 y 48 horas de tratamiento, respecto a las poblaciones de partida. Además, en el caso de los cultivos de *S. aureus* tratados durante 24 horas con los 4 hidrogeles, el número de células viables fue entre 22 y 72 veces mayor que en los cultivos de *S. aureus* tratados con los compositos derivados de estos hidrogeles, lo que indica cierto grado de reducción en la velocidad de crecimiento bacteriano ejercido por los compositos sobre *S. aureus*. Cabe destacar que en el caso de los cultivos de *E. coli* tratados durante 24 horas con los hidrogeles, solo se evaluaron las primeras 5 diluciones seriadas en lugar de 8, y aunque estas diluciones generaron una alta densidad de colonias imposibles de contar, si fue posible visualizar comparativamente el gran aumento de la población de bacterias respecto al valor inicial de  $5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Esto indica claramente que los 4 hidrogeles sin plata, no presentan actividad antibacteriana. Lo anterior fue confirmado con los resultados del experimento de las 48 horas de contacto, donde los hidrogeles generaron poblaciones mucho mayores que las correspondientes a 24 horas de tratamiento.

### ***Relación entre el porcentaje de plata liberada y la naturaleza química de las unidades monoméricas en los compositos***

La tendencia en el comportamiento de absorción observada entre hidrogeles (o compositos) poli[VP-co-AMPSNa] y poli[AAm-co-AMPSNa] con igual porcentaje de entrecruzador cuando se sumergieron en agua UP (ver Figura 3.19), también fue observada cuando se sumergieron en los coloides de plata durante la preparación de los compositos (ver Tabla 5). Aunque las cantidades de agua y de coloide absorbidas por estos hidrogeles entre un experimento y otro, no fueron exactamente iguales (debido a que se utilizaron procedimientos

de medición distintos), se evidenció que los hidrogeles poli[AAm-*co*-AMPSNa] absorben menor cantidad del “medio de inmersión” que los poli[VP-*co*-AMPSNa]. La causa de esta diferencia se explicó previamente en la sección 3.3.4 para el caso del agua y es igual de válida para el caso del coloide, ya que ambos medios de inmersión tienen pH casi iguales y la concentración total de sales es muy baja ( $< 2$  mM) en este último. La diferencia se atribuye a la presencia de los grupos amídicos laterales de la acrilamida que aumentan el número de enlaces de hidrógeno intra- e inter-catenarios en su matriz polimérica entrecruzada (las interacciones entre grupos amídicos laterales pueden ser de los siguientes tipos: acrilamida-acrilamida, acrilamida-AMPSNa y AMPSNa-AMPSNa), confiriéndole mayor resistencia a la relajación de las cadenas poliméricas en presencia de medios acuosos y por lo tanto se disminuye la absorción de componentes del medio [100]. Esta clase de enlaces de hidrógeno también está presente en los hidrogeles del tipo poli[VP-*co*-AMPSNa] pero en menor número, debido a la ausencia de hidrógeno y un mayor impedimento estérico en el grupo amídico de la unidad monomérica VP. Adicionalmente, la menor fracción molar de AMPSNa en los hidrogeles del tipo poli[AAm-*co*-AMPSNa] frente a los del tipo poli[VP-*co*-AMPSNa] (0.45 versus 0.58), implica una disminución de las repulsiones electrostáticas entre los grupos sulfonato ionizables de los primeros, lo que dificulta aún más la expansión de dicha red polimérica cuando está en contacto con el coloide. En consecuencia, una menor cantidad de NPsAg e iones  $Ag^+$  se difunden hacia el interior de los hidrogeles del tipo poli[AAm-*co*-AMPSNa] en comparación con los del tipo poli[VP-*co*-AMPSNa], para un mismo porcentaje de entrecruzador y coloide de procedencia. Los porcentajes de plata total liberada en medio acuoso por dichos compositos, mostraron las mismas diferencias sugeridas anteriormente con relación a las cantidades de NPsAg e iones  $Ag^+$  incorporadas por sus hidrogeles de procedencia. Los resultados registrados en la Tabla 7 confirmaron esto último, para el caso de los pares de compositos: 5, 13; 6, 14 y 10, 19. El par de compositos 9 y 18, mostraron porcentajes de liberación de plata similares, aunque ligeramente superior para el 18 (0.89% versus 1.05%).

En la sección 3.3.1 se demostró que las NPsAg estabilizadas con citrato forman enlaces de hidrógeno con los grupos amídicos de todos los compositos preparados, pero según las explicaciones previas, en el interior de los sistemas poliméricos que contienen acrilamida es mayor el porcentaje de grupos amídicos que forman enlaces de hidrógeno intra- e inter-

catenarios. Por lo tanto, existe un menor número de grupos amídicos disponibles para interactuar con las NPsAg. Debido a la misma razón anterior, y considerando que los iones plata pueden formar complejos de coordinación polímero-metal con grupos funcionales como  $-\text{CONH}_2$  o  $-\text{C}=\text{O}$  [104], el número de interacciones de este tipo también sería menor que en los compositos que contienen VP. Otro tipo de interacción que existiría en menor cantidad, es la atracción electrostática entre los iones plata y los grupos sulfonato de la red polimérica, lo cual está asociado con la menor fracción molar de AMPSNa en los hidrogeles del tipo poli[AAm-*co*-AMPSNa] frente a los del tipo poli[VP-*co*-AMPSNa].

Por otro lado, en la sección 3.4 se comentó que los compositos 13 y 14, a pesar de exhibir menor grado de entrecruzamiento y de haber absorbido el doble de volumen de coloide durante su preparación, que los compositos 18 y 19 respectivamente (ver Tabla 5), produjeron valores de porcentaje de liberación de plata total (NPsAg +  $\text{Ag}^+$ ) cercanos a estos últimos (1.29% y 1.05%, para 13 y 18; 0.70 y 0.56, para 14 y 19) (ver Tabla 7), teniendo en cuenta que todas las muestras presentaron tamaños de partícula homogéneos, ya que fueron previamente molidas y fraccionadas entre 100 y 250  $\mu\text{m}$  mediante tamizado. Una posible interpretación del anterior resultado se basa en que los grupos funcionales de los hidrogeles del tipo poli[AAm-*co*-AMPSNa] ubicados en zonas profundas del material, tienen más impedimentos para interactuar con las NPsAg e iones plata (por las fuertes interacciones intra e inter catenarias entre sus grupos funcionales, según lo expuesto en párrafos anteriores) que aquellos ubicados en la superficie y subcapas más externas; y por lo tanto, es más probable que estas zonas externas alojen a una mayor fracción de ambas especies químicas de plata, durante la preparación de los respectivos compositos; aunque los iones plata son mucho más pequeños que las NPsAg y pueden difundirse más fácilmente hasta zonas más internas del composito. Según el análisis anterior, la cantidad de NPsAg y plata iónica que puede incorporarse en los hidrogeles que contienen acrilamida depende en gran medida de su área superficial, y aunque también depende de su densidad de entrecruzamiento, este factor no sería determinante en el proceso.

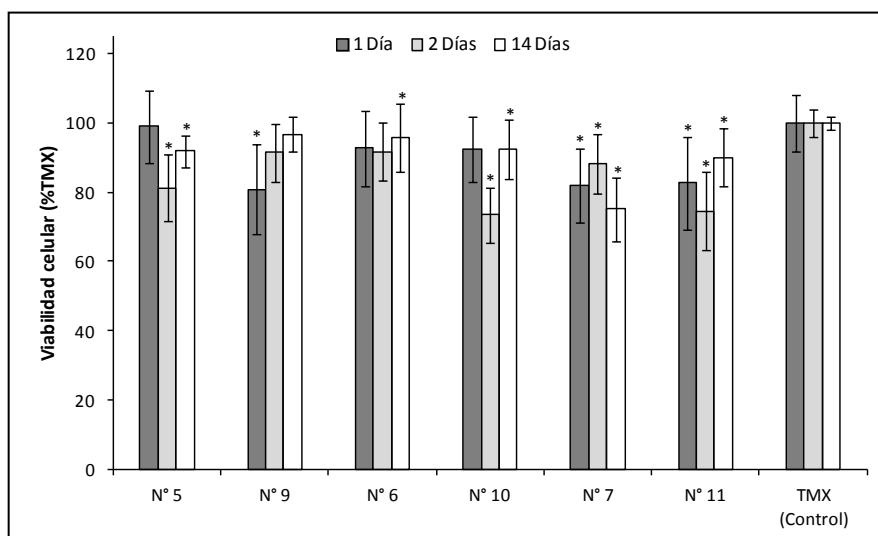
A diferencia del caso anterior, los hidrogeles que contienen VP presentan una considerable reducción de enlaces de hidrógeno inter e intracatenarios, por lo que experimentan mayor relajación de las cadenas poliméricas y por ende, un mayor contenido de agua, iones plata y

NPsAg, pueden ingresar al hidrogel por difusión desde el coloide. En este caso, la cantidad de plata total incorporada se ve limitada drásticamente por el aumento del grado de entrecruzamiento (y por lo tanto, por el hinchamiento del hidrogel) como se constata a partir de los valores de porcentaje de liberación de plata registrados en la Tabla 7 para los dos pares de compositos: 5 (2.47%), 9 (0.89%) y 6 (1.28%), 10 (0.69%), donde la concentración de agente entrecruzante para los primeros elementos de cada par es de 3 mol% y para los segundos, es de 6 mol%. Por ello, es probable que los compositos del tipo poli[VP-co-AMPSNa] presenten una distribución más uniforme de las NPsAg e iones plata, tanto en el exterior como en el interior de la matriz polimérica y también, una interacción más fuerte entre las especies químicas de plata y la matriz polimérica.

Además de las interacciones mencionadas previamente entre la nanoplata y los sistemas poliméricos en estudio, algunos investigadores afirman que los grupos carbonilo de polímeros como el poli[metilmetacrilato-co-AMPSH] interactúan a través del átomo de oxígeno, con una parte de la nube electrónica de los átomos de plata superficiales de las NPsAg [114]; y en el caso de copolímeros (y homopolímero) del VP, la interacción entre éstos y la nanoplata, no solo involucra el oxígeno del carbonilo, sino también el nitrógeno y carbono del carbonilo del grupo pirrolidona, a través del efecto de conjugación p- $\pi$  [115]. También se ha informado que la atracción electrostática entre los iones plata y los grupos sulfonato de copolímeros (y homopolímero) del AMPS<sup>-</sup>, es más débil que la experimentada con iones metálicos divalentes [116].

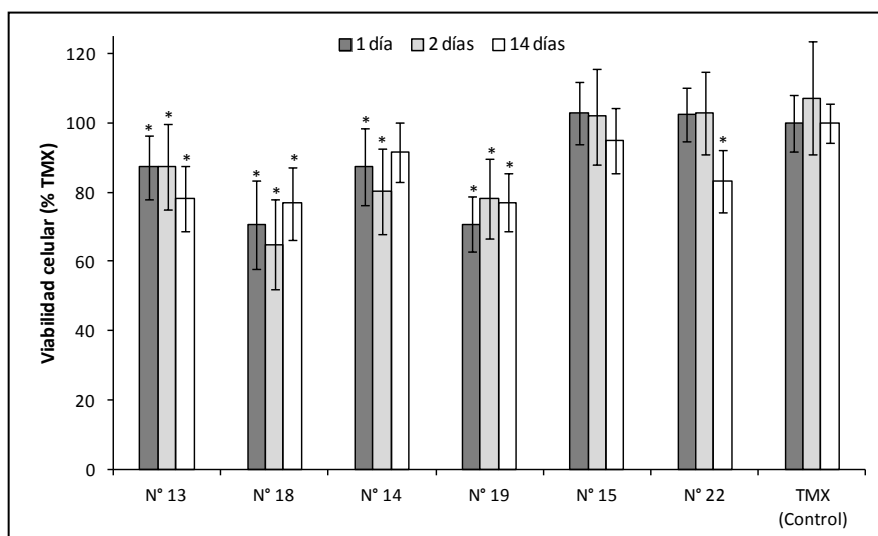
### 3.5 Citotoxicidad de los compositos

Los resultados obtenidos de los ensayos de citotoxicidad (ver Figuras 3.25 y 3.26) y actividad antibacteriana (ver Figuras 3.21 y 3.24) de los compositos, concuerdan con la hipótesis planteada anteriormente sobre la distribución de las NPsAg en los compositos y su relación con los porcentajes de plata liberada (en medio acuoso).



**Figura 3.25.** Porcentajes de viabilidad celular respecto al TMX generados por los extractos (en medio MEM) de los composites hidrogel-NPsAg del tipo poli[VP-co-AMPSNa] preparados con el coloide N°1 (5 y 9), coloide N°2 (6 y 10) y sus respectivos hidrogeles de procedencia (7 y 11), sobre fibroblastos embrionarios humanos. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (n=8) y las diferencias significativas obtenidas con ANOVA frente a TMX (\*:  $p < 0.05$ ).

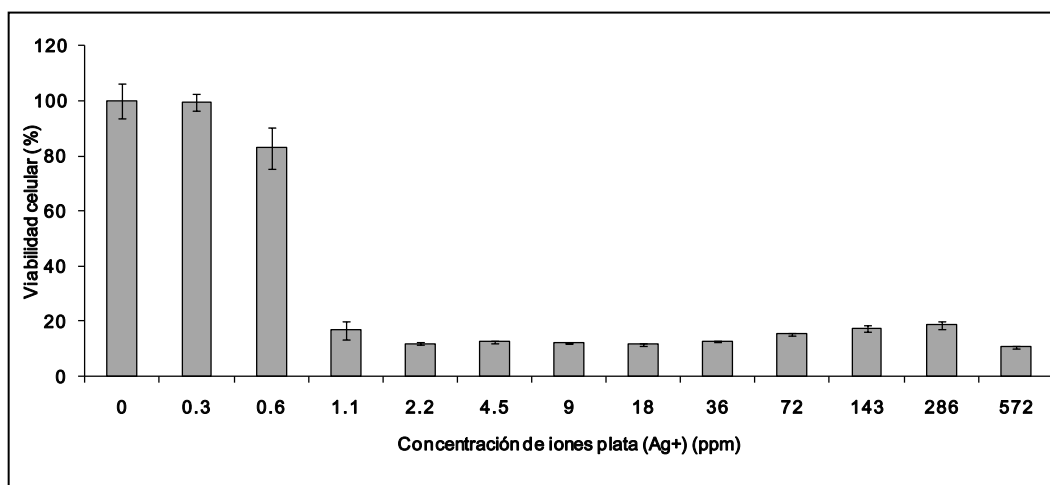
Nótese que la viabilidad celular de los pares de composites 13, 18 y 14, 19 (ver Figura 3.26) es ligeramente menor que la de los pares de composites 5, 9 y 6, 10 (ver Figura 3.25), debido a que las NPsAg e iones  $Ag^+$  se encuentran distribuidos mayoritariamente en su superficie y más débilmente unidos a la red polimérica (como se mencionó antes), conduciendo a una liberación rápida y masiva de las NPs y/o iones  $Ag^+$  (fenómeno conocido como “liberación explosiva”) que incrementan la citotoxicidad [117] sobre el cultivo de fibroblastos. Por el contrario, la viabilidad celular de los pares de composites 5, 9 y 6, 10 se acerca a la registrada para el control negativo (TMX) indicando una liberación de NPsAg e iones  $Ag^+$  (y todos los potenciales componentes liberados) posiblemente más lenta y sostenida en comparación con los pares de composites 13, 18 y 14, 19, debido a su unión más fuerte con la matriz polimérica y distribución más uniforme en la misma [117] y en consecuencia, no causaron daños considerables a la integridad celular de los fibroblastos.



**Figura 3.26.** Porcentajes de viabilidad celular respecto al TMX generados por los extractos (en medio MEM) de los compositos hidrogel-NPsAg del tipo poli[AAM-co-AMPSNa] preparados con el coloide N°1 (13 y 18), coloide N°2 (14 y 19) y sus respectivos hidrogeles de procedencia (15 y 22), sobre fibroblastos embrionarios humanos. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media (n=8) y las diferencias significativas obtenidas con ANOVA frente a TMX (\*:  $p < 0.05$ ).

Por otro lado, los valores de viabilidad celular de los pares de compositos 5, 6 y 9, 10 son ligeramente mayores que los generados por sus respectivos hidrogeles de procedencia (7 y 11) (Figura 3.25), lo cual puede ser explicado por una combinación de dos causas probables: i) la presencia en los hidrogeles de una cantidad residual de monómeros, los cuales son tóxicos [118] y ii) la presencia de aniones citrato en los compositos, que de acuerdo a estudios histopatológicos en pacientes con heridas, promueven el crecimiento de fibroblastos y al mismo tiempo son antibacterianos [119].

En el caso de los pares de compositos 13, 14 y 18, 19 (ver Figura 3.26) el efecto benéfico del citrato es inhibido por el fenómeno de “liberación explosiva” de componentes, mencionado anteriormente y por ello, sus valores de viabilidad celular son menores que los de sus respectivos hidrogeles de procedencia (15 y 22). Note que los valores de viabilidad celular para los hidrogeles 15 y 22 son muy similares al registrado por el control negativo (TMX), demostrando que los hidrogeles no liberan componentes citotóxicos.



**Figura 3.27.** Porcentajes de viabilidad celular generados por disoluciones seriadas de  $\text{AgNO}_3$  sobre fibroblastos humanos. Las concentraciones de las disoluciones de  $\text{AgNO}_3$  se expresan en función del ión plata. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Las concentraciones finales de plata total ( $\text{Ag}^0 + \text{Ag}^+ = \text{Ag}$ ) en los cultivos de fibroblastos fueron estimadas, asumiendo previamente que los porcentajes de plata liberada por los compositos en medio de cultivo (MEM) son iguales a los obtenidos en agua ultrapura (ver Tabla 7). Las concentraciones estimadas para los compositos 5, 6, 9, 10, 13, 14, 18 y 19, fueron: 24.7, 12.8, 8.9, 6.9, 12.9, 7.0, 10.5 y 5.6 ppm, respectivamente; luego fueron comparados los valores de viabilidad celular generados por estos tratamientos frente a los generados por disoluciones seriadas de  $\text{AgNO}_3$  de concentraciones similares, preparadas como control positivo (ver Figura 3.27).

Los resultados de esta comparación indican que: los extractos tomados a distintos días (día: 1, 2 y 14) para todos los compositos, generan poblaciones de células viables entre 5 y 8 veces más grandes que las generadas por diluciones de nitrato de plata con similares concentraciones de plata total. Esto significa que en el rango de concentraciones de plata (total) evaluado, mezclas acuosas de  $\text{NPsAg}$  y plata iónica (extractos de los compositos) con las mismas concentraciones de plata que soluciones control de  $\text{AgNO}_3$ , son menos tóxicas para los fibroblastos.



## Conclusiones y Perspectivas

### Conclusiones

Se obtuvieron hidrogeles entrecruzados del tipo poli[VP-*co*-AMPSNa] y poli[AAM-*co*-AMPSNa] por polimerización radicalaria en medio acuoso de los respectivos monómeros. La identidad y pureza de los hidrogeles fue confirmada mediante las técnicas ATR-FTIR y <sup>1</sup>H-RMN en estado sólido.

Debido a que el producto de las relaciones de reactividad en ambos sistemas copoliméricos tiende a cero, se puede deducir que siguen copolimerizaciones “moderadamente alternantes”. Este comportamiento es más marcado en el sistema VP:AMPSNa, ya que ambos monómeros tienen relaciones de reactividad menores que la unidad. Mientras que en el sistema AAm:AMPSNa, las secuencias de monómeros en la cadena polimérica creciente son ligeramente más ricas en AAm, como lo indican sus valores de relaciones de reactividad ( $r_{AAm} = 1.1$  y  $r_{AMPS} = 0.16$ ).

Las NPsAg obtenidas presentan una alta tendencia a mantener su tamaño nanométrico inicial en fase acuosa sin formar agregados (durante más de 6 meses), principalmente por causa del efecto estabilizante de las moléculas de citrato que cubren su superficie. Los rendimientos de la conversión de plata iónica a NPsAg son cercanos al 25%.

Las distribuciones de tamaños de las NPsAg en las dispersiones coloidales obtenidas (coloide N°1 y N°2) presentan una forma bimodal con una gran población de partículas menores de 10 nm, que corresponden a más de 50% del total de nanopartículas presentes.

Se logró la incorporación de NPsAg e iones plata en los hidrogeles entrecruzados poli[VP-*co*-AMPSNa] y poli[AAM-*co*-AMPSNa] mediante la inmersión de cada hidrogel en los coloides de plata preparados, con excepción del compuesto 19, en el que solo se detectó plata iónica. Esto fue demostrado mediante imágenes SEM, análisis EDS y el ensayo de liberación de plata total de cada uno de los compositos.

La comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en estado sólido de los compositos hidrogel-NPsAg y sus respectivos hidrogeles de procedencia, muestra un aumento en la intensidad de la señal de los protones amídicos en los primeros respecto a los últimos. La explicación más probable es la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilo de las moléculas de citrato que cubren la superficie de las NPsAg y los “grupos amido laterales” de la cadena principal del copolímero. Al formarse dichos enlaces de hidrógeno, se reduce el intercambio de protones amídicos con el agua deuterada, lo que se manifiesta con una señal más intensa en el espectro de los compositos.

Los compositos con menor contenido de entrecruzador, liberan en medio acuoso un mayor porcentaje de plata total que aquellos con mayor contenido de entrecruzador, para un mismo coloide de origen, composición y tipo de monómeros.

Los compositos preparados con el coloide de mayor concentración de plata total, liberan en medio acuoso un mayor porcentaje de plata total que los preparados con el coloide de menor concentración, para un mismo porcentaje de entrecruzador, composición y tipo de monómeros.

Los compositos del tipo poli[VP-co-AMPSNa] tienden a liberar en medio acuoso un mayor porcentaje de plata total en comparación con los del tipo poli[AAm-co-AMPSNa], para un mismo porcentaje de entrecruzador y coloide de procedencia.

Todos los compositos hidrogel-NPsAg preparados muestran actividad antibacteriana *in vitro* contra *E. coli* y *S. aureus*, pero son más efectivos contra *E. coli*. Mientras que sus respectivos hidrogeles de procedencia sin nanoplata, no presentan actividad antibacteriana

El estudio de citotoxicidad *in vitro* sobre fibroblastos humanos indica valores de viabilidad celular mayores del 70% para todos los compositos, aunque se evidencia una mayor citotoxicidad para los compositos del tipo poli[AAm-co-AMPSNa] en comparación con los del tipo poli[VP-co-AMPSNa], cuyos valores fueron más cercanos al control negativo.

Los cultivos de fibroblastos humanos tratados con extractos de los compositos constituidos por mezclas de NPsAg y plata iónica, sufren mucho menos daño citotóxico que similares

concentraciones de plata total proveniente exclusivamente de plata iónica ( $\text{AgNO}_3$ ), en el rango de concentraciones de plata evaluado.

Entre los ocho compositos preparados, el composito 5, procedente del hidrogel poli[VP-co-AMPSNa] y sintetizado con una relación molar 1:1 de monómeros en la alimentación y 3 mol% de entrecruzador, presenta la mayor capacidad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus* y también es el menos citotóxico sobre cultivos de fibroblastos humanos, generando porcentajes de viabilidad celular superiores al 80%. Estos resultados son muy prometedores de cara al posible uso del composito 5 como apósito (en polvo) para el tratamiento de heridas profundas y exudativas.

### **Perspectivas**

Algunos aspectos que pueden ser estudiados en trabajos futuros, considerando los resultados de la presente tesis, son:

Evaluar en animales y/o humanos (sistemas *in vivo*) la actividad antibacteriana y citotoxicidad de al menos dos de los mejores compositos preparados en esta investigación. Ampliar la batería de bioensayos *in vitro* a otros microorganismos patógenos e incluir ensayos de genotoxicidad.

En caso de comprobar la efectividad *in vivo* de los compositos, realizar la síntesis de los hidrogeles mediante el método de polimerización en fase inversa, para obtener microesferas de hidrogel en lugar de gránulos con forma irregular y así, hacer más atractivo a la vista el composito hidrogel-nanoplatea final, con miras a su potencial comercialización. Sin embargo, una dificultad del método de síntesis de fase inversa, es que utiliza solventes orgánicos y surfactantes difíciles de eliminar de la matriz polimérica, que podrían atribuirle efectos citotóxicos al producto final.

Respecto a la síntesis de los hidrogeles, sería importante estudiar la incorporación de arcillas en la mezcla inicial de reacción para evitar la tendencia a la fragmentación en el producto final y poderlo utilizar además de su presentación granulada, en una presentación laminar.]

---

**Referencias Bibliográficas**

- [1] T. Tolaymat, A. El Badawy, A. Genaidy and K. Scheckel, *Science of the Total Environment*, vol. 408, pp. 999-1006, 2010.
- [2] A. El-Badawy, D. Feldhake and R. Venkatapathy, Scientific, Technical, Research, Engineering and Modeling Support Final Report. State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More, Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency. Office of Research and Development, 2010, p. 34.
- [3] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. Tapia Ramírez and M. J. Yacaman, *Nanotechnology*, vol. 16, pp. 2346-2353, 2005.
- [4] M. Monge, *Anales de Química*, vol. 105, p. 33-41, 2009.
- [5] C. N. Lok, C. M. Ho, R. Chen, Q. Y. He, W. Y. Yu, H. Sun, P. K. H. Tam, J. F. Chiu and C. M. Che, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 12, p. 527, 2007.
- [6] P. Dallas, V. K. Sharma and R. Zboril, *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 166, p. 119, 2011.
- [7] S. Wijnhoven, W. Peijnenburg, C. Herberts, W. Hagens, A. Oomen, E. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. van de Meent, S. Dekkers, W. de Jong, M. van Zijverden, A. Sips and R. Geertsma, *Nanotoxicology*, vol. 3, pp. 109-138, 2009.
- [8] Y. A. Krutyakov, Y. A. Kudrinskiy, A. Y. Olenin and G. V. Lisichkin, *Russian Chemical Reviews*, vol. 77, pp. 233-257, 2008.
- [9] Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim and S. E. Skrabalak, *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 40, pp. 60-103, 2008.
- [10] H. Liang, W. Wang, Y. Huang, S. Zhang, H. Wei and H. Xu, *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 114, pp. 7427-7431, 2010.
- [11] Ace Learning Company, Inc., "Learning Ace," 05 12 2011. [Online]. Available: [http://www.learningace.com/doc/1005962/b08e974f9eb0821b24df7dfe1760654c/dallas\\_2006\\_habib\\_anand](http://www.learningace.com/doc/1005962/b08e974f9eb0821b24df7dfe1760654c/dallas_2006_habib_anand). [Accessed 24 09 2013].
- [12] Y. Xiong, I. Washio, J. Chen, H. Cai, Z.-Y. Li and Y. Xia, *Langmuir*, vol. 22, pp. 8563-8570, 2006.

- [13] C. N. Lok, C. M. Ho, R. Chen, Q. Y. He, W. Y. Yu, H. Sun, P. K. H. Tam, J. F. Chiu and C. M. Che, *Journal of Proteome Research*, vol. 5, p. 916, 2006.
- [14] P. V. AshaRani, G. L. K. Mun, M. P. Hande and S. Valiyaveetil, *ACS Nano*, vol. 3, no. 2, pp. 279-290, 2009.
- [15] O. Choi and Z. Hu, *Environmental Science & Technology*, vol. 42, pp. 4583-4588, 2008.
- [16] V. Alt, T. Bechert, P. Steinrucke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann and R. Schnettler, *Biomaterials*, vol. 25, pp. 4383-4391, 2004.
- [17] R. E. Burrell, J. P. Heggors, G. J. Davis and J. B. Wright, *Wounds*, vol. 11, p. 6471, 1999.
- [18] H. Q. Yin, R. Langford and R. E. Burrell, *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, vol. 20, pp. 195-200, 1999.
- [19] S. L. Percival, P. G. Bowler and J. Dolman, *International Wound Journal*, vol. 4, pp. 186-191, 2007.
- [20] J. B. Wright, K. Lam and R. E. Burrell, *American Journal of Infection Control*, vol. 26, pp. 572-577, 1998.
- [21] A. R. Shahverdi, A. Fakhimi, H. R. Shahverdi and S. Minaian, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 3, pp. 168-171, 2007.
- [22] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Y. Hwang, Y. K. Kim, Y. S. Lee, D. H. Jeong and M. H. Cho, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 3, pp. 95-101, 2007.
- [23] M. Gajbhiye, J. Kesharwani, I. Ingle, A. Gade and M. Rai, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 5, pp. 382-386, 2009.
- [24] R. W.-Y. Sun, R. Chen, N. P.-Y. Chung, C. M. Ho, C. L. S. Lin and C. M. Che, *Chemical Communications*, pp. 5059-5051, 2005.
- [25] J. Tian, K. K. Y. Wong, C. M. Ho, C. N. Lok, W. Y. Yu, C. Che, J. F. Chiu and P. K. H. Tam, *ChemMedChem*, vol. 2, pp. 129-136, 2007.
- [26] Y. Min, M. Akulut, K. Kristairsen, Y. Golan and J. Israelachvili, *Nature Materials*, vol. 7, pp. 527-538, 2008.

- [27] S. Rifai, C. A. Breen, D. J. Solis and T. M. Swager, *Chemistry of Materials*, vol. 18, p. 21, 2006.
- [28] M. Brust and C. J. Kiely, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 202, pp. 175-186, 2002.
- [29] M. M. Oliveira, D. Ugarte, D. Zanchet and A. J. G. Zarbin, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 292, pp. 429-435, 2005.
- [30] C. A. Bauer, F. Stellacci and J. W. Perry, *Topics in Catalysis*, vol. 47, pp. 32-41, 2008.
- [31] M. Yamamoto and M. Nakamoto, *Journal of Materials Chemistry*, vol. 13, pp. 2064-2065, 2003.
- [32] Y. Kashiwagi, M. Yamamoto and M. Nakamoto, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 300, pp. 169-175, 2006.
- [33] M. Green, N. Allsop, G. Wakefield, P. J. Dobson and J. L. Hutchison, *Journal of Materials Chemistry*, vol. 12, pp. 2671-2674, 2002.
- [34] H. Hiramatsu and F. E. Osterloh, *Chemistry of Materials*, vol. 16, pp. 2509-2511, 2004.
- [35] S. Nath, S. Praharaj, S. Panigrahi, S. Kundu, S. K. Ghosh, S. Basu and T. Pal, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 274, pp. 145-149, 2006.
- [36] X. Sun, S. Dong and E. Wang, *Macromolecules*, vol. 37, pp. 7105-7108, 2004.
- [37] W. Lesniak, A. U. Bielinska, K. Sun, K. W. Janczak, X. Shi, J. R. Baker and L. P. Balogh, *Nano Letters*, vol. 5, pp. 2123-2130, 2005.
- [38] J. Zheng and R. M. Dickson, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, pp. 13982-13983, 2002.
- [39] R. Kumar and H. Münstedt, *Biomaterials*, vol. 26, p. 2081-2088, 2005.
- [40] N. Tsipouras, C. J. Rix and P. H. Brady, *Clinical Chemistry*, vol. 43, no. 2, pp. 290-301, 1997.
- [41] H. J. Klasen, *Burns*, vol. 26, pp. 117-130, 2000.
- [42] H. J. Klasen, *Burns*, vol. 26, pp. 131-138, 2000.
- [43] H. Yu, X. Xu, X. Chen, T. Lu, P. Zhang and X. Jing, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 103, pp. 125-133, 2007.

- [44] V. Thomas, Y. Murali Mohan, B. Sreedhar and S. K. Bajpai, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 111, p. 934–944, 2009.
- [45] I. Katime, O. Katime and D. Katime, *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, vol. 4, pp. 35-50, 2005.
- [46] Y. C. Nho and K. R. Park, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 85, pp. 1787-1794, 2002.
- [47] P. Saravanan, M. Padmanabha Raju and S. Alam, *Materials Chemistry and Physics*, vol. 103, pp. 278-282, 2007.
- [48] J. L. Drury and D. J. Mooney, *Biomaterials*, vol. 24, pp. 4337-4351, 2003.
- [49] P. Pérez, "Sistemas poliméricos inteligentes con entrecruzamiento biodegradable," Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2006.
- [50] W. Paul and C. Sharma, *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, vol. 18, pp. 18-23, 2004 .
- [51] J. Kim, J. Choi, J. Park, J. Kim, S. Jin, S. Chang, D. Li, M. R. Hwang, J. S. Woo, J. A. Kim, W. S. Lyoo, C. S. Yong and H. G. Choi, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 31, pp. 2277-82, 2008.
- [52] J. J. Castellano, S. M. Shafii, F. Ko, G. Donate, T. Wright, R. J. Mannari, W. G. Payne, D. J. Smith and M. C. Robson, *International Wound Journal*, vol. 4, pp. 114-122, 2007.
- [53] Y. M. Mohan, P. Premkumar, K. J. Lee and K. E. Geckeler, *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 27, pp. 1346-1354, 2006.
- [54] V. K. Sharma, R. A. Yngard and Y. Lin, *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 145, pp. 83-96, 2009.
- [55] V. Thomas, Y. Murali Mohan, B. Sreedhar and S. K. Bajpai, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 315, pp. 389-395, 2007.
- [56] X. D. Ma, X. F. Qian, J. Yin and Z. K. Zhu, *Journal of Materials Chemistry*, vol. 12, pp. 663-666, 2002.
- [57] K. Akamatsu, S. Ikeda and H. Nawafune, *Langmuir*, vol. 19, pp. 10366-10371, 2003.
- [58] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan and M. A. El-Sayed, *Chemical Reviews*, vol. 105, pp. 1025-1102, 2005.



- [59] B. L. Cushing, V. L. Koleschineko and C. J. O'Connor, *Chemical Reviews*, vol. 104, pp. 3893-3946, 2004.
- [60] D. D. Evanoff and G. Chumanov, *ChemPhysChem*, vol. 6, pp. 1221-1231, 2005.
- [61] K. J. Lee, Y. Lee, I. Shim, B. H. Jun, H. J. Cho and J. Joung, *Solid State Phenomena*, vol. 124, pp. 1189-1192, 2007.
- [62] C. Rigo, L. Ferroni, I. Tocco, M. Roman, I. Munivrana, C. Gardin, W. R. L. Cairns, V. Vindigni, B. Azzena, C. Barbante and B. Zavan, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, pp. 4817-4840, 2013.
- [63] K. Nalampang, N. Suebsanit, C. Witthayaprapakorn and R. Molloy, *Chiang Mai Journal of Science*, vol. 34, p. 183, 2007.
- [64] Ö. B. Üzüüm, S. Kundakci and E. Karadag, *Polymer Bulletin*, vol. 57, p. 703, 2006.
- [65] A. M. Parambil, Y. M. Puttaiahgowda and P. Shankarappa, *Turkish Journal of Chemistry*, vol. 36, p. 397, 2012.
- [66] L. M. Rodríguez-Lorenzo, R. García-Carrodeguas, M. A. Rodríguez, S. De Aza, J. Jiménez, A. López-Bravo, M. Fernández and J. San Román, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 88, p. 53, 2009.
- [67] N. Gatica, N. Fernández, A. Opazo and D. Radic, *Journal of the Chilean Chemical Society*, vol. 50, p. 581, 2005.
- [68] D. Saraydin, E. Koptagel, S. Unver-Saraydin, E. Karadag and O. Guven, *Journal of Materials Science*, vol. 36, p. 2473, 2001.
- [69] A. K. Bajpai, S. K. Shukla, S. Bhanu and S. Kankane, *Progress in Polymer Science*, vol. 33, p. 1088, 2008.
- [70] C. Elvira, J. F. Mano, J. San Román and R. L. Reis, *Biomaterials*, vol. 23, p. 1955, 2002.
- [71] V. F. Kurenkov and T. A. Zhelonkina, *Russian Journal of Applied Chemistry*, vol. 77, pp. 307-312, 2004.
- [72] L. García-Fernández, M. R. Aguilar, M. M. Fernández, R. M. Lozano, G. Giménez and J. San Román, *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 626-634, 2010.

- [73] J. Travas-Sejdic and A. Easteal, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 75, pp. 619-628, 2000.
- [74] Y. A. Aggour, *Polymer Degradation and Stability*, vol. 44, pp. 71-73, 1994.
- [75] M. Uygun, M. U. Kahveci, D. Odaci, S. Timur and Y. Yagci, *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 210, pp. 1867-1875, 2009.
- [76] H. Dong, D. Wang, G. Sun and J. P. Hinstroza, *Chemistry of Materials*, vol. 20, pp. 6627-6632, 2008.
- [77] M. R. Aguilar, A. Gallardo, M. M. Fernández and J. San Román, *Macromolecules*, vol. 35, pp. 2036-2041, 2002.
- [78] U. Riegel, M. Weismantel, V. Frenz, T. Daniel and F. Engelhardt, "Procedimiento para la reticulación adicional de hidrogeles con 2-oxotetrahydro-1,3-oxazinas". España Patent 2216617, 10 10 2001.
- [79] A. Brantner, Z. Males, S. Pepeljnjak and A. Antolic, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 52, pp. 119-122, 1996.
- [80] A. Kimiran-Erdem and N. O. Sanli-Yurudu, *IUFS Journal of Biology*, vol. 67, no. 2, pp. 115-122, 2008.
- [81] J. Ling, Y. Sang and C. Huang, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 47, p. 860-864, 2008.
- [82] C. Martínez and V. M. Coello, *Ciencia UANL*, vol. VIII, pp. 346-350, 2005.
- [83] J. Soukupova, L. Kvitek, M. Kratochvilova, A. Panacek, R. Prucek and R. Zboril, *Journal of Chemical Education*, vol. 87, pp. 1094-1097, 2010.
- [84] I. Malvern, Zetasizer Nano User Manual MAN0317, vol. Chapter 15, Malvern: Malvern Instruments Ltd., 2009, p. 1-12.
- [85] A. Henglein and M. Giersig, *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 103, pp. 9533-9539, 1999.
- [86] J. Kunze, I. Burgess, R. Nichols, C. Buess-Herman and J. Lipkowski, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 599, p. 147-159, 2007.
- [87] R. MacCuspie, K. Rogers, M. Patra, Z. Suo, A. J. Allen, M. N. Martin and V. A. Hackley, *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 13, pp. 1212-1226, 2011.

- [88] V. Filipe, A. Hawe and W. Jiskoot, *Pharmaceutical Research*, vol. 27, pp. 796-810, 2010.
- [89] D. Mahl, J. Diendorf, W. Meyer-Zaika and M. Epple, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 377, p. 386–392, 2011.
- [90] S. Djokic, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, vol. 2008, Article ID 436458, pp. 1-7, doi:10.1155/2008/436458.
- [91] X. C. Jiang, C. Y. Chen, W. M. Chen and A. B. Yu, *Langmuir*, vol. 26, no. 6, pp. 4400-4408, 2010.
- [92] H. Yin, T. Yamamoto, Y. Wada and S. Yanagida, *Materials Chemistry and Physics*, vol. 83, p. 66–67, 2004.
- [93] W. E. Benet, G. S. Lewis, L. Z. Yang and P. D. E. Hughes, *Journal of Chemical Research*, vol. 35, no. 12, pp. 675-677, 2011.
- [94] R. Chang, Química, México: McGraw-Hill, 1999, pp. 656-658.
- [95] J. McMurry, Química Orgánica, México: International Thomson, 2001, pp. 764-767.
- [96] Y. Bune, A. I. B. Y. S. Barabanova and V. F. Gromov, *European Polymer Journal*, vol. 33, pp. 1313-1323, 1997.
- [97] F. Rosa, J. Bordado and M. Casquilho, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 87, p. 192–198, 2003.
- [98] T. Nakajima, H. Furukawa, Y. Tanaka, T. Kurokawa, Y. Osada and J. P. Gong, *Macromolecules*, vol. 42, pp. 2184-2189, 2009.
- [99] I. Száraz and W. Forsling, *Polymer*, vol. 41, p. 4831–4839, 2000.
- [100] P. Shestakova, R. Willem and E. Vassileva, *Chemistry: A European Journal*, vol. 17, pp. 14867-14877, 2011.
- [101] I. Rintoul and C. Wandrey, *Polymer*, vol. 46, p. 4525–4532, 2005.
- [102] A. Gallardo, M. R. Aguilar, G. A. Abraham and J. San Román, *Journal of Chemical Education*, vol. 81, pp. 1210-1215, 2004.
- [103] G. Odian, Principles of Polymerization, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004, pp. 812-813.

- [104] Y. L. Luo, F. Xu, Y. S. Chen and C. Y. Jia, *Polymer Bulletin*, vol. 65, pp. 181-199, 2010.
- [105] E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter, A. Herrera and R. Martínez, *Determinación Estructural de Compuestos Orgánicos*, Barcelona: Masson, 2002, p. p 245.
- [106] J. Prado-Olivarez, R. Gómez, J. Díaz-Carmona, J. A. Padilla-Medina and M. Madi, *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, vol. 30, no. 1, pp. 18-24, 2009.
- [107] A. Thakur, R. K. Wanchoo and P. Singh, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, vol. 25, no. 2, pp. 181-194, 2011.
- [108] V. Sáez, E. Hernáez and L. Sanz-Angulo, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 4 , no. 1, pp. 21-91, 2003.
- [109] S. Kiatkamjornwong, K. Mongkolsawat and M. Sonsuk, *Polymer*, vol. 43, pp. 3915-3924, 2002.
- [110] D. Andrade, D. García, H. Inciarte, I. González, D. Soto and H. Oliva, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 11, no. 1, pp. 1-16, 2010.
- [111] P. L. Ritger and N. A. Peppas, *Journal of Controlled Release*, vol. 5, no. 1, pp. 23-36, 1987.
- [112] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim and J. O. Kim, *Journal of Biomedical Materials*, vol. 52, no. 4, pp. 662-668, 2000.
- [113] S. B. Atiyeh, M. Costagliola, S. N. Hayek and S. A. Dibo, *Burns*, vol. 33, pp. 139-148, 2007.
- [114] G. Xu, J. J. Shi, D. J. Li and H. L. Xing, *Journal of Polymer Research*, vol. 16, pp. 295-299, 2009.
- [115] W. Y. Huang and G. C. Xu, *Journal of Coal Science & Engineering* , vol. 16, no. 2, pp. 188-192, 2010.
- [116] B. L. Rivas, E. Martínez, E. D. Pereira and K. E. Geckeler, *Polymer International*, vol. 50, pp. 456-462, 2001.
- [117] X. Huang and C. S. Brazel, *Journal of Controlled Release*, vol. 73, p. 121, 2001.
- [118] D. Kirf, C. L. Higginbotham, N. J. Rowan and S. M. Devery, *Biomedical Materials*, vol. 2010, Article ID 035002, pp. 1-11, doi:10.1088/1748-6041/5/3/035002.

- [119] B. S. Nagoba, R. C. Gandhi, B. J. Wadher, R. M. Potekar and S. M. Kolhe, *Journal of Medical Microbiology*, vol. 57, p. 681, 2008.



## Anexos

**Anexo 1.** Tabla ANOVA para  $\text{LOG}_{10}(X_{EC} - 0.5)$  según “CCI”. Donde  $X_{EC}$  es la zona de inhibición del crecimiento de *E. coli* (mm) y “CCI” son los compositos procedentes del coloide N°1 (ver Figura 3.21).

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1.09874	5	0.219747	33.77	0.0000
Intra grupos	0.0780782	12	0.00650651		
Total (Corr.)	1.17682	17			

**Anexo 2.** Tabla ANOVA para  $\text{LOG}_{10}(X_{EC})$  según “CC2”. Donde  $X_{EC}$  es la zona de inhibición del crecimiento de *E. coli* (mm) y “CC2” son los compositos procedentes del coloide N°2 (ver Figura 3.24).

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1.00523	5	0.201046	44.47	0.0000
Intra grupos	0.0542534	12	0.00452112		
Total (Corr.)	1.05948	17			

**Anexo 3.** Tabla ANOVA para  $(0.33 \cdot X_{SA})^{\text{LOG}_{10}(X_{SA})}$  según “CCI”. Donde  $X_{SA}$  es la zona de inhibición del crecimiento de *S. aureus* (mm) y “CCI” son los compositos procedentes del coloide N°1 (ver Figura 3.21).

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.227915	5	0.0455829	52.45	0.0000
Intra grupos	0.0104287	12	0.000869062		
Total (Corr.)	0.238343	17			

**Anexo 4.** Tabla ANOVA para  $X_{SA}$  según “CC2”. Donde  $X_{SA}$  es la zona de inhibición del crecimiento de *S. aureus* (mm) y “CC2” son los compositos procedentes del coloide N°2 (ver Figura 3.24).

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	25.6	5	5.12	55.85	0.0000
Intra grupos	1.1	12	0.0916667		
Total (Corr.)	26.7	17			

**Anexo 5.** Tabla ANOVA para “Viabilidad Celular (%TMX)” según “AM-1”. Donde “AM-1” son los extractos (en medio MEM) del Día 1 producidos por los compositos del tipo poli[AAm-co-AMPSNa] y sus hidrogeles de procedencia (ver Figura 3.26).

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.936669	6	0.156112	17.13	0.0000
Intra grupos	0.446539	49	0.00911304		
Total (Corr.)	1.38321	55			

**Anexo 6.** Tabla ANOVA para “Viabilidad Celular (%TMX)” según “AM-2”. Donde “AM-2” son los extractos (en medio MEM) del Día 2 producidos por los compositos del tipo poli[AAm-co-AMPSNa] y sus hidrogeles de procedencia (ver Figura 3.26).

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1.17567	6	0.195945	11.32	0.0000
Intra grupos	0.848029	49	0.0173067		
Total (Corr.)	2.0237	55			



**Anexo 7.** Tabla ANOVA para “Viabilidad Celular (%TMX)” según “AM-14”. Donde “AM-14” son los extractos (en medio MEM) del Día 14 producidos por los compositos del tipo poli[AAm-co-AMPSNa] y sus hidrogeles de procedencia (ver Figura 3.26).

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.434043	6	0.0723405	9.28	0.0000
Intra grupos	0.382113	49	0.00779823		
Total (Corr.)	0.816156	55			

**Anexo 8.** Tabla ANOVA para  $[X^{EXP}(X^X)]^{1/2}$  según “VP-1”. Donde  $X$  es la “Viabilidad Celular (%TMX)” y “VP-1” son los extractos (en medio MEM) del Día 1 producidos por los compositos del tipo poli[VP-co-AMPSNa] y sus hidrogeles de procedencia (ver Figura 3.25).

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.432003	6	0.0720005	4.50	0.0010
Intra grupos	0.783897	49	0.0159979		
Total (Corr.)	1.2159	55			

**Anexo 9.** Tabla ANOVA para “Viabilidad Celular (%TMX)” según “VP-2”. Donde “VP-2” son los extractos (en medio MEM) del Día 2 producidos por los compositos del tipo poli[VP-co-AMPSNa] y sus hidrogeles de procedencia (ver Figura 3.25).

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.458953	6	0.0764922	10.44	0.0000
Intra grupos	0.35909	49	0.00732836		
Total (Corr.)	0.818043	55			

**Anexo 10.** Tabla ANOVA para  $\text{COS}^{-1}(X-0.3) \cdot X^{1/2}$  según “VP-14”. Donde  $X$  es la “Viabilidad Celular (%TMX)” y “VP-14” son los extractos (en medio MEM) del Día 14 producidos por los compositos del tipo poli[VP-co-AMPSNa] y sus hidrogeles de procedencia (ver Figura 3.25).

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	356.103	6	59.3505	8.68	0.0000
Intra grupos	335.165	49	6.8401		
Total (Corr.)	691.268	55			

