



**UADY**  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA

# ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PELÍCULAS DE QUITOSANO MODIFICADO

Proyecto de tesis presentada por:  
**CANDY DEL CARMEN GAMBOA SOLANA**

En opción al Grado de:  
**MAESTRA EN ODONTOLOGÍA INFANTIL**

Directores:  
**M. EN INV. EN. S. MARTHA GABRIELA CHUC GAMBOA**  
**DR. FERNANDO JAVIER AGUILAR PÉREZ**

Mérida, Yucatán, Noviembre 2020





**UADY**  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE  
ODONTOLOGÍA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PELÍCULAS DE  
QUITOSANO MODIFICADO

Proyecto de tesis presentada por:  
CANDY DEL CARMEN GAMBOA SOLANA

En opción al Grado de:  
MAESTRA EN ODONTOLOGÍA INFANTIL

Directores:  
M. EN INV. EN. S. MARTHA GABRIELA CHUC GAMBOA  
DR. FERNANDO JAVIER AGUILAR PÉREZ

Mérida, Yucatán, Noviembre 2020



**UADY**  
UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

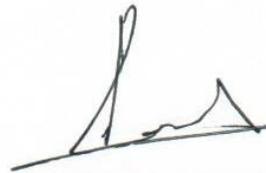
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**UNIDAD DE POSGRADO  
E INVESTIGACIÓN**

Mérida, Yucatán, 19 de noviembre de 2020

**C. CANDY DEL CARMEN GAMBOA SOLANA**

Con base en el dictamen emitido por sus Directores y revisores, le informo que la Tesis titulada "**Actividad antimicrobiana de películas de quitosano modificado**", presentada como cumplimiento a uno de los requisitos establecidos para optar al Título de la Maestría en Odontología Infantil, ha sido aprobada en su contenido científico, por lo tanto, se le otorga la autorización para que una vez concluidos los trámites administrativos necesarios, se le asigne la fecha y hora en la que deberá realizar su presentación y defensa.



**Dr. José Rubén Herrera Atoche**  
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación



Dr. Fernando Javier Aguilar Pérez  
Director



M. en Inv. En S. Martha Gabriela Chuc Gamboa  
Directora



Dr. Fernando Javier Aguilar Ayala  
Revisor



Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez  
Revisor

## REGLAMENTO

Artículo 78 del reglamento  
interno de la facultad de  
Odontología de la Universidad  
Autónoma de Yucatán

Aunque una tesis hubiera servido para el examen profesional y hubiera sido aprobada por el sínodo, solo su autor o autores son responsables de las doctrinas en ella emitidas.

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección de la M.I.S. Martha Gabriela Chuc Gamboa. Los resultados presentados, son parte del proyecto de investigación “Actividad antimicrobiana de las películas de quitosano modificado”, financiado por Conacyt.

## AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al centro de investigación científica de Yucatán, A.C. (CICY)

A mi familia que a pesar de la distancia siempre hicieron todo lo posible por estar cerca y pendientes de mí, por alentarme y motivarme cada día, y que sin ella no hubiera podido realizar uno de mis sueños, y a mis amigos de la maestría por apoyarme y hacer más agradable estos dos años fuera de casa.

A mis maestros, en especial a la Dra. Alicia Leonor Pinzón Te quien me estuvo acompañando a lo largo de estos dos años de maestría, por su confianza y su apoyo con la estancia y realización de esta tesis, y al Dr. David Aguilar Pérez por siempre apoyarme con mis dudas cuando le preguntaba.

A mi directora de tesis, la Dra. Martha Gabriela Chuc Gamboa por su paciencia, su gran conocimiento y sobre todo por su apoyo incondicional tanto académicamente como personalmente.

A mi codirector el Dr. Fernando Javier Aguilar Pérez por su apoyo incondicional, por estar siempre al pendiente, y por confiar en mí para realizar este proyecto.

A mis revisores de tesis el Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez, por su apoyo para mi estancia en el CICY, asesorarme en el laboratorio y por sus múltiples aportaciones a la tesis, y al Dr. Fernando Aguilar Ayala por su apoyo incondicional y confianza.

A la I.Q. Rossana Faride Vargas Coronado, por el apoyo técnico y logístico para realización de las caracterizaciones físico-químicas de las muestras.

A la Dra. Neith Aracely Pacheco López, investigadora Titular B de la Unidad Sureste del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) por su calidez humana y aportación con las pruebas microbiológicas.

A la Dra Patricia Quintana por el acceso al LANNBIO, al M.C. Daniel Aguilar Treviño por su apoyo técnico en la obtención de los difractogramas y al Ing. Wilian Cauich Ruiz por los espectros XPS realizados en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales (Financiado por Fomix-Yucatán 2008-108160, CONACYT LAB-2009-01-123913, 292692, 295643, 183445 y 204822), CINVESTAV-IPN. Unidad Mérida.

## DEDICATORIA

A mis padres Dainer y Reina porque son mi motivación día con día y son mi ejemplo de vida, de superación y de esfuerzo. A mi hermano Dainer por ser parte importante de mi vida y por su apoyo incondicional a pesar de la distancia.

Y sobretodo a Dios, por ponerme a las personas correctas en mi camino para que todo esto fuera posible.

## INDICE

### RESUMEN

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	2
1. MICROBIOMA DE LA CAVIDAD BUCAL .....	2
2. QUITOSANO .....	4
2.1 Efecto antimicrobiano del quitosano .....	6
3. GLUTARALDEHÍDO .....	8
3.1 Quitosano entrecruzado con glutaraldehído.....	9
4. ÓXIDO DE ZINC .....	10
4.1 Quitosano y óxido de zinc .....	12
5. NANOPARTÍCULAS DE COBRE .....	13
5.1 Quitosano y nanopartículas de cobre .....	16
JUSTIFICACIÓN .....	18
HIPÓTESIS .....	19
OBJETIVO GENERAL .....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
1. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	21
2. METODOLOGÍA .....	21
2.1 Materiales.....	21
2.2 Elaboración de películas de quitosano.....	21
2.2.1 Elaboración de películas de quitosano entrecruzadas con GA (glutaraldehído).....	21
2.2.2 Elaboración de películas de quitosano con partículas de Óxido de Zinc (ZnO).....	22
2.2.3 Elaboración de películas de quitosano con nanopartículas de Cu .....	22
2.2.4 Elaboración de películas de quitosano con partículas de Óxido de Zinc y nanopartículas de Cu .....	23
2.3 Caracterización fisicoquímica de las películas de quitosano .....	23
2.3.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) .....	24
2.3.2 Espectroscopía de Raman: .....	24
2.3.3 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS).....	24
2.3.4 Análisis Termogravimétrico (TGA) .....	24

2.3.5	Análisis elemental por energía dispersa de rayos X (EDX) .....	25
2.3.6	Difracción de rayos X.....	25
2.3.7	Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) .....	25
2.3.8	Medición de ángulo de contacto .....	25
2.4	Ensayo de difusión en agar para determinar la actividad antibacteriana contra el <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		27
1.	Caracterización fisicoquímica de las películas .....	27
1.1	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) .....	27
1.2	Espectroscopía de Raman .....	32
1.3	Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) y análisis elemental por energía dispersiva de rayos x (EDX).....	33
1.4	Análisis Termogravimétrico (TGA) .....	35
1.5	Difracción de rayos X (DRX).....	37
1.6	Microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	39
1.7	Medición del ángulo de contacto .....	40
1.8	Ensayo de difusión en agar para determinar la actividad antibacteriana contra el <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>S. typhimurium</i> .....	44
CONCLUSIONES .....		50
BIBLIOGRAFÍA .....		51

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.		
Composición de las películas de quitosano y quitosano modificado		23
Tabla 2		
Composición elemental de películas de quitosano y quitosano modificado		34
Tabla 3		
Degradación de TGA de las películas de quitosano y quitosano modificado		36
Tabla 4		
Ángulos de contacto de las películas de quitosano y quitosano modificado		42
Tabla 5		
Resultados de las pruebas antimicrobianas de las películas de quitosano y quitosano modificado		44

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	
Estructura de quitosano y quitina	4
Figura 2	
Estructura de quitosano entrecruzado con GA	9
Figura 3	
Agitación magnética de solución de quitosano y sonicación de la solución	22
Figura 4	
Espectro FTIR de las películas de quitosano y quitosano modificado	27
Figura5	
Espectro FTIR del ZnO	29
Figura 6	
Espectro FTIR de las nanopartículas de Cu	30
Figura 7	
Espectro FTR de las películas de quitosano	31
Figura 8	
Espectro Raman de películas de quitosano y quitosano modificado	32
Figura 9	
Espectro Raman de las partículas de óxido de zinc	33
Figura 10	
Termograma de TGA de películas de quitosano y quitosano modificado	35

Figura 11	
Patrón de difracción de rayos X del quitosano y quitosano modificado	37
Figura 12	
Imágenes MEB de las películas de quitosano y quitosano modificado	39
Figura 13	
Ángulo de contacto de películas de quitosano y quitosano modificado	40

## **INDICE DE ANEXOS**

ANEXO 1

Mediciones de las nanopartículas de cobre

67

## RESUMEN

### **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PELÍCULAS DE QUITOSANO MODIFICADAS**

**Introducción:** El papel del microbioma oral está ganando interés, a lo largo de los años, se busca disminuir la carga bacteriana para poder combatir enfermedades de la cavidad bucal. Una de estas afecciones es la caries dental, que es una enfermedad multifactorial, causada por la interacción entre la superficie del diente, el biofilm bacteriano y la presencia de azúcares en la dieta. Según la FDI (World Dental Federation) es la enfermedad más frecuente de la infancia, pero afecta a todas las edades a lo largo de la vida. Una alternativa para evitar enfermedades de la cavidad bucal es el uso de antimicrobianos, estos se definen como medicamentos que inhiben o impiden la multiplicación de bacterias, hongos y parásitos. Una opción que se ha estudiado los últimos años es el uso del quitosano como antimicrobiano.

**Objetivos:** Elaborar y caracterizar fisicoquímicamente, materiales compuestos a base de quitosano para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro*.

**Métodos:** Se elaboraron películas de quitosano, quitosano entrecruzado con glutaraldehído, quitosano con partículas de óxido de zinc y quitosano con nanopartículas de cobre. Para conocer las características de las películas obtenidas con quitosano y quitosano modificado, los materiales fueron caracterizados mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía Raman, XPS; posteriormente, la actividad antimicrobiana de cada material fue evaluada mediante pruebas de difusión en agar.

**Resultados:** Se encontró actividad antimicrobiana *S. aureus* en la película de quitosano entrecruzada con glutaraldehído, pero no en las demás muestras. Se encontró actividad antimicrobiana de todas las películas contra *S. typhimurium*.

**Conclusiones:** De acuerdo con los resultados, se concluye que el quitosano si tiene efecto antimicrobiano. Se recomienda realizar más estudios para aplicaciones médicas y odontológicas.

## DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La cavidad oral es un entorno ecológicamente rico en especies microbiológicas ubicadas en diferentes sitios de la boca, las cuales pueden asociarse con la patogénesis de diversas enfermedades. Las bacterias del biofilm tienen un papel importante en el origen de éstas, entre las que destacan la caries dental, la gingivitis, periodontitis, entre otras.

El papel del microbiota oral ha ido ganando interés en el ámbito científico, a lo largo de los años se ha buscado disminuir la carga bacteriana para poder combatir posibles enfermedades de la cavidad bucal. Las enfermedades bucales no tratadas pueden dificultar el comer y el dormir, en pacientes menores de edad pueden ser la causa principal de absentismo escolar.

Aunque los métodos mecánicos para disminuir la carga bacteriana como el cepillado dental son suficientes, es necesario buscar alternativas para complementar y atacar con mayor impacto las bacterias de la cavidad bucal.

Los antibióticos sistémicos y tópicos, empleados en conjunto con la preparación mecánica de las lesiones de caries, no desinfectan por completo las biopelículas dentales ni las lesiones relacionadas con la caries dental. Por lo tanto, una alternativa es el uso de antimicrobianos, estos se definen como medicamentos que inhiben o impiden la multiplicación de bacterias, hongos y parásitos. A pesar del extenso número de investigaciones aún no se ha encontrado el antimicrobiano ideal para uso en cavidad bucal. Una opción que se ha estudiado los últimos años es el empleo del Quitosano como antimicrobiano y el uso de algunas nanopartículas metálicas.

Por lo tanto, la pregunta del presente estudio es: ¿Las películas de quitosano y quitosano modificado con cobre y zinc mostrarán actividad antimicrobiana contra los microorganismos de la cavidad bucal?

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. MICROBIOMA DE LA CAVIDAD BUCAL

En el cuerpo humano, una de las comunidades microbianas más complejas y heterogéneas se encuentra en la cavidad bucal, ya que la adhesión de bacterias planctónicas a una superficie va seguida de una coagregación, un crecimiento, una producción de matriz extracelular y una maduración de una estructura sésil llamada biopelícula oral (1).

La caries no tratada tiene una prevalencia global del 40% y representa la enfermedad bucal más frecuente (2). Es una enfermedad dinámica, multifactorial, causada por la interacción entre la superficie del diente, el biofilm bacteriano, y la presencia de azúcares en la dieta. Las bacterias del biofilm metabolizan los azúcares produciendo ácidos los cuales desmineralizan el esmalte.

La caries se asocia con un alto recuento de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp* y una baja capacidad de amortiguación de la saliva (3). Otras de las bacterias encontradas en cavidad bucal de acuerdo con diversos estudios, son *Staphylococcus spp* en sujetos sanos con enfermedad periodontal (4,5). El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es una bacteria Gram positiva abundante que se aloja en las fosas nasales, en los oídos y en cavidad oral de los pacientes sanos (4,6). El *S. aureus* puede ser responsable de infecciones asociadas a la atención de la salud bucal y dental. Los pacientes con altos niveles de *S. aureus* en saliva son fuentes potenciales de infección en un consultorio dental, ya que se esparce en el ambiente durante la terapia dental (4). Petti y cols. evaluaron la tasa de portadores de *S. aureus* en saliva de 97 niños de 6 a 12 años con buena salud general, en donde recolectaron muestras de saliva no estimulada. Al final del estudio, se identificó *S. aureus* en un 43% de las muestras (4). También se ha demostrado que esta bacteria tiene una fuerte conexión con infecciones de implantes dentales (7).

McCormack y cols. analizaron a 1429 pacientes, de los cuales aislaron *S. aureus* en un 91% de estos. La descripción clínica reportada con mayor frecuencia fue la queilitis angular, también se encontró que los valores de *S. aureus* aumentaron en los pacientes con

prótesis dentales y con secreción salival reducida. Las tasas de detección pueden reflejar un mayor número de portadores más que una asociación con la enfermedad. Uno de los puntos de mayor interés fue la recuperación de pequeñas cantidades de *S. aureus* aislados de infecciones dentales agudas (8). En un estudio donde se analizó la microbiota oral de pacientes con malformaciones del sistema masticatorio, fue frecuente el aislamiento de cepas de *S. aureus* (9).

Cuando se colocan aparatos fijos de ortodoncia u ortopedia en boca, se crean nuevos sitios de retención de comida, por lo tanto, también nuevos sitios para fijación de microorganismos, especialmente si no hay una adecuada higiene. Esto puede crear oportunidades para que los microorganismos no orales se mantengan por más tiempo o incluso colonizar la boca (10).

Perkowski y cols. confirmaron la presencia de *S. aureus* y también la presencia de enterococos grampositivos: *enterococcus faecalis*, *E. faecium*, y gramnegativos como *E. coli*, *E. cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella sp.* en pacientes de 14 a 23 años con aparatología fija (11). Incluso en un estudio donde evaluaron la cavidad oral de 171 pacientes con salmonelosis, encontraron que éstos habían sido diagnosticados en primer lugar por cambios inflamatorios de la mucosa de la cavidad oral tales como glositis, gingivitis, estomatitis aftosa. Estas lesiones son una manifestación particular del proceso infeccioso, por lo que es recomendado identificar estas lesiones por un estomatólogo (12).

*S. aureus* es responsable de una amplia variedad de condiciones que pueden causar infecciones con alta tasa de mortandad. Se han buscado alternativas debido a sus cepas resistentes, una de estas alternativas ha sido el quitosano (13).

Las nuevas estrategias para combatir el biofilm pueden dividirse básicamente en dos clasificaciones: a través de la inhibición del crecimiento bacteriano mediante el uso de compuestos bactericidas o bacterostáticos o bloqueando la adhesión bacteriana para prevenir la formación de biopelículas (14).

Los antimicrobianos de uso clínico, ejercen su acción en algunas de las estructuras o funciones bacterianas, por ejemplo, inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos (15). La quitina y el quitosano

han estado implicados durante mucho tiempo con respecto a sus acciones bacteriostáticas y bacterianas contra una gran variedad de microorganismos orales (16).

## 2. QUITOSANO

El quitosano se produce de la quitina, que es un polisacárido natural que se encuentra en el exoesqueleto de cangrejos, camarones, langostas, corales, calamares, medusas, así como en insectos, hongos, levaduras y algas, es el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa (Figura 1) (17–19). Por otro lado, el quitosano solo se encuentra naturalmente en algunos hongos como *Mucoraceae* (20). El quitosano es relativamente reactivo, y se puede producir en varias formas, como polvo, pasta, película, fibra, etc. Comercialmente tiene un peso molecular promedio que oscila entre 3,800 y 20,000 Daltons y es de 66% a 95% desacetilado (21).

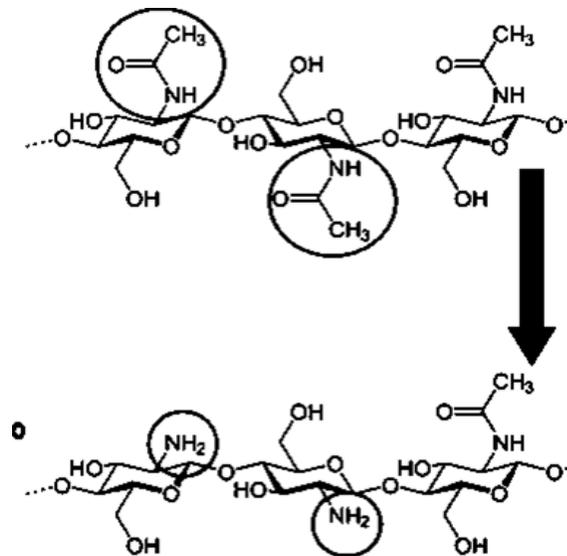


Figura 1. Estructura de la Quitina y Quitosano.

El quitosano es un copolímero aleatorio obtenido de la desacetilación alcalina de quitina, formado por unidades de d-glucosamina, unidas por enlaces glucosídicos -1,4. La relación entre las dos unidades se considera el grado de desacetilación. El grado de desacetilación se define como la fracción o porcentaje de unidades no acetiladas a lo largo

de la cadena de quitosano, es importante para establecer la identidad del quitosano y es un parámetro que indica las propiedades funcionales, biológicas y fisicomecánicas (22–24).

A medida que aumenta el grado de desacetilación aumentan las interacciones entre el quitosano y las células debido a los grupos amino libres. Por lo tanto, este parámetro está dado por el porcentaje de grupos N-acetilamina que quedan unidos en la molécula de quitosano y está vinculado con sus propiedades fisicoquímicas (25,26).

La solubilidad del quitosano proporciona oportunidades para manufacturarse de muchas formas diferentes, como películas, nanofibras, hidrogeles o pastas, aunque algunos usos en su forma en polvo no disuelta también se han estado estudiando recientemente (27).

Schipper y cols. han reportado que los quitosanos con grado de desacetilación superior al 35% muestran baja toxicidad, mientras que un grado de desacetilación por debajo del 35% causa toxicidad (28).

La presencia de grupos aminos en las cadenas de la molécula de quitosano permite la disolución de esta macromolécula en soluciones acuosas ácidas diluidas con un pH a 6 o menor, por lo que puede disolverse en ácidos inorgánicos como el clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, yohídrico, nítrico y el perclórico. El quitosano forma sales solubles en el caso del ácido acético, fórmico y con ácidos mono y dicarboxílicos (20).

También presenta una semejanza estructural con los glicosaminoglicanos (GAG), uno de los componentes esenciales de la matriz extracelular que interactúa con las fibras de colágeno y desempeña un papel importante en la adhesión célula-célula. Se sabe que el quitosano facilita el suministro de fármacos a través de las barreras celulares y abre transitoriamente las uniones estrechas entre las células epiteliales (29). El quitosano, después de la despolimerización produce quitoooligosacáridos bioactivos con propiedades antimicrobianas, y sus productos monoméricos (glucosamina) son metabolizados y excretados del cuerpo. Por lo tanto, el quitosano es biodegradable ya que se degrada mediante hidrólisis por acción de lisozimas y no provoca reacción de cuerpo extraño ni encapsulación fibrosa, por lo tanto es biocompatible con casi todos los tejidos del cuerpo (30). Sin embargo, la cinética de la degradación parece estar inversamente relacionada

con el grado de cristalinidad que se controla por el grado de desacetilación. Además, la distribución de los grupos acetilo también afecta la biodegradabilidad ya que la ausencia de grupos acetilo o su distribución homogénea da como resultado tasas muy bajas de degradación enzimática (31,32).

El quitosano es biocompatible con tejidos vivos, ya que no causa reacciones alérgicas ni rechazo (21). Se ha demostrado la citocompatibilidad del quitosano con células miocárdicas, endoteliales, hepatocitos, condrocitos y queratinocitos (31). Por lo tanto, se ha utilizado en una variedad de biomateriales, debido a su ya mencionada alta biocompatibilidad, así como por su estructura porosa, idoneidad para crecimiento celular, osteoconducción y naturaleza antibacteriana intrínseca. Asimismo, se emplea en productos para biomedicina, cosmetología, fabricación de papel, tratamiento de aguas residuales, aplicaciones agrícolas o farmacéuticas, entre otras. Ha recibido mucha importancia debido a sus características como: biodegradabilidad, biocompatibilidad y propiedades antimicrobianas, ya que inhibe el crecimiento de una amplia variedad de bacterias (17,22).

La capacidad de aprovechar y adaptar las propiedades en función de una aplicación particular le da al quitosano una ventaja significativa. En cuanto a las propiedades del material, las características del quitosano dependen de parámetros estructurales como el peso molecular y su grado de desacetilación. Además, la fuente de extracción y los procedimientos adaptados para llevar a cabo la desacetilación pueden afectar las propiedades finales. El grado de desacetilación influye fuertemente en las propiedades físicas, químicas y biológicas (16). Un alto grado de desacetilación hará que el quitosano sea más biocompatible, mientras que un grado menor hará al quitosano más biodegradable (33).

## 2.1 Efecto antimicrobiano del quitosano

Una de las principales razones para que el quitosano posea actividad antimicrobiana es la presencia de un grupo amino con carga positiva a pH inferior a 6.3 (carbono 2) el cual interactúa con las cargas negativas de la pared celular de los

microorganismos, generando un rompimiento o lisis de estas estructuras, que lleva a la pérdida de compuestos proteicos y otros constituyentes intracelulares (34).

La actividad antibacteriana del quitosano y las características superficiales de la pared están estrechamente relacionadas. Más quitosano adsorbido daría como resultado mayor cambio en la estructura de la pared y en la permeabilidad de la membrana celular. Ambos efectos provocan la muerte de las bacterias. Una solución más ácida y un mayor grado de desacetilación daría lugar a mayores cantidades adsorbidas (35).

Du y cols. demostraron que las propiedades antifúngicas y antimicrobianas del quitosano al 90% de desacetilación y un peso molecular de 150kDa, fueron mejoradas al cargar al quitosano con varios metales como nitrato de plata, sulfato de cobre, sulfato de manganeso y sulfato férrico (36).

Chung y cols. evaluaron el efecto antimicrobiano de coloides de quitosano con grado de desacetilación de 75% y 95% sobre *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*. Se concluyó que las bacterias Gram negativas fueron más susceptibles que las bacterias Gram positivas. (37).

También ha exhibido una potente actividad antiplaca contra varios patógenos orales como *Phorphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *actinobacillus actinomycetemcomitans* (38). Sin embargo, en un estudio realizado por Valencia y cols. se evaluó el efecto antimicrobiano de quitosano comercial con grado de desacetilación del 85% en estado líquido y estado sólido contra *Staphylococcus aureus*. El quitosano no mostró un efecto antimicrobiano contra este organismo en ninguno de los dos casos (39).

Sarasam y cols. evaluaron la actividad antimicrobiana del quitosano y encontraron que fue efectiva particularmente para *Streptococcus mutans*. También encontraron que la actividad antibacteriana de las estructuras de quitosano en presencia de la lisozima se ve influenciada por la especie. Sin embargo, la lisozima no tuvo ningún efecto significativo sobre la adhesión y la viabilidad de *S. mutans* o *actinobacillus actinomycetemcomitans* en la superficie de los andamios de quitosano (40).

Huang y cols. prepararon quitosano sulfonado y analizaron la inhibición de la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas contra *E. coli* y *S. aureus* en comparación con muestras de clorhidrato de quitosano no modificado. Se encontró que la actividad metabólica de *E. coli* y *S. aureus* disminuyeron considerablemente después del tratamiento de quitosano sulfonado (41).

Fujimoto y cols. evaluaron la actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus*. de tres tipos de soluciones (una solución de quitosano sin diluir, dos soluciones de quitosano diluidas en agua purificada y como control solución tampón de fosfato con un pH de 7). Se encontró una disminución en el número de células después de un día de incubación en comparación con el valor inicial en la solución de quitosano sin diluir y en las diluidas; se atribuye que la disminución del valor del pH del quitosano es la responsable de la actividad antibacteriana (42).

Imani y cols. evaluaron la eficacia antimicrobiana del quitosano en comparación con el formocresol, contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*. Realizaron un estudio *in vitro* de dos fases. Las bacterias se cultivaron e inyectaron en canales radiculares esterilizados y se contaron las colonias, posteriormente se aplicaron los medicamentos y se volvieron a contar las colonias a un día; se repitió el procedimiento, pero en un periodo de 7 días. La eficacia antibacteriana del quitosano fue similar a la del formocresol en cualquiera de las dos fases. Encontraron que el quitosano tiene adecuada propiedad antibacteriana como medicamento en pulpectomías de dientes temporales (43).

### 3. GLUTARALDEHÍDO

El glutaraldehído (GA) es un dialdehído saturado que se ha utilizado comúnmente como desinfectante y esterilizante químico en hospitales (44). Dos grupos carbonilo y dos átomos de carbono, tipo  $\alpha$ , están presentes en la partícula GA, lo que significa que esta molécula debe considerar un grupo tetrafuncional. En consecuencia, esta molécula es altamente reactiva frente a grupos amina e hidroxilo y tiene tendencia a los cambios internos y a la polimerización en función de los valores de pH, temperatura y

concentración (45). Su actividad antimicrobiana se debe a la alquilación de grupos hidroxilo, carbonilo y amino que afecta la síntesis de ADN, ARN y proteínas (44).

Estudios *in vitro* han informado que las soluciones alcalinas de glutaraldehído son eficaces contra *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en menos de 2 minutos, *Mycobacterium tuberculosis*, hongos y virus en menos de 10 minutos y esporas de *Bacillus* y Especies de *Clostridium* en 3 horas (44).

El GA es el agente entrecruzante más comúnmente utilizado debido a que estabiliza el colágeno de manera eficiente. Sin embargo, los biomateriales entrecruzados con GA son poco biocompatibles con algunas líneas celulares que incluyen fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales humanas (46).

### 3.1 Quitosano entrecruzado con glutaraldehído

El glutaraldehído se ha utilizado comúnmente para mejorar las propiedades del quitosano. La estructura química del quitosano y la interacción covalente entre el quitosano y el agente de entrecruzado se muestra en la figura 2 (21). El glutaraldehído produce bases de Schiff entre los grupos aldehído y los grupos amina libres en polímeros de quitosano desacetilados. Por lo que, el GA mejora sus propiedades mecánicas, fija su estructura y modifica la permeación (33).

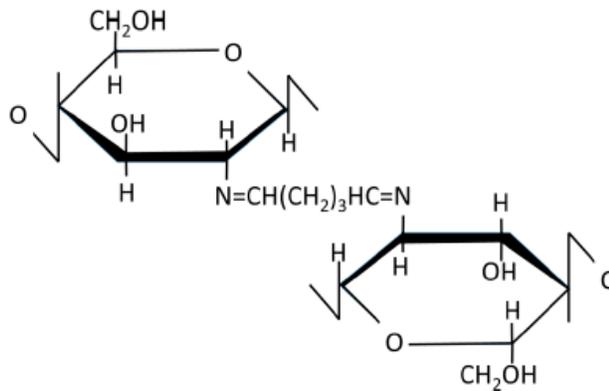


Figura 2. Estructura de Quitosano entrecruzado con GA.

Valizadeh S. y cols. encontraron que las propiedades antimicrobianas, antioxidantes, mecánicas y físicas de las películas compuestas de quitosano-carboximetilcelulosa podrían mejorarse incorporando aceite esencial de canela y glutaraldehído a la matriz de la película (47).

Yu y cols. reportaron que la adición de glutaraldehído a las películas de quitosano contribuye a la actividad antimicrobiana. Como dialdehído, el glutaraldehído muestra una potente actividad germicida debido a su interacción con grupos amino en proteínas y enzimas (48).

En un estudio se valoró el crecimiento de la cepa *Burkholderia cepacia* con quitosano sólido el cuál no fue afectado, sin embargo, fue fuertemente inhibido por el quitosano entrecruzado con glutaraldehído. Por lo que se reveló, que el entrecruzado puede ser usado como un posible agente antibacteriano prometedor (49).

#### 4. ÓXIDO DE ZINC

El zinc es un microelemento esencial para los humanos, existe en enzimas y proteínas (50). Es un mineral importante involucrado en actividades biológicas como metabolismo celular, síntesis de ADN y actividad enzimática (51). El óxido de zinc (ZnO) es un agente antimicrobiano eficiente que actúa mediante varios mecanismos que involucran diferentes especies químicas. Los iones de zinc ( $Zn^{2+}$ ) exhiben actividad antimicrobiana contra diversas cepas bacterianas y fúngicas. La disolución parcial de partículas de óxido de zinc (ZnO) libera iones  $Zn^{2+}$  en suspensión acuosa que contribuye a la actividad antimicrobiana de ZnO (50).

El óxido de zinc muestra atractivas propiedades antimicrobianas que han sido utilizadas en muchos productos farmacéuticos y cosméticos. En medicamentos para uso tópico, el ZnO actúa como una capa protectora contra la irritación de la piel y las abrasiones, como un astringente suave y como agente antimicrobiano (52).

Las nanopartículas de zinc pueden ser sintetizadas por diversos métodos químicos y físicos tales como coprecipitación, sol-gel, síntesis asistidas con microondas, síntesis

ultrasónica, descomposición térmica, hidrotermal y método electroquímico (53). Las nanopartículas del óxido de zinc son bien conocidas por la degradación y mineralización de contaminantes ambientales (54).

Las nanopartículas de óxido de zinc son biocompatibles, no tóxicas, pero nocivas para los microorganismos, inhibiendo el crecimiento de microorganismos al desintegrar la membrana celular (55).

Se ha demostrado que el efecto antimicrobiano de las resinas que contienen nanopartículas de ZnO es mayor a las que contienen nanopartículas de plata (56). Además, el potencial antifúngico de las partículas sintetizadas de óxido de zinc contra *Candida albicans* ha sido evaluado a fondo. Los efectos antifúngicos del ZnO pueden deberse a su ataque hacia la membrana celular provocando que las protuberancias de la superficie adquieran una forma inusual y afecten la integridad de la membrana celular. En un estudio se encontró que la actividad antifúngica de las partículas de óxido de zinc contra *C. albicans* es dependiente de la dosis, de modo que al aumentar la concentración de ZnO disminuye el crecimiento de hongos. También se encontró que la viabilidad celular se redujo al aumentar la concentración de las partículas de óxido de zinc, que indica que la citotoxicidad depende de la dosis (57).

Jones y cols. trataron de identificar el posible efecto antimicrobiano de las nanopartículas de ZnO contra microorganismos Gram positivos como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y Gram negativos como *E. coli*. En comparación con otras nanopartículas, las ZnO mostraron una mayor inhibición significativa de crecimiento con *S. aureus* (58).

Beyene y cols. realizaron un nanocompuesto de Hidroxiapatita y ZnO para evitar las infecciones asociadas con los implantes ortopédicos. Este nanocompuesto mostró un efecto antimicrobiano contra Gram positivos (*Streptococcus aureus*) responsable del 50% de las infecciones, y contra Gram negativos (*Escherichia coli*), sin embargo *S. aureus* resultó ser más sensible a la concentración mínima de las partículas de ZnO. Como conclusión del estudio, se determinó que la intensidad antimicrobiana del nanocompuesto depende de la concentración de ZnO (59).

Dias y cols. evaluaron la actividad antimicrobiana de resina modificada con óxido de zinc al 0.2%, 0.5% y 1% mediante prueba de contacto directo, ellos encontraron una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 125 µg/mL para *S. mutans*, 500 µg/mL para *C. albicans* y 62.5 µg/mL para *S. aureus* (60).

Para solucionar uno de los problemas más graves asociados con los implantes, Karbowniczek y cols. propusieron recubrimientos orgánicos/inorgánicos que contuvieran nanopartículas de ZnO. Ellos realizaron pruebas antibacterianas contra bacterias Gram negativas como *Staphylococcus aureus* y entéricas Gram positivas como *Salmonella*. Se confirmó la actividad de ZnO para prevenir el crecimiento bacteriano (61).

#### 4.1 Quitosano y óxido de zinc

El recubrimiento de quitosano con nanopartículas de óxido metálico particularmente usando las nanopartículas de óxido de zinc ha recibido atención en los últimos años debido a sus aplicaciones menos tóxicas, ecológicas y diversas (62).

En un estudio se reportó la preparación de un nanocompuesto de óxido de zinc y quitosano mediante la ruta de bioflavonoides. El nanocompuesto preparado de Quitosano y óxido de zinc mostró una mayor actividad antimicrobiana contra los patógenos bacterianos Gram-negativos comparada con los Gram-positivos (53). También Haldorai y cols. reportaron que el compuesto de quitosano con óxido de zinc tuvo una significativa actividad antibacteriana (63).

Wahid and cols. investigaron la actividad antimicrobiana de hidrogeles de carboximetil quitosano-zinc contra *Streptococcus aureus* y *E. coli* mediante el método de difusión en placa de agar y encontraron una excelente actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, a medida que se incrementaba la concentración de iones de zinc en los hidrogeles, las zonas de inhibición también aumentaban (64).

Ficai y cols. realizaron películas antimicrobianas de quitosano y quitosano modificado con nanopartículas de ZnO, se prepararon disolviendo 1.049 g de quitosano y 0.0234 g de Zn en 150mL de ácido acético (100mL de ácido acético diluido en 50mL de

agua destilada), agitadas durante 12 horas bajo temperatura ambiente. Estas películas fueron comparadas con películas de quitosano con ácido úsnico, disolviendo 1.049 g de quitosano y 0.01 g de ácido úsnico. Las películas fueron neutralizadas y secadas al vacío a 60°C durante la noche. Evaluaron tres bacterias *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Para *S. aureus* las muestras que contienen ácido úsnico exhiben una actividad antimicrobiana mayor comparado con las muestras de quitosano puro. Se observó actividad para las muestras que contenían ZnO debido a la interacción entre la superficie celular cargada positiva y los iones hidroxilo. Ellos llegaron a la conclusión que se pueden utilizar sistemas con ZnO y/o ácido úsnico como membranas biológicas con actividad antimicrobiana (65).

Youssef y cols. evaluaron la eficacia antimicrobiana de películas de quitosano adicionadas con nanopartículas de Ag y ZnO. Encontraron buenas propiedades antimicrobianas para ambas películas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhamrium*, *Bacillus cereus*, y *Listeria monovyte*. Por lo que sugieren que estas películas pueden tener múltiples aplicaciones (66).

## 5. NANOPARTÍCULAS DE COBRE

Los nanomateriales son prometedores en terapias antibacterianas debido a su fisicoquímica y propiedades únicas, como su tamaño. Dichos materiales pueden proporcionar una nueva estrategia para el tratamiento y prevención de la caries dental, ya que las nanopartículas combinadas con polímeros exhiben propiedades antimicrobianas superiores en la cavidad oral (67).

Existen dos metodologías para combatir la caries dental con nanopartículas. La primera, incorporara nanopartículas antibacterianas en compuestos de resina y agentes para reducir la biopelícula de microorganismos con contacto directo, y la segunda metodología, es el uso de nanopartículas para reducir la desmineralización (68).

Las nanopartículas son descritas como partículas que tienen un tamaño de diámetro menor o igual a 0.1  $\mu\text{m}$  (100 nm) y con propiedades específicas que dependerán

principalmente de su tamaño (69). Las nanopartículas de cobre tienen una propiedad única en el aspecto tecnológico a escala nanométrica. Tienen una banda estrecha de 1.7 eV lo que hace que su aplicación sea mayor en los campos de superconductores, en la transformación de energía solar, antifúngico, antimicrobiano y agente antibiótico (70). Además, las nanopartículas de cobre se utilizan ampliamente en diversos campos como la catálisis fotoquímica, electrónica, óptica, biosensores, sensores de gas, sensores electroquímicos y solares/conversión fotovoltaica (71).

Las nanopartículas de cobre han sido muy investigadas como candidatas para nuevas aplicaciones antimicrobianas (es decir, antivirales, antibacterianas y antifúngicas) como biocidas, alternativas de tratamiento con antibióticos y recubrimientos de nanocompuestos (72).

El cobre es un potente agente antibacterial. Depende del tamaño y forma de las nanopartículas, se ha utilizado como antibacteriano y antioxidante. Las nanopartículas de cobre han mostrado ser efectivas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (73). El efecto antibacteriano del cobre fue percibido por el Dr. Kuhn. Él estudió el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus grupo D*, y *Pseudomonas* en diferentes metales, descubriéndose que tanto la hojalata, como el cobre, eran los metales que mostraban menos proliferación bacteriana (74). El óxido de cobre II (CuO) ha sido utilizado contra algunas cepas bacterianas como *E. coli* y *S. aureus*, siendo más efectivo contra las primeras bacterias (75).

Noyce y cols. compararon la actividad antimicrobiana de tres metales con tres tipos de cepas bacterianas, y se lograron demostrar el efecto antimicrobiano del cobre sobre los otros metales (76).

Booschehri realizó un estudio donde presentaba una técnica simple *in situ* para depositar nanopartículas de óxido de cobre en el papel de celulosa. Las partículas de óxido de cobre en forma de nanocapas fueron sintetizadas y mostraron una buena actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas (77).

La aglomeración de las nanopartículas de Cu (cobre) afecta significativamente la actividad antibacteriana del recubrimiento o compuesto al reducir la liberación de iones,

de hecho, las partículas consistentes en un área superficial específicamente alta muestran la mayor liberación de iones (78).

Las nanopartículas de Cu pueden ser potenciales agentes antimicrobianos debido a su gran área de superficie y menor toxicidad para las células. También exhiben un alto potencial electroquímico. Los iones de Cu libres pueden interactuar con las proteínas bacterianas, lo que suprime su capacidad (79).

Jeyaraman y cols. realizaron un estudio en el cual las nanopartículas de cobre mostraron actividad antimicrobiana contra cinco cepas bacterianas (*M. luteus*; *S. aureus*; *E. coli K. pneumoniae*; y *P. aeruginosa*) y tres cepas de hongos (*A. flavus*; *A. niger* y *C. albicans*) (80).

Gutierrez y cols. agregaron ZnO/Cu en concentraciones de 5/0.2% y 5/0.1% en sistemas adhesivos universales como una alternativa que aportara actividad antimicrobiana sin comprometer las propiedades biológicas, adhesivas y mecánicas. Los sistemas que contenían ZnO y Cu mostraron propiedades antibacterianas contra *S. mutans*, sin embargo, la concentración de 5/0.2% mostró mayor eficacia que el control. Concluyeron que puede ser una alternativa a las interfaces adhesivas con propiedades antimicrobianas y menos defectos en la interfaz resina-dentina (81).

Brahma y cols. evaluaron la actividad antimicrobiana del complejo macrocíclico hexadentado de cobre (II) contra *S. aureus*, el complejo de Cu fue capaz de reducir más del 95% de la carga bacteriana. En general, sus resultados sugieren que el complejo de Cu se puede utilizar para tratar infecciones por *S. aureus* resistentes a la meticilina (82).

Li y cols. utilizaron bacterias Gram negativas como *E. coli* y Gram positivas como *S. aureus* para evaluar las actividades antibacterianas de diferentes concentraciones de solución de  $\text{Cu}^{2+}$  en tres tipos de células: célula madre mesenquimatosa de médula ósea de rata (rBMSC), línea celular osteoblástica de ratón (MC3T3-E1) y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Las concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  incluyeron S1 (0.017  $\mu\text{M}$ ), S2 (0,05  $\mu\text{M}$ ), S3 (0,15  $\mu\text{M}$ ), S4 (0,45  $\mu\text{M}$ ), S5 (1,37  $\mu\text{M}$ ), S6 (4,12  $\mu\text{M}$ ), S7 (12,34  $\mu\text{M}$ ), S8 (37  $\mu\text{M}$ ), S9 (111  $\mu\text{M}$ ), S10 (333  $\mu\text{M}$ ) y S11 (1 mM), respectivamente. Los resultados mostraron que las HUVEC exhibieron una tolerancia significativamente mayor

a los iones que las MC3T3-E1 y las rBMSC. La concentración umbral de cobre para inhibición eficaz contra el crecimiento de bacterias es de 37  $\mu\text{M}$  (83).

### 5.1 Quitosano y nanopartículas de cobre

Para potenciar la actividad antibacteriana de los materiales, se han combinado varios tipos de agentes antibacterianos como las nanopartículas de cobre con quitosano. Éstas nanopartículas de cobre han sido usadas para aplicaciones biomédicas (84). La elección del quitosano como estabilizador de las nanopartículas de cobre se debe a su capacidad para quelar metales, lo que lo convierte en un candidato perfecto para la síntesis de nanopartículas de metal (85).

El quitosano es un quelante. Esta propiedad ha sido utilizada para preparar quitosano-nanopartículas en nanocompuestos para aplicaciones potenciales en varios campos (32). El acoplamiento del quitosano con nanopartículas metálicas puede maximizar su potencial antibacteriano y antifúngico, por lo que existe la necesidad de desarrollar más investigaciones en esta área (34).

Tabesh y cols. realizaron un estudio donde desarrollaron un compuesto de quitosano y cobre sobre acero inoxidable 316L para mejorar las propiedades antimicrobianas y la resistencia a la corrosión del sustrato. Las propiedades antibacterianas de los recubrimientos de nanocompuestos se analizaron usando varios Gram-positivos y Gram-negativos, dando como resultado una mejora significativa de la actividad antibacteriana y la resistencia a la corrosión del acero inoxidable (84).

Los compuestos basados en nanopartículas de óxido de cobre sintetizados con celulosa, quitosano y creatinina mostraron una excelente actividad bactericida contra bacterias y hongos patógenos, incluyendo bacterias altamente resistentes a los antibióticos. Este estudio se complementó con su biocompatibilidad con fibroblastos humanos (86).

Se realizó un estudio donde compararon quitosano, óxido de cobre, quitosano con óxido de cobre, óxido de cobre con semillas de neem y quitosano con óxido de cobre con

semillas de neem. Se encontró que este último tuvo una excelente actividad antimicrobiana contra patógenos Gram positivos y Gram negativos (87).

Rania y cols. elaboraron nanocompuestos bifuncionales y multifuncionales de quitosano con nanopartículas de plata, cobre y nanotubos de carbono. La actividad antimicrobiana del quitosano fue significativamente mejorada por el cobre, la plata y el carbono. Los nanocompuestos multifuncionales tuvieron una mayor actividad antimicrobiana en tiempos de contacto relativamente cortos tanto para *Staphylococcus aureus* y *E. Coli* así como para *Aspergillus flavus*. Esto podría atribuirse además del efecto del quitosano a la gran afinidad de las nanopartículas metálicas hacia los grupos amino y carboxílicos. Las nanopartículas de cobre se liberan dentro de las células bacterianas y pueden interactuar con las cadenas de ácido nucleico del ADN e interrumpir los procesos bioquímicos (88).

Gritsch y cols. realizaron complejos de quitosano y cobre. Para evaluar la respuesta biológica se realizaron ensayos de viabilidad y antibacterianos, realizados en fibroblastos, y en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Ellos observaron una excelente viabilidad celular y efecto antimicrobiano. Estos resultados prometedores fomentan una mayor investigación y caracterización de quitosano e iones metálicos terapéuticos (89).

## JUSTIFICACIÓN

En el cuerpo humano, una de las comunidades microbianas más complejas y heterogéneas se encuentra en la cavidad bucal, dando lugar a la formación de una biopelícula oral o biofilm, el cuál puede ser causante de diversas enfermedades como la caries dental, gingivitis, periodontitis, pero también puede desencadenar complicaciones en ciertos procedimientos dentales tales como colocación de implantes, entre otros. Por lo mismo, existe la necesidad de desarrollar compuestos antimicrobianos contra la proliferación de bacterias que se encuentran en la cavidad oral.

Es necesario establecer modelos que permitan determinar mecanismos de acción *in vitro* para el uso de nuevos compuestos que contribuyan a disminuir la carga bacteriana en cavidad bucal para evitar enfermedades o afecciones de esta.

En la presente investigación se plantea la idea de elaborar un sistema polimérico de quitosano modificado con diferentes compuestos, y comparar las propiedades antimicrobianas de cada uno de éstos, con el objetivo de poder ofrecer una nueva alternativa para utilizar en la cavidad bucal, el cual es eficaz contra microorganismos de la cavidad bucal.

Este estudio es innovador e interesante porque actualmente los estudios empleando la combinación de dichos materiales son escasos. Es viable porque se contó con los recursos necesarios para poder realizar esta investigación, además se han encontrado buenas propiedades antimicrobianas con el quitosano en otros estudios.

La relevancia de este estudio radica en conocer si existen diferencias en el potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* en las películas de quitosano, quitosano entrecruzado con glutaraldehído, quitosano con partículas de óxido de zinc y quitosano con nanopartículas de cobre; para poder implementar los compuestos efectivos en el tratamiento integral de las diferentes enfermedades bucales, ya que hasta la fecha no hay un antimicrobiano ideal para uso en cavidad bucal con alta efectividad antimicrobiana y que se pueda utilizar a largo plazo.

## HIPÓTESIS

Las películas de quitosano, quitosano entrecruzado con glutaraldehído y modificado con partículas de óxido de zinc y nanopartículas de cobre presentan propiedades antimicrobianas contra los *Staphylococcus aureus*.

## OBJETIVO GENERAL

Elaborar películas de quitosano y quitosano modificado para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar las propiedades fisicoquímicas de películas con quitosano, quitosano-glutaraldehído, quitosano-partículas de óxido de zinc, quitosano-partículas de cobre y quitosano-partículas de óxido de zinc y nano partículas de cobre.
2. Determinar la actividad antimicrobiana de películas con quitosano, quitosano-glutaraldehído, quitosano-partículas de óxido de zinc, quitosano-partículas de cobre contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Typhimurium* como control.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental *in vitro*.

### 2. METODOLOGÍA

#### 2.1 Materiales

Quitosano (peso molecular 223.332 g/mol y con 70%-80% de grado de desacetilación, obtenido de Aldrich), Ácido acético al 4.4%, Hidróxido de Sodio. Glutaraldehído grado II al 25% (masa molar 100.11 g/mol, obtenido de Aldrich). Óxido de Zinc (masa molar 81.39 g/mol, densidad de 5.606 g/cm<sup>3</sup>, obtenido de Sigma-Aldrich). Nanopartículas de cobre.

#### 2.2 Elaboración de películas de quitosano

Las películas de quitosano se obtuvieron mediante la disolución de 200 mg de quitosano en 30 ml de ácido acético a 0.4 M con de pH 4.5. La solución se agitó durante una hora hasta su completa disolución, posteriormente se vació en placas Petri de plástico y se secaron a 25°C aproximadamente durante 5 días, hasta la completa evaporación del ácido acético. Las películas resultantes se neutralizaron con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 5% y se lavaron con agua destilada. Por último, las películas se dejaron secar a temperatura ambiente (TA) (aprox. 25°C) durante 2 días aproximadamente.

##### 2.2.1 Elaboración de películas de quitosano entrecruzadas con GA (glutaraldehído)

Para la elaboración de las películas entrecruzadas, posterior a la disolución del quitosano se agregaron 0.3744 mM (150  $\mu$ L) de una solución de glutaraldehído al 25% en H<sub>2</sub>O como agente entrecruzante. La mezcla se dejó en agitación magnética durante 5 horas, posteriores a las cual se vertieron en las cajas Petri siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.

### 2.2.2 Elaboración de películas de quitosano con partículas de Óxido de Zinc (ZnO)

Previa disolución del quitosano con ácido acético, posterior a la agitación por una hora, se adicionaron partículas de óxido de zinc al 5% (peso/peso), la solución se dejó en agitación magnética durante 1 hora y se procedió a sonicar durante 15 minutos. Para finalizar se mantuvo en agitación magnética durante 2 minutos (Fig. 3). Las soluciones se vaciaron en pacas Petri de plástico, se secaron a TA para la evaporación del ácido acético residual y fueron neutralizadas con NaOH al 5%. Se lavaron con agua destilada y dejaron secar a TA durante 7 días.

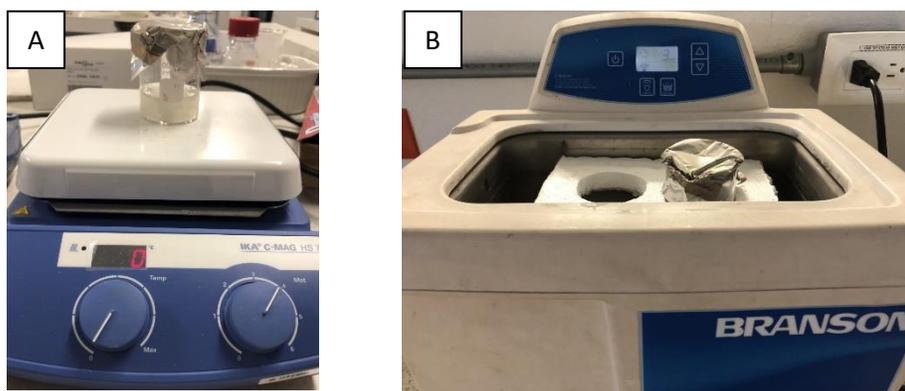


Fig. 3. A) agitación magnética de solución de quitosano B) sonicación de la solución.

### 2.2.3 Elaboración de películas de quitosano con nanopartículas de Cu

Se realizó el mismo procedimiento de la sección 2.2 reemplazando el óxido de zinc al 5% con nanopartículas de cobre al 1% (p/p). La determinación del tamaño de partículas de Cu se realizó por dispersión mecánica de luz (DLS) utilizando un equipo NANOTRAC WAVE II. El tamaño medio de partícula de Cu fue de  $\approx 150 \text{ nm} \pm 94.2 \text{ nm}$  (información adicional, ver el ANEXO 1).

#### 2.2.4 Elaboración de películas de quitosano con partículas de Óxido de Zinc y nanopartículas de Cu

Se llevó a cabo el procedimiento mencionado en el apartado 2.2, posteriormente se adicionaron las nanopartículas de Cu al 1% (información adicional en el Anexo 1) siguiendo el procedimiento mencionado antes.

En la Tabla 1, se resume las formulaciones estudiadas.

Tabla 1. Composición de las películas de quitosano y quitosano modificado.

	<b>Quitosano</b>	<b>Quitosano + GA</b>	<b>Quitosano + ZnO</b>	<b>Quitosano + Cu</b>	<b>Quitosano + ZnO + Cu</b>
<b>Quitosano</b>	200 mg	200 mg	190 mg	198mg	188 mg
<b>Glutaraldehído</b>		150 $\mu\text{L}$			
<b>Óxido de zinc</b>			10 mg		10 mg
<b>Cobre</b>				158 $\mu\text{L}$	158 $\mu\text{L}$

#### 2.3 Caracterización fisicoquímica de las películas de quitosano

Para conocer las propiedades de las películas obtenidas se caracterizaron mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía Raman, espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS), microscopía electrónica de barrido (MEB), análisis termogravimétrico (TGA), difracción de rayos X (RDX) y ángulos de contacto. Las condiciones de cada análisis se detallan a continuación.

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

Se obtuvieron los espectros de FTIR con películas de quitosano y quitosano modificado empleando un espectrofotómetro Nicolet Thermo-Scientific 8700 mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR). Los espectros se obtuvieron en el intervalo de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , con un detector DTGS-KBr, divisor de haz XT-KBr, cristal de selenuro de Zinc, resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y corrección de  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CO}_2$ .

### 2.3.2 Espectroscopía de Raman:

Se obtuvieron los espectros por Raman empleando el equipo InVia™ Raman microscope Renishaw (Wotton-under-Edge, Gloucestershir). Se utilizó el láser de 633 a una potencia de 50% y se analizó en el intervalo espectral de 100 a 3200  $\text{cm}^{-1}$  con 2 acumulaciones, rejilla de 1800, objetivo 50X, con un tiempo de exposición de 10 s.

### 2.3.3 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (espectroscopía XPS o ESCA) es una técnica analítica de superficie para análisis de la composición, tanto cualitativa como cuantitativa, que permite determinar el estado químico de los elementos en la superficie de una materia. Se obtuvo el survey (espectro inspección de 0 a 1200 eV), para identificar los elementos químicos presentes en un punto o área de la muestra, la mayoría de los elementos tienen sus energías de enlace en este intervalo. En este estudio se utilizó un Espectrómetro Thermo modelo K-Alpha con cátodo de AIEs.

### 2.3.4 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis para determinar la temperatura de degradación térmica del quitosano y quitosano modificado se llevó a cabo en un TGA-7 Perkin Elmer, en un intervalo de

temperaturas de 45° a 700°C, a una rapidez de calentamiento de 10°C/min, en atmósfera de nitrógeno.

### 2.3.5 Análisis elemental por energía dispersa de rayos X (EDX)

Para determinar la concentración de los componentes de las películas de quitosano y quitosano modificadas, se utilizó un espectrómetro de rayos X de energía dispersiva (EDX, INCA X-Slight Oxford Instruments) acoplado a un microscopio electrónico de barrido (SEM, JEOL JSM-6360LV), a 20 kV y 10 mm de distancia de trabajo. Las muestras fueron recubiertas con oro en un metalizador DESK II Denton Vacuum. Livetime 50.0s, voltaje de aceleración 8.00 kV, energía (eV) 1.3.

### 2.3.6 Difracción de rayos X

Se realizó un estudio de difracción de rayos X para conocer la estructura interna del polímero, en un difractómetro Bruker D-8 Advance en un intervalo de ángulos  $2\theta$  entre 10° y 60° a una rapidez de 5s tiempo de paso a 0.02 grados a 40kV – 30mA.

### 2.3.7 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

El MEB permite la observación y caracterización superficial de sólidos inorgánicos y orgánicos. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. Para conocer acerca de aspectos morfológicos de zonas microscópicas las películas fueron observadas a x1500 en un Microscopio Electrónico de Barrido Marca JEOL, modelo JSM-6360 LV.

### 2.3.8 Medición de ángulo de contacto

El ángulo de contacto está relaciona con la capacidad de humectabilidad, hidrofobicidad de la superficie y la capacidad de adhesión de sustancias como proteínas y otros compuestos sobre las superficies.

El estudio se realizó con un equipo Ramé Hart Model 500 Advanced Goniometer con la técnica de gota sésil. La medición del ángulo de contacto se llevó a cabo con agua destilada, búffer fosfato salino (PBS) y medio de cultivo, se realizaron tres mediciones de cada una en todas las películas.

#### 2.4 Ensayo de difusión en agar para determinar la actividad antibacteriana contra el *Staphylococcus aureus*

Los microorganismos utilizados fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella typhimurion* ATCC 14028, cepas de colección conservadas en el cepario del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco AC (CIATEJ), subsede Sureste. Ambas bacterias se cultivaron en caldo nutritivo para reactivación a 37°C por 24 horas. Posteriormente, fueron inoculadas en agar Mueller Hinton preparado en cajas Petri utilizando 100 µL de la suspensión de cada bacteria por separado a una concentración ajustada con solución salina de 10<sup>6</sup> UFC/mL, los microorganismos fueron difuminados en el medio utilizando un asa de vidrio.

Por otra parte, se cortaron discos de las películas de quitosano y quitosano modificado a una medida de 6 mm de diámetro y se colocaron en las placas Petri conteniendo el medio de cultivo Mueller Hinton previamente inoculadas con los microorganismos. Luego estas placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas. La actividad antimicrobiana se determinó como negativa o positiva de acuerdo con la presencia del crecimiento del microorganismo por encima o debajo de la película al observar al microscopio digital inalámbrico (modelo XWJ303), con magnificación de 500x y resolución de 1920\*1080p. Para diferenciar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano se utilizaron 10 µL de solución de cloruro de *p*-yodonitrotetrazolio (0.2 mg/mL) como indicador del crecimiento, después de 5 minutos de incubación se verificó la presencia de cambio de color rojo-rosado como indicador de crecimiento microbiano.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Caracterización fisicoquímica de las películas

#### 1.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron los espectros de las películas de quitosano, quitosano con glutaraldehído, quitosano con partículas de cobre al 1%, quitosano con óxido del zinc al 5% y quitosano con partículas de cobre al 1% y óxido de zinc al 5% (figura 4).

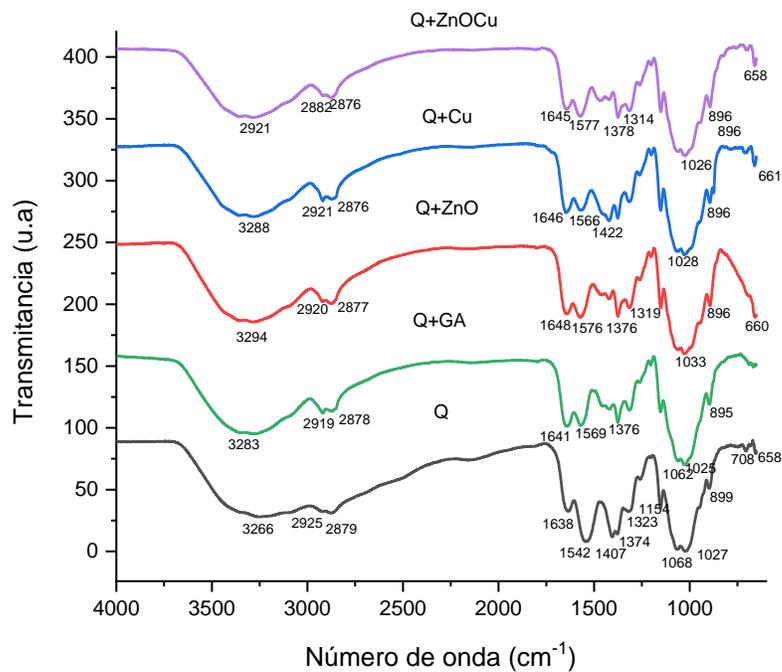


Figura 4. Espectro FTIR de las películas de quitosano y quitosano modificadas.

Las bandas características del quitosano se observan a 3266 cm<sup>-1</sup> debido a la vibración de estiramiento de los enlaces O-H y N-H, 2925 cm<sup>-1</sup> y 2879 cm<sup>-1</sup> asociados a los grupos metilo (90). Ki y cols. observaron una banda a 2925 cm<sup>-1</sup> donde indicaron la existencia de un anillo de piranosa de la cadena principal del quitosano y del grupo

carbonilo de N-acetil-D-glucosamina de la quitina (91). Se observa una banda a  $1638\text{ cm}^{-1}$  encontrada también por Subhani y cols. a  $1636\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración de estiramiento del grupo amida (amida I) derivada de los residuos no desacetilizados del quitosano (92). La banda observada a  $1542\text{ cm}^{-1}$  se atribuye al grupo amida II. Las bandas que se encuentran a  $1407\text{ cm}^{-1}$  y  $1374\text{ cm}^{-1}$  representan los modos de deformación de los enlaces  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , a  $1323\text{ cm}^{-1}$  asignada a los grupos amida III, esta banda se usa comúnmente para calcular el grado de acetilación. Las bandas entre  $1154\text{ cm}^{-1}$  y  $1027\text{ cm}^{-1}$  se asignan a C-O-C de los enlaces glucosídicos. Las bandas observadas en el intervalo de  $1155$  y  $800\text{ cm}^{-1}$  son conocidos por ser vibraciones de estiramiento C-O del quitosano (93).

En el espectro de infrarrojo de la película de quitosano puro se observa una banda  $1638\text{ cm}^{-1}$  la cual sufrió un desplazamiento en la película de quitosano entrecruzado con GA a  $1641\text{ cm}^{-1}$  que pertenece al enlace C=O formado durante la reacción. Beppu y Cols. informaron que la reacción de entrecruzamiento entre el GA y los grupos amino del quitosano mostraban un aumento a  $1655\text{ cm}^{-1}$ , esta banda se sobrepondría con las de  $1653\text{ cm}^{-1}$  obtenida en el quitosano sin entrecruzar (94). Cuando el quitosano se entrecruza con el glutaraldehído la banda intensa a  $1650\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la amida I y al enlace imina (95). Además, desapareció la banda  $1154\text{ cm}^{-1}$  en la película de quitosano con glutaraldehído que se observa en la de quitosano sin entrecruzantes, lo que coincide con lo reportado por otros autores (49). Adicionalmente se observa una disminución de intensidad y desplazamiento de la banda ubicada a  $1542\text{ cm}^{-1}$  observada en la película de quitosano respecto a la película de quitosano entrecruzada con glutaraldehído encontrada a  $1569\text{ cm}^{-1}$ . Oyrton y cols. revelaron que el incremento de glutaraldehído en la secuencia de quitosanos modificado causó un aumento en la intensidad de la frecuencia de enlace etileno a  $1562\text{ cm}^{-1}$  (96). Chen y cols. compararon los espectros de quitosano, quitosano con hidrato de ácido silicotungstico (HAS) y quitosano con HAS entrecruzado con GA, y observaron que la intensidad de la banda de los grupos hidroxilo para el quitosano con hidrato de ácido silicotúngstico fue ligeramente más intensa que en la muestra entrecruzada con GA, esto indicaría que el GA hizo menos hidrofílica la muestra (97).

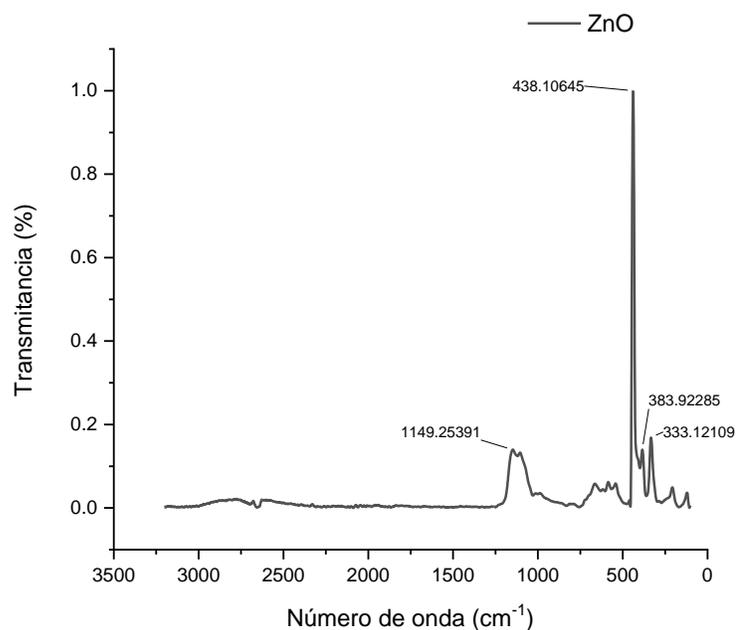


Figura 5. Espectro FTIR del ZnO.

En el espectro FTIR del ZnO (figura 5) se observan bandas a  $1149\text{ cm}^{-1}$ ,  $438\text{ cm}^{-1}$ ,  $383\text{ cm}^{-1}$  y  $333\text{ cm}^{-1}$ . En la película de quitosano con óxido de zinc al 5% se detectó un ligero cambio en las bandas de  $3294\text{ cm}^{-1}$ ,  $2877\text{ cm}^{-1}$ , y un desplazamiento del pico  $1648\text{ cm}^{-1}$  atribuido al modo de estiramiento O-H del grupo hidroxilo. Se observa la desaparición del pico  $1407\text{ cm}^{-1}$  encontrada en la película de quitosano. También se encuentra una banda a  $660\text{ cm}^{-1}$  la cual confirma la presencia de las partículas de óxido de zinc (98,99). Dobruka y Dugaszweska afirman que las bandas atribuidas a la vibración del enlace Zn-O-Zinc se encuentran en las bandas  $400\text{ cm}^{-1}$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  (100); Abdolhossien y cols. también encontraron una banda a  $438\text{ cm}^{-1}$  la cuál confirmó la presencia de las partículas de óxido de zinc (57). En un estudio realizado por Yousseff y cols. al comparar la película de quitosano puro con la película de quitosano con óxido de zinc encontraron unas nuevas bandas de absorción a  $500 - 800$  y  $580\text{ cm}^{-1}$ , estas fueron atribuidas a la vibración de los grupos O-Zn-O respectivamente (66).

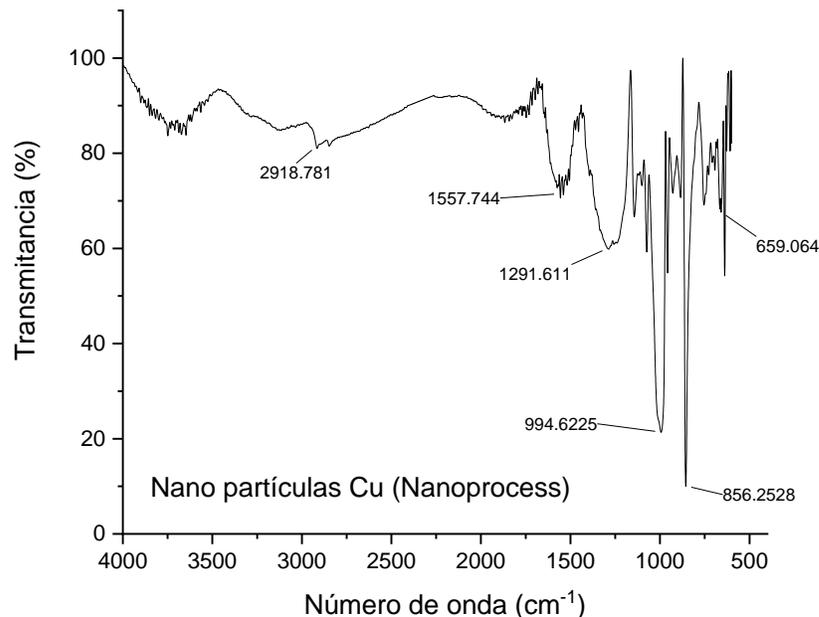


Figura 6. Espectro FTIR de las nanopartículas de Cu.

En el espectro por FTIR de las nanopartículas de cobre, se encontraron bandas a  $2918\text{ cm}^{-1}$ ,  $1557\text{ cm}^{-1}$ ,  $1291\text{ cm}^{-1}$ ,  $994\text{ cm}^{-1}$ ,  $856\text{ cm}^{-1}$ . Diversos estudios reportan que las bandas registradas en el intervalo de  $700\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  se asignan a las vibraciones Cu-O, lo cual confirmaría la presencia de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (101,102). En este estudio se encontró una banda a  $659\text{ cm}^{-1}$  la cual coincide con la película de quitosano y Cu (Figura 6). Ceja-Romero y cols. encontraron esta banda a  $572\text{ cm}^{-1}$  (103). Maldonado y cols. observaron que la presencia de nanopartículas de cobre en la matriz de quitosano produce una disminución en la intensidad de la señal asociada a las vibraciones de los grupos hidroxilo y amino (OH/NH) de la cadena polimérica, la cual señala que es proporcional a la concentración de partículas añadidas. Esto sugiere que las nanopartículas de cobre y los iones  $\text{Cu}^{2+}$  liberados durante el mezclado en solución interactúan con los grupos HO/NH de la cadena de quitosano, favoreciendo la formación de quelatos (104). Gritsch y cols. compararon muestras de quitosano y quitosano con Cu y encontraron una disminución en las bandas amida y amina a  $1650\text{cm}^{-1}$  y  $1600\text{cm}^{-1}$  (89)

Con respecto a las películas de quitosano con óxido de zinc y partículas de cobre, se encontraron diferencias en los espectros que se observan en las bandas de  $1542\text{ cm}^{-1}$  y  $1407\text{ cm}^{-1}$  los cuales disminuyen de intensidad cuando se añaden las partículas de cobre y el óxido de zinc comparados con la película de quitosano. Se observa que la banda  $1648\text{ cm}^{-1}$  encontrada en la película de quitosano con óxido de zinc al 5% sufrió un desplazamiento a  $1645\text{ cm}^{-1}$  en la película de quitosano con óxido de zinc y cobre, esta banda igual fue encontrada por Miri y cols., en el espectro de las nanopartículas de zinc quienes la atribuyen al modo de estiramiento de O-H del grupo hidroxilo (57).

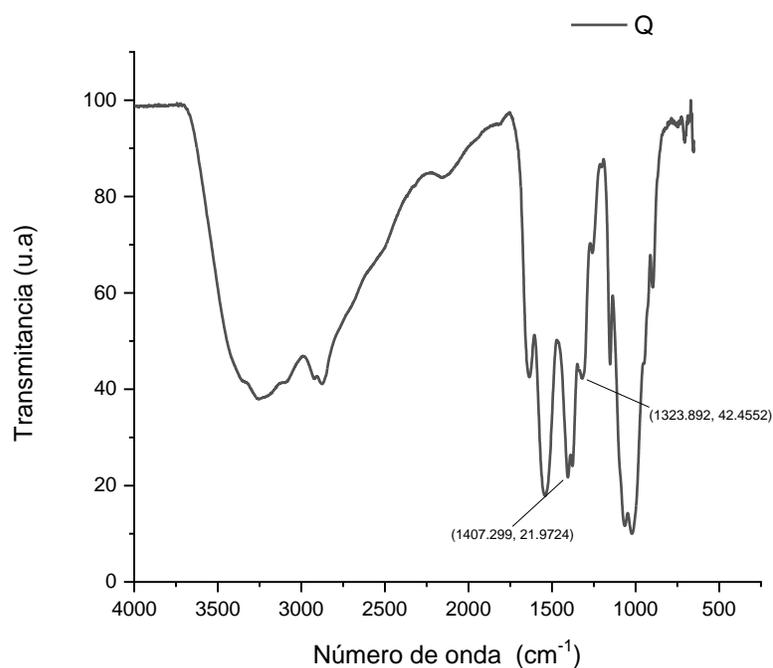


Figura 7. Espectro de FTIR de películas de quitosano.

Se realizó el cálculo de N-acetilación del quitosano siguiendo la fórmula de Brugnerotto, tomando las bandas características observadas en la figura 7 de la amida III localizada a  $1323\text{ cm}^{-1}$  y como referencia la banda de la amida secundaria a  $1407\text{ cm}^{-1}$  (105). Finalmente, se obtuvo un grado de desacetilación de 88.66%.

$$\text{Grado de N-acetilación} = 31.92 (A_{1323}/A_{1407}) - 12.2$$

$$\text{Grado de desacetilación} = 100 - 11.34\% = 88.66\%$$

## 1.2 Espectroscopía de Raman

Se presentan los espectros Raman de las películas de quitosano y quitosano entrecruzado con glutaraldehído, quitosano con partículas de óxido de zinc al 5%, quitosano con partículas de cobre al 1% y quitosano con óxido de zinc al 5% y nanopartículas de cobre al 1% (Fig. 8).

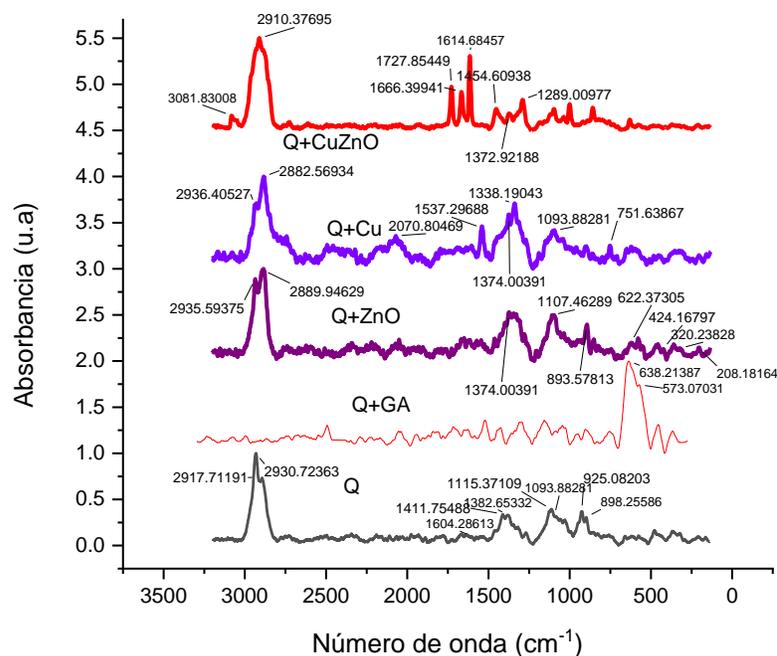


Figura 8. Espectro Raman de películas de quitosano y quitosano modificado

Las principales señales que se observaron en las películas de quitosano fueron  $2930\text{ cm}^{-1}$  atribuido a la vibración de estiramiento  $\nu(\text{CH}_2)$ ;  $1604\text{ cm}^{-1}$  asignado a la vibración de flexión en el plano  $\delta(\text{NH}_2)$ ;  $1382\text{ cm}^{-1}$  asignado a vibraciones combinadas de flexión en el plano de varios grupos  $\delta(\text{CH}_2)$ ,  $\delta(\text{CH})$ ,  $\delta(\text{OH})$ ;  $1093\text{ cm}^{-1}$  atribuido a vibraciones combinadas de grupos  $\nu(\text{C-O-C}) + \nu(\phi) + \nu(\text{C-HO}) + \nu(\text{C-CH}_2) + \delta(\text{CH}) - \rho(\text{CH}_2) + \rho(\text{CH}_3)$ .

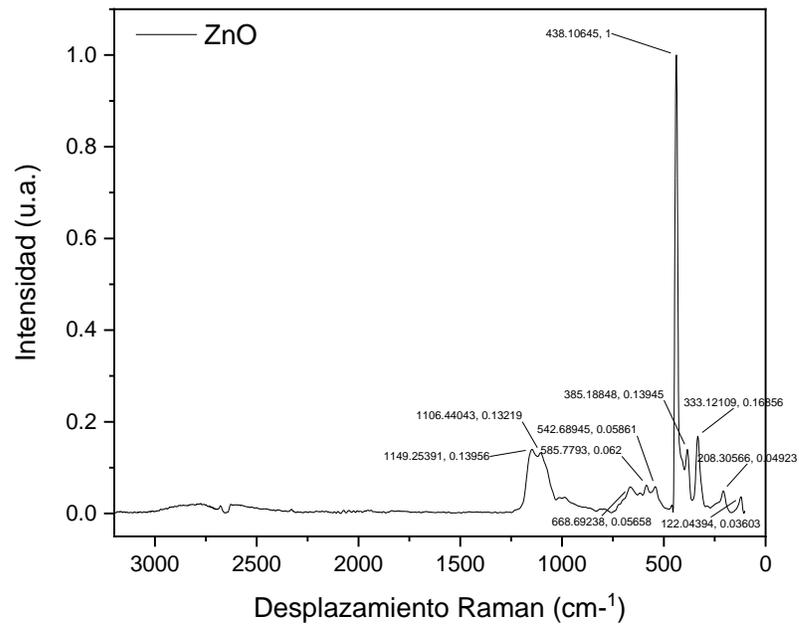


Figura 9. Espectro Raman de las partículas de óxido de zinc

Se observan picos de las partículas de óxido de zinc (figura 9) a 122 cm<sup>-1</sup>, 333 cm<sup>-1</sup>, 385 cm<sup>-1</sup>, 438 cm<sup>-1</sup>, 542 cm<sup>-1</sup>, 585 cm<sup>-1</sup>, 1106 cm<sup>-1</sup> y 1149 cm<sup>-1</sup>. También se encontró un pico a 208 cm<sup>-1</sup> el cual es un pico característico del zinc, se observó de igual manera en la película de quitosano y óxido de zinc, lo que confirma la presencia de ZnO en esta película; se observaron también desplazamientos de los picos en 320 cm<sup>-1</sup>, 424 cm<sup>-1</sup> y 622 cm<sup>-1</sup>. Miri y cols. encontraron una región de alta intensidad entre 300 cm<sup>-1</sup> y 600 cm<sup>-1</sup> y una región de baja intensidad entre 100 cm<sup>-1</sup> y 120 cm<sup>-1</sup> en el espectro Raman de partículas de óxido de zinc, posiblemente debido a su estructura hexagonal (57).

### 1.3 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) y análisis elemental por energía dispersiva de rayos x (EDX)

Se llevó a cabo la caracterización por XPS y EDX de las películas de quitosano y quitosano modificado. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición elemental (% atómico) de películas de quitosano y quitosano modificado, por XPS y EDX.

%	Q		Q+GA		Q+ZnO		Q+Cu		Q+ZnOCu	
	XPS	EDX	XPS	EDX	XPS	EDX	XPS	EDX	XPS	EDX
C	88.59	52.64	77.52	62	87.28	64.69	85.6	58.62	87.93	55.13
O	11.41	41.73	18.63	38.01	11.09	33.54	12.63	38.82	11.4	41.73
N		5.63	3.85		1.63	1.72	1.77	2.5		3.12
ZnO						0.05			0.66	
Cu								0.07		0.02

Se observa que el porcentaje de C se mantiene estable en todas las películas analizadas con una ligera disminución en la película de quitosano con glutaraldehído y un aumento del porcentaje de O en la misma película comparada con las demás.

En el análisis se observa que el N no fue detectado en la película de quitosano ni en la película de quitosano modificado con partículas de cobre al 1% y óxido de zinc al 5%.

No se observa Zn en la película de quitosano modificado con óxido de zinc al 5%, sin embargo, si se observó en un 0.66% en la película de quitosano con óxido de zinc al 5% y partículas de cobre al 1%.

Tampoco se detectó ningún porcentaje de Cu en la película modificada con partículas de cobre al 1% ni en la de quitosano con partículas de cobre al 1% y óxido de zinc al 5%, esto puede ser debido a que la concentración de Cu añadido a las películas es muy baja o a que no se encuentra en la superficie.

En la tabla 2 se observa en el EDX el carbono como elemento predominante con su valor más alto de 64% en las películas de quitosano con partículas de zinc y en su valor más bajo de 52% en las películas de quitosano. Se encontró oxígeno con una variación de 33% a 41% en todas las películas analizadas. En menor porcentaje aparece el nitrógeno con un porcentaje de 1.7% a 5.6%. Por último, se observa el zinc con un 0.05% sólo

detectado en la película de quitosano con óxido de zinc y el cobre en un 0.02% detectado únicamente en la película de quitosano con óxido de zinc y partículas de cobre.

En el EDX se observa que el C aumentó de 52.64 a 62 en la película de quitosano al compararla con la película de quitosano entrecruzada con glutaraldehído, de igual manera se observa que el N desapareció en ésta última. Oyrton y cols. afirman que la presencia de glutaraldehído causa un incremento en el porcentaje de carbono, e hidrógeno y una disminución de la cantidad de nitrógeno con el grado creciente de glutaraldehído (96). Sin embargo, Li y cols. observaron una disminución del C en la película de quitosano con glutaraldehído (49).

#### 1.4 Análisis Termogravimétrico (TGA)

En la figura 10 se pueden apreciar las gráficas de pérdida de masa residual contra temperatura y la derivada de la masa residual contra la temperatura del TGA realizado a las películas de quitosano y quitosano modificado. Se utilizará la temperatura máxima y el 50% de peso perdido para comparar la estabilidad térmica.

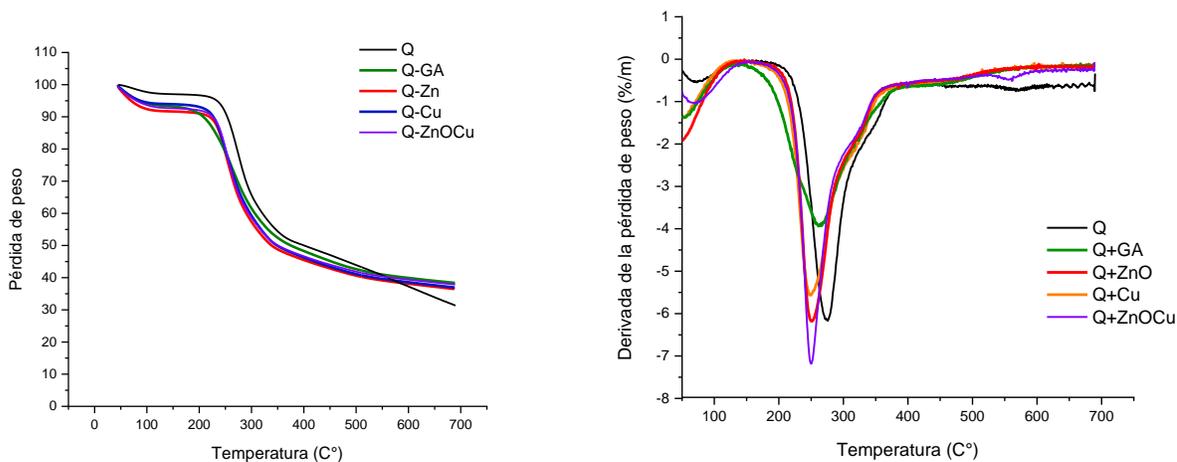


Figura 10. Termogramas de TGA de películas de quitosano y quitosano modificado.

Tabla 3. Degradación térmica de las películas de quitosano y quitosano modificado.

<b>Películas</b>	<b>T<sub>d</sub></b> <b>(°C)</b>	<b>Pérdida de masa al 50%</b> <b>(°C)</b>
Película Q	276	358
Película Q + GA	262	375
Película Q + ZnO	251	338
Película Q + Cu	247	348
Película Q + ZnOCu	249	350

Consistente con estudios previos, ocurre una degradación entre 250°C – 350°C para las muestras con quitosano (92). En la gráfica derivada se observa que la temperatura de degradación de la película de quitosano se da aproximadamente a los 276°C y se observa un desplazamiento a temperaturas menores en las películas de quitosano modificadas. Ki y cols. encontraron en el TGA de polvo de quitosano dos picos, uno alrededor de 100°C y el segundo sobresaliente a 300°C, la primera correspondiente a la vaporización de agua contenida en el polímero y la segunda a la pirólisis de las principales cadenas de quitosano y vaporización de los gases volátiles producidos (91). En estudios anteriores se ha atribuido la pérdida de peso de la primera etapa principalmente a la pérdida de agua, mientras que en la segunda y tercera etapa puede deberse a la ruptura de la cadena principal y la descomposición de las unidades de glucosa (49).

Cuando el quitosano se entrecruza con glutaraldehído se registra una T<sub>d</sub> a 262°C; y a 375°C la pérdida del 50% de masa Tabla 3, por lo que fue la película con mayor estabilidad térmica en las muestras analizadas, esto podría deberse al entrecruzamiento entre el quitosano y el GA. Sin embargo, Li y cols. afirman que la estabilidad térmica del quitosano con GA es menor que la del quitosano independientemente de la temperatura (49).

Con respecto a el óxido de zinc al 5% y a las partículas de cobre al 1% la temperatura de descomposición disminuye en comparación con las otras muestras, lo que

indicaría una menor estabilidad térmica, cuando se adicionan estos metales. Está degradación observada en todas las muestras analizadas se atribuye a la pérdida de CO<sub>2</sub>.

### 1.5 Difracción de rayos X (DRX)

Los cambios en la cristalinidad del quitosano son importantes no solo en términos de degradación del polímero y propiedades mecánicas, sino también en términos de absorción y ángulos de contacto, que son cruciales durante la hidratación o transporte del fármaco (33).

Se observa el perfil de difracción de rayos X del quitosano en la figura 11. El quitosano tiene una celda unitaria ortorrómbica con un pico principal a  $2\theta = 9.6^\circ$ , otro a  $2\theta = 20.1^\circ$  grados, y uno último a  $2\theta = 5.7^\circ$ , lo que coincide con diversos artículos (49). El pico del ángulo a  $2\theta = 20.1^\circ$  es atribuido a la fase cristalina I y el ángulo de mayor intensidad a la fase cristalina II, que presentan cadenas menos hidratadas y rígidas dispersas en una fase amorfa (106).

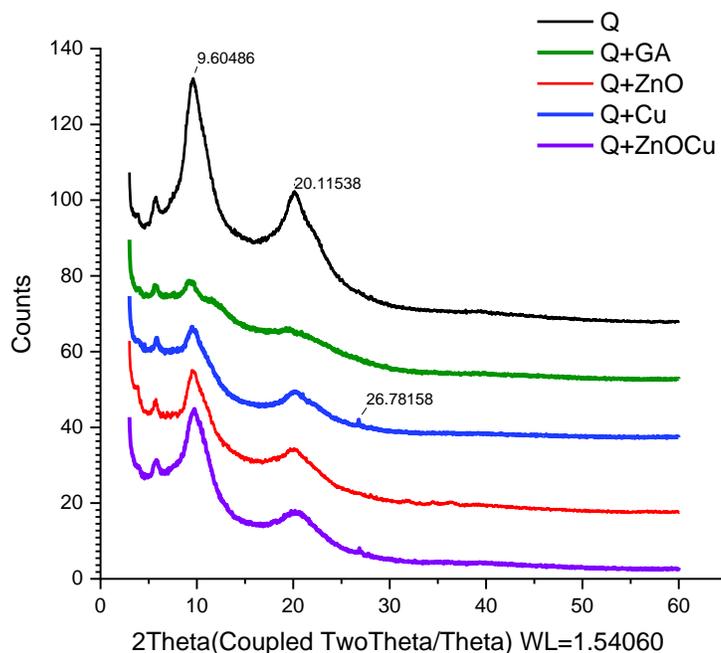


Figura 11. Patrón de difracción de rayos X del quitosano y quitosano modificado.

Se observa mayor intensidad en los picos  $2\theta = 9.6^\circ$  y  $2\theta = 20.1^\circ$  en la película de quitosano puro comparada con las demás películas, lo que podría indicar una mayor cristalinidad en la película sin modificar. Confirmando lo anterior por diversos estudios que afirman que el entrecruzado reduce la cristalinidad de los polímeros al interferir en la formación de cristales (107).

Se observa una gran disminución de la intensidad de los picos entre el quitosano sin modificar y el quitosano entrecruzado con glutaraldehído. El pico a  $2\theta = 20.1^\circ$  casi desaparece, lo que coincide con lo encontrado por Chuc y cols. (108). En un estudio se observó la desaparición de los picos característicos del quitosano y la aparición de un pico débil en  $2\theta = 15^\circ$  en el quitosano entrecruzado con glutaraldehído. Esto puede atribuirse a la deformación del enlace de hidrógeno en el quitosano original debido a la sustitución de los grupos hidroxilo y amino (49). De igual manera, Chen y cols. encontraron una disminución en la cristalinidad de la membrana de quitosano y del hidrato de ácido silicotúngstico al entrecruzarlos con GA (97). Por lo que concluye que la cristalinidad del quitosano disminuye cuando se entrecruza con glutaraldehído.

En la película de quitosano con óxido de zinc se detectaron picos a  $2\theta = 3.85^\circ$  y  $19.6^\circ$ . Se encontró un ligero pico a  $2\theta = 32.44^\circ$  el cual fue también detectado en el estudio de Beyene. Ellos obtuvieron patrones de DRX de ZnO sintetizado químicamente y encontraron picos de difracción en  $2\theta = 32.18^\circ, 34.02^\circ, 36.67^\circ, 47.95^\circ$  (59). Ai y cols. encontraron en los patrones de DRX la presencia de ZnO en los picos a  $2\theta = 31.3^\circ, 36.2^\circ, 47.5^\circ$  y  $56.6^\circ$  que corresponden a los planos cristalográficos 110, 101, 102 y 110 (109). El pico encontrado a  $2\theta = 19.6^\circ$  también fue observado por Youssef y cols., el cual está relacionado con la presencia de quitosano y todas las características de las nanopartículas de ZnO (66).

En el patrón de difracción de rayos X de las películas de quitosano modificadas con  $\text{Cu}_2\text{O}$ , evidencia la presencia de este último debido al pico encontrado a  $2\theta = 26.7^\circ$  correspondiente al plano cristalográfico 110. En un estudio donde evaluaron la estabilización de nanopartículas de cobre y plata en solución coloidal de quitosano

modificado químicamente, realizaron DRX de quitosano con cobre y los patrones exhibieron picos agudos que se observaron en los ángulos de  $16.9^\circ$ ,  $22.5^\circ$  y  $26.8^\circ$  que corresponden a los planos cristalográficos 110, 210 y 002 (110). En un estudio realizado por Aguilar y cols. sobre ionómero de vidrio y nanopartículas de cobre donde evaluaron sus propiedades físico químicas, mecánicas y adhesivas, se encontraron planos en el patrón de DRX en  $43.3^\circ$  (111),  $50.4^\circ$  (200) y  $74^\circ$  (220) para el Cu y otro plano en  $36^\circ$  correspondiente al plano 110 del  $\text{Cu}_2\text{O}$  (111).

### 1.6 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las imágenes por MEB (a una amplitud de 1500X), de las películas obtenidas se presentan en la figura 12. Se observan superficies lisas en las películas de quitosano, quitosano entrecruzado con glutaraldehído, quitosano con óxido de zinc al 5% y quitosano con partículas de cobre al 1%. La película de quitosano con partículas de óxido de zinc al 5% y cobre al 1% se observa lisa de igual manera, pero con partículas de zinc y cobre en la superficie, lo que puede deberse a la aglomeración de las partículas agregadas.

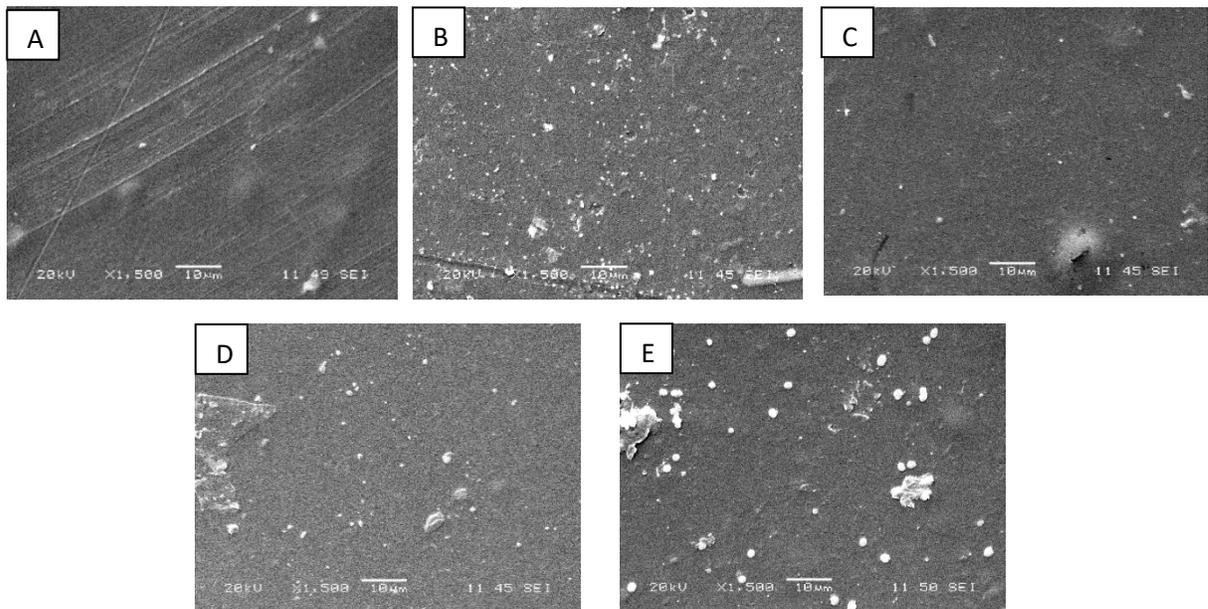


Figura 12. Imágenes MEB. (A) Quitosano de medio peso molecular, (B) Q entrecruzado con GA, (C) Q con óxido de zinc al 5%, (D) Q con partículas de cobre al 1%, (D) Q con óxido de zinc al 5% y partículas de cobre al 1%.

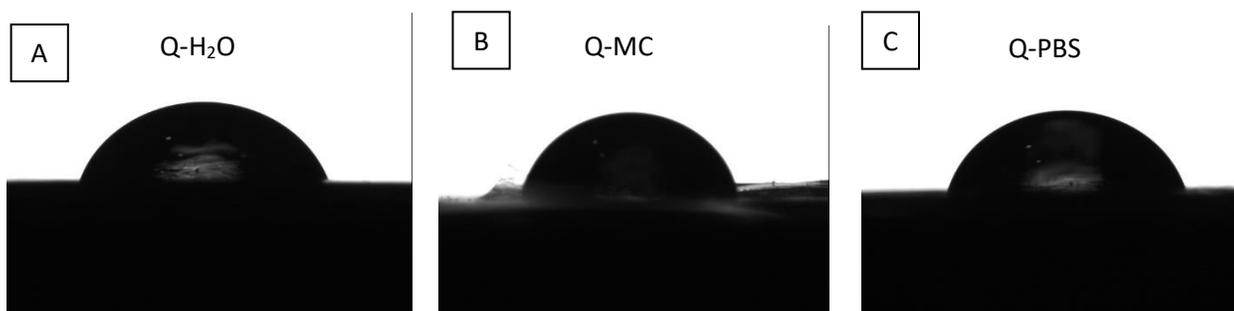
Li y cols. observaron una superficie rugosa y porosa del entrecruzado de quitosano y glutaraldehído, lo que puede deberse a que el entrecruzamiento es insuficiente de quitosano y glutaraldehído o de los grupos glutaraldehído injertados parcialmente en el quitosano lo que indicaría que la reacción se produce superficialmente (49).

Se sugiere que la presencia de menor contenido de nanopartículas de cobre conduce a evitar la deposición masiva y aglomeración de las partículas sobre la película lo que puede resultar en un recubrimiento uniforme (84).

De acuerdo con Subhani y cols. encontraron una superficie filamentosa y porosa del quitosano purificado y sus derivados (92). Por su parte, Gritsch y cols. evaluaron películas de quitosano y quitosano con  $\text{Cu}^{+2}$ . Las muestras se caracterizaron por tener una superficie homogénea y lisa (89), lo cual coincide con lo encontrado en nuestro estudio.

### 1.7 Medición del ángulo de contacto

Los ángulos de contacto se usaron como una indicación de hidrofilia en las películas. En la figura 13 se observan los ángulos de contacto medidos en agua destilada, PBS y medio de cultivo (MC).



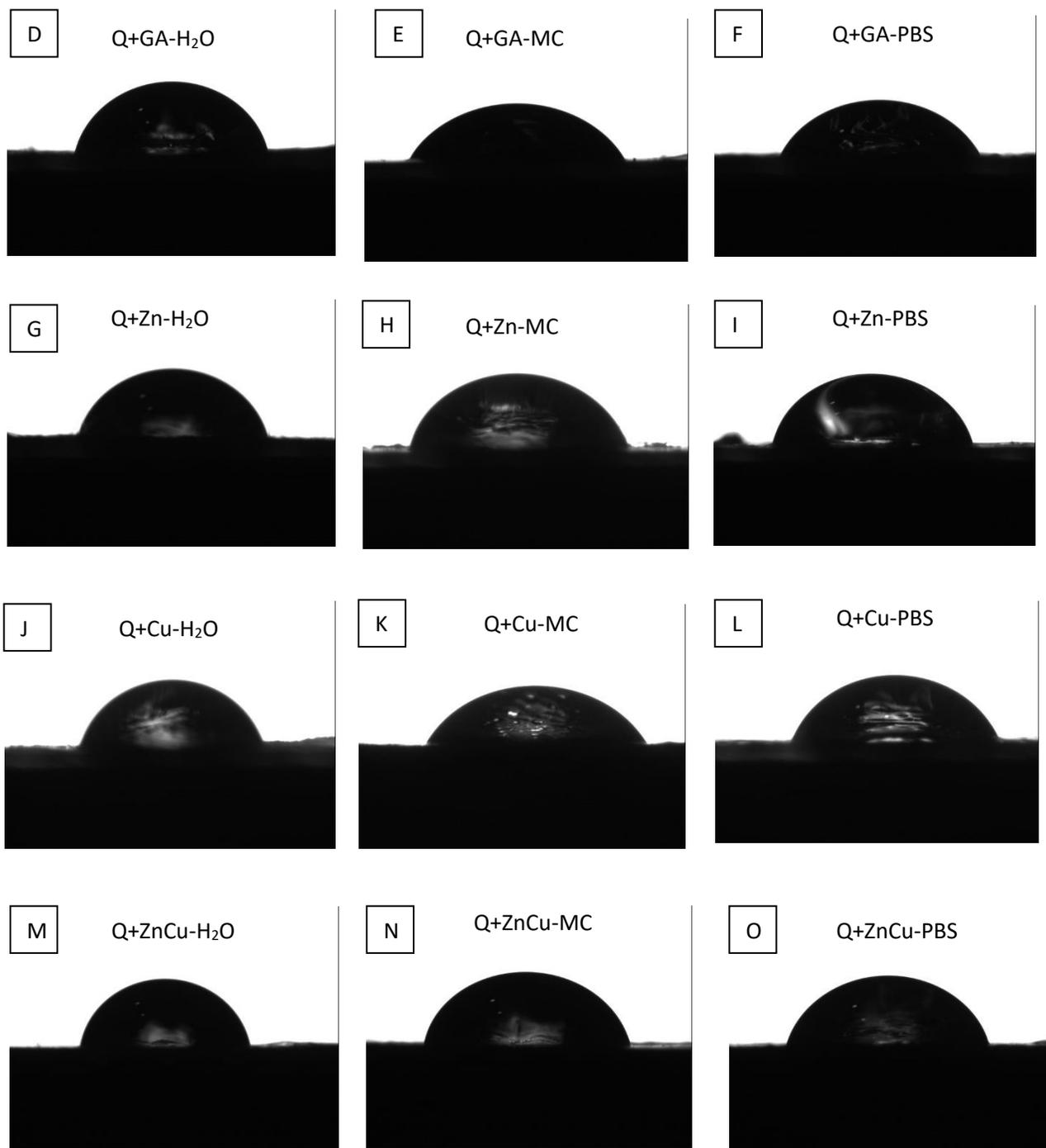


Figura 13. Ángulos de contacto de películas de quitosano y quitosano modificado.

Tabla 4. Ángulos de contacto de las películas de quitosano y quitosano modificado.

		<b>Q</b>	<b>Q+GA</b>	<b>Q+ZnO</b>	<b>Q+Cu</b>	<b>Q+ZnOCu</b>
<b>H2O</b>	<b>Promedio</b>	88.29°	88.75°	89.01°	88.40°	89.51° ±0.41
		±0.33°	±0.22°	±0.39°	±0.58°	
<b>MC</b>	<b>Promedio</b>	88.60°	87.35°	103.33°	87.16°	88.41° ±0.69
		±0.54°	±0.56°	±22.72°	±0.49°	
<b>PBS</b>	<b>Promedio</b>	88.41°	87.31°	89.00°	87.98°	89.01° ±0.35
		±0.33°	±1.14°	±0.53°	±0.83°	

Se puede observar en la Tabla 4 ángulos de 88° y 89° al agregar agua destilada a todas las películas analizadas. Se observaron muy pocas variaciones en los ángulos de la película de quitosano al agregar H<sub>2</sub>O, MC y PBS. Los ángulos encontrados por Naito y cols. en las películas de quitosano con H<sub>2</sub>O fueron menores a 72° lo que los clasifica como débilmente hidrofílicos (112). Baroudi y cols. observaron un aumento en la absorción significativamente durante la primera hora y después de eso las películas de quitosano se convirtieron en gel y se disolvieron gradualmente; esto puede atribuirse a la mayor habilidad de quitosano para formar enlaces de hidrógeno con moléculas de agua destruyendo así las interacciones intermoleculares en las cadenas de quitosano, por lo que al momento de depositar las gotas de agua en las membranas de quitosano fueron absorbidas inmediatamente (33).

La película en la cual se registró un mayor ángulo de contacto al agregar medio de cultivo fue la de quitosano con óxido de zinc al 5% con 103° esto puede deberse a que al agregar las partículas de óxido de zinc disminuye la hidrofiliidad de la película. Las películas más hidrofílicas fueron las entrecruzadas con GA con 87° en medio de cultivo, esto coincide con lo encontrado en el estudio de Chuc y cols. (108) , al igual que las de quitosano con cobre al 1%.

Se observa un ligero aumento del ángulo de contacto al utilizar H<sub>2</sub>O en la película de Q con GA al compararla con la película de quitosano sin modificar. Sin embargo, la diferencia es muy reducida para afirmar que la película con GA es más hidrófoba. Beppu y cols. compararon membranas de quitosano y quitosano entrecruzado con glutaraldehído, y concluyeron que el entrecruzamiento con glutaraldehído hace que el quitosano se vuelva más hidrófobo. El entrecruzamiento con glutaraldehído hace que la membrana sea más hidrófoba ya que los grupos amino están bloqueados con cadenas alifáticas (94). Así mismo, Chen y cols. observaron en sus membranas de quitosano e hidrato de ácido silicotúngstico que el ángulo de contacto aumentó al agregar glutaraldehído, lo que indica una disminución en la hidrofilia al entrecruzar con GA. Esto fue atribuido a una disminución de los grupos hidrofílicos -OH o -NH<sub>2</sub> en las membranas como resultado de la reacción entre los grupos -OH o -NH y los grupos aldehído del GA (97). En la película de quitosano con zinc y H<sub>2</sub>O se observa un ángulo de 89.01°, en la de quitosano con cobre de 88.40° y en la de quitosano con zinc y cobre de 89.51°. Por lo que la adición de metales como el cobre podría volver a la película de quitosano más hidrofílica.

Al agregar PBS en la película de solo quitosano se observa un ángulo de 88.41°, este ángulo disminuyó a 87.31° al agregar GA. Se observa un mayor ángulo de contacto con 89° en las películas con óxido de zinc y en las de óxido de zinc con partículas de cobre. Las más hidrofílicas fueron las entrecruzadas con glutaraldehído y la de quitosano con partículas de cobre, ambas con 87°. La actividad antibacteriana de Q-GA puede deberse a su alta hidrofilia (49).

Al parecer no ocurre una variación significativa en la humectabilidad de la película de quitosano al agregar las partículas de cobre, los valores se observaron entre 87° y 89°. Confirmando lo encontrado por Gritsch y cols. los cuales no encontraron diferencias significativas en los ángulos de contacto del quitosano y sus versiones modificadas con cobre que estuvieron en el rango de 75° y 90°. Sin embargo, aparecen cambios en los ángulos de las muestras de quitosano a lo largo del tiempo a la mitad de su valor inicial, lo cual no ocurre en las muestras con cobre, se atribuye este comportamiento a que la quelación del mismo ion cobre por dos cadenas de quitosano adyacentes induce un

entrecruzamiento de la matriz de polisacárido que es capaz de reducir las grietas en la superficie de la muestra (89).

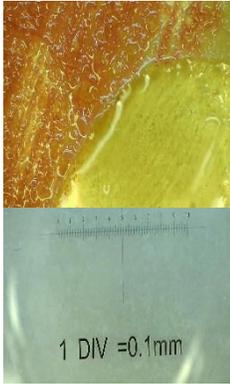
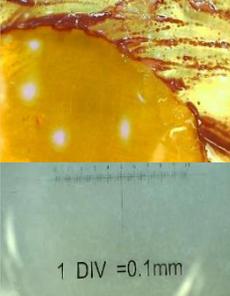
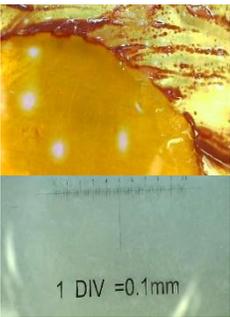
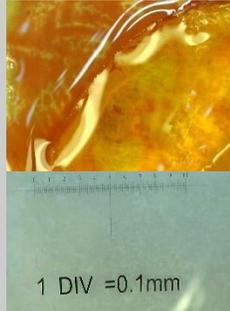
Se sabe que el ángulo de contacto es mayor para superficies más rugosas que para superficies más lisas (113). Es importante mencionar que los ángulos de contacto observados en este estudio se tomaron desde la superficie secada al aire, esto quiere decir una superficie rugosa, por lo que pudo influir en los resultados.

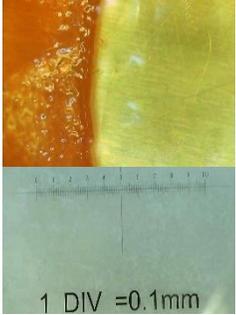
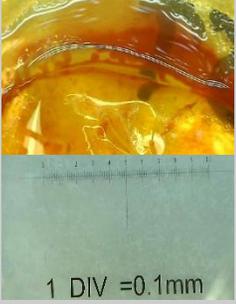
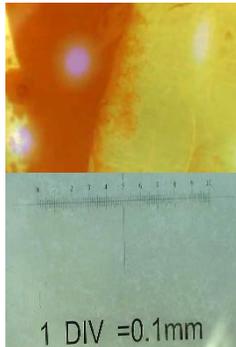
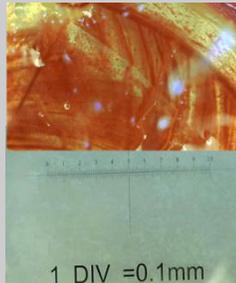
#### 1.8 Ensayo de difusión en agar para determinar la actividad antibacteriana contra el *Staphylococcus aureus* y *S. typhimurium*

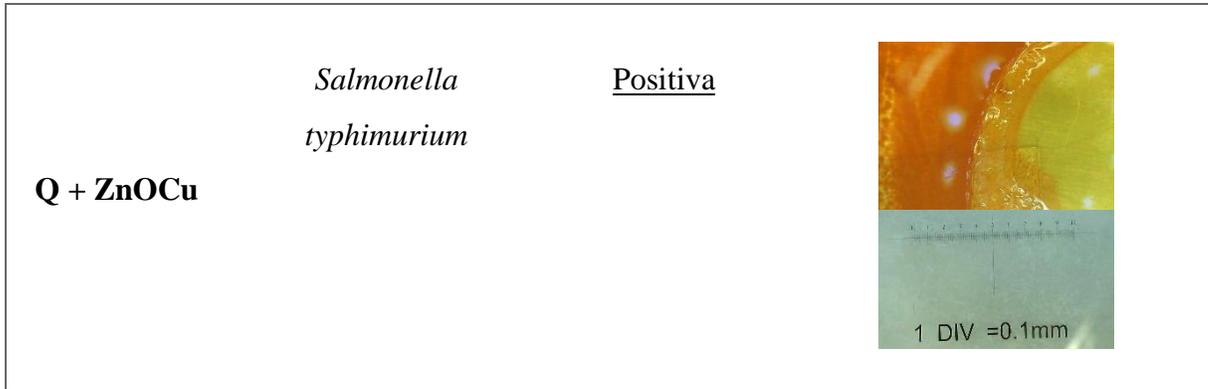
En la Tabla 5 se observan los resultados de las pruebas antimicrobianas de las películas de quitosano y quitosano modificado contra *Staphylococcus aureus* y *S. typhimurium*.

Tabla 5. Resultados de las pruebas antimicrobianas de las películas de quitosano y quitosano modificado

Película	Microorganismo	Actividad antimicrobiana	Evidencia
Q	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativa	

<p><b>Q</b></p>	<p><i>Salmonella typhimurium</i></p>	<p>Positiva</p>	
<p><b>Q + GA</b></p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>Positiva</p>	
<p><b>Q + GA</b></p>	<p><i>Salmonella typhimurium</i></p>	<p>Positiva</p>	
<p><b>Q + ZnO</b></p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>Negativa</p>	

<b>Q + ZnO</b>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Positiva	
<b>Q + Cu</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<u>Negativa</u>	
<b>Q + Cu</b>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<u>Positiva</u>	
<b>Q + ZnOCu</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<u>Negativa</u>	



No se encontró actividad antimicrobiana en las películas de quitosano puro contra *Staphylococcus aureus*. Por el contrario, en un estudio realizado por Imani y cols. se confirmó una adecuada eficacia antibacteriana del quitosano contra *S. aureus* como medicamento para pulpectomía de dientes temporales (43). En contraste en las películas de quitosano puro, contra *S. Typhimurium* sí se encontró actividad antimicrobiana. Lo cual coincide con los resultados encontrados por Hu y cols. quienes reportan que el uso de quitosano puro reduce significativamente los recuentos de bacterias como *Salmonella* (114). Erickson y cols. encontraron resultados similares, de un spray de quitosano y ácido acético contra este microorganismo (115).

En las películas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído se encontró actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *S. typhimurium*, esto puede atribuirse a la interacción entre las moléculas de Q-GA cargadas positivamente y las membranas bacterianas cargadas negativamente (116). Sehmi y cols. mencionan que el glutaraldehído no es activo contra las células bacterianas cuando se encuentra en soluciones acuosas ácidas, sin embargo, cuando se activa a pH 7.5-8.5 la solución se vuelve biocida (44).

No se encontró actividad antimicrobiana de la película de quitosano con óxido de zinc contra *S. aureus*, pero sí se observó contra *S. typhimurium*. Chekne y cols. evaluaron el efecto antibacteriano de la fracción de globulina gamma unida y de los cationes libres de cobre y zinc aplicados a cultivos de *S. aureus*. Los cationes libres de cobre, así como los de cobre unidos por la  $\gamma$ -globulina sérica dieron como resultado un efecto bactericida completo después de 4 horas de observación. Por otro lado, los cationes de zinc realizan

actividad bacteriostática solo unidos a gamma-globulina por lo tanto, los cationes libres de zinc no tuvieron efecto bacteriostático contra *S. aureus* (117). Valencia y cols. evaluaron el efecto antimicrobiano de quitosano comercial en estado líquido y estado sólido contra *Staphylococcus aureus*. El quitosano no mostró un efecto antimicrobiano contra este organismo en ninguno de los dos casos (39). Brathi y cols. reportaron que su nanocompuesto de quitosano y ZnO mostró una mayor actividad antimicrobiana contra los patógenos bacterianos Gram negativos comparada con los Gram positivos (53). Por el contrario, Youssef y cols. sí encontraron actividad antimicrobiana de las películas de quitosano con óxido de zinc contra ambas bacterias, *s. aureus* y *s. typhimurium* (66).

En la película de quitosano con cobre al 1%, no se observó actividad antimicrobiana contra *S. aureus* pero sí contra *S. typhimurium*. Nuestros resultados difieren de lo reportado por Brahma y cols., quienes evaluaron un complejo de cobre contra *S. aureus*, bacteria Gram positiva, y encontraron actividad antimicrobiana (82). Li y cols. hacen mención a las concentraciones de Cu, ellos afirman que si están debajo del valor crítico no mostrarían propiedades antibacterianas porque las bacterias son buenas para controlar los niveles de cobre, lo que podría explicar los resultados de este estudio, por el contrario, si se excede el valor crítico de Cu la actividad antibacteriana mejoraría (83). También Isobe K hace referencia que las bacterias Gram positivas tienen una capa de peptidoglicano (50-60nm) debajo de la membrana celular y se sabe que esta capa ayuda a las bacterias a superar el estrés físico, por lo que se cree que esta capa de pared celular reduce la penetración de iones metálicos tóxicos (35,118).

Los resultados de diversos estudios mostraron que las bacterias Gram negativas eran más sensibles al quitosano cargado con iones metálicos. Probablemente se debió a las diferentes características de las superficies de las células. Ya que la carga negativa en la superficie celular de las bacterias Gram negativas fue más alta que en bacterias Gram positivas (36). Chung y cols. también llegaron a la conclusión que las bacterias Gram negativas fueron más susceptibles que las bacterias Gram positivas. Lo que podría ser debido a la mayor hidrofiliidad de las bacterias Gram negativas, tornándolas más susceptibles al quitosano en medio líquido (37).

Por último, tampoco se encontró efecto antimicrobiano de la película de quitosano modificado con óxido de zinc al 5% y cobre al 1% contra *S. aureus*. Por el contrario, Yasuyuki y cols. encontraron usando el método de contacto que los metales Cu y Zn mostraban propiedades antibacterianas contra bacterias Gram positivas como el *S. aureus*. Los estudios proporcionaron evidencia de toxicidad por metales y mortalidad bacteriana (119).

Para *S. typhimurium* si se encontró actividad antimicrobiana en esta última película de quitosano modificado con óxido de zinc y cobre. Estos resultados coinciden con diversos estudios, en donde se ha encontrado al Cu cobre potencial agente antimicrobiano contra *S. typhimurium* (120,121). Así mismo, Karbowiczek y cols. encontraron actividad antimicrobiana de nanopartículas de ZnO contra este microorganismo (61).

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en la caracterización de las películas de quitosano y quitosano modificado, se puede concluir que existe entrecruzamiento de quitosano con el glutaraldehído, y se evidencia la modificación del quitosano al añadir el óxido de zinc y las partículas de cobre, esto se comprueba con mediante las técnicas de FTIR y TGA.

En el análisis de XPS encontramos que el porcentaje de carbono se mantuvo estable en todas las películas. No se observa Zn en las películas de quitosano con óxido de zinc al 5%, sin embargo, si se observa Zn cuando se añade cobre en la película de quitosano con óxido de zinc al 5% y cobre al 1%. No se observó Cu en ninguna de las películas, esto puede deberse a la baja concentración empleada, sin embargo, si se encontró Cu cuando las muestras fueron analizadas por EDX.

Las imágenes por MEB muestran una superficie lisa en todas las películas.

Mediante DRX observamos los picos característicos del quitosano, los resultados de este estudio muestran una disminución en la intensidad de los picos del quitosano al agregar entrecruzantes y nanopartículas.

En la medición de ángulo de contacto la película de quitosano con óxido de zinc analizada con el medio de cultivo mostró una mayor hidrofobicidad, es decir, un mayor ángulo de contacto.

Por último, se encontró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* en la película de quitosano entrecruzado con glutaraldehído. Sin embargo, no se encontró actividad antimicrobiana en las películas de quitosano puro ni en las películas de quitosano modificado con óxido de zinc al 5% y nanopartículas de cobre al 1%. Se le atribuye la falta de actividad antimicrobiana del cobre y óxido de zinc al bajo valor añadido a las películas. Sin embargo, si se encontró actividad antimicrobiana contra *Salmonella* en todas las películas de quitosano y quitosano modificado con óxido de zinc al 5% y cobre al 1%. Por lo que se concluye que el quitosano si tiene efecto antimicrobiano, se recomienda realizar estudios futuros para aplicaciones médicas y odontológicas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gergova R, Georgieva T, Angelov I, Mantareva V, Valkanov S, Mitov I. Photodynamic therapy with water-soluble phtalocyanines against bacterial biofilms in teeth root canals. SPIE. 2012;8427:842744.
2. El desafío de las Enfermedades Bucodentales - una llamada a la acción global. Atlas de Salud Bucodental. In: Federación Dental Internacional. 2da ed. Ginebra; 2015.
3. Bhayat A et al. Correlating dental caries with oral bacteria and the buffering capacity of saliva in children in Madinah, Saudi Arabia. J Int Soc Prev Community Dent. 2013;3(1):38–43.
4. Petti S, Boss M, Messano G, Protano C, Polimeni A. High salivary Staphylococcus aureus carriage rate among healthy paedodontic patients. New Microbiol. 2014;37(1):91–6.
5. Ohara-Nemoto Y, Haraga H, Kimura S, Nemoto TK. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal – oral trafficking of the bacteria. J Med Microbiol. 2008;57:95–9.
6. Smith A, Buchinsky FJ, Post JC. Eradicating chronic ear, nose, and throat infections: a systematically conducted literature review of advances in biofilm treatment. Otolaryngol Head Neck Surg. 211AD;144:338–47.
7. Salvi GE, Furst MM, Lang NP, Persson GR. One-year bacterial colonization patterns of Sthaphylococcus aureus and other bacteria at implants and adjacent teeth. Clin Oral Implant Res. 2008;19:242–8.
8. McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, Edwards G. Staphylococcus aureus and the oral cavity : An overlooked source of carriage and infection? Am J Infect Control. 2015;43(1):35–7.

9. Perkowski K, Chomicz L, Starosciak B, Zadurska M, Szalwinski M, Zawadzki P, et al. Occurrence of pathogenic bacteria in the oral cavity of the orthodontic patients requiring surgical treatment. *Stomatol Wspolcz.* 2012;19:8–13.
10. Ristic M, Svabic M V, Sasic M, Zelic O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. *Orthod Craniofacial Res.* 2007;10(1):187–95.
11. Perkowski K, Baltaza W, Conn D, Marczyńska-stolarek M, Chomicz L. Examination of oral biofilm microbiota in patients using fixed orthodontic appliances in order to prevent risk factors for health complications. *Ann Agric Environ Med.* 2019;26(2):231–5.
12. Bogomolov BP, Sorokina AA. Concerning changes of oral cavity mucous tunic in acute enteric infection. *Klin Med.* 2008;86(3):66–9.
13. Costa E M, Silva S, Tavaría F K, Pintado M M. Insights into chitosan antibiofilm activity against methicillin-resistant *S. aureus*. *J Appl Microbiol.* 2017;122(6):1547–57.
14. Trentin DS, Giordani RB, Macedo AJ. Biofilmes bacterianos patogênicos : aspectos gerais , importância clínica e estratégias de combate 1. *Rev Lib.* 2013;14:113–238.
15. Calvo J, Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(1):44–52.
16. Husain S, Al-Samadani KH, Najeeb S, Zafar MS, Khurshid Z, Zohaib S, et al. Chitosan Biomaterials for Current and Potential Dental Applications. *Materials (Basel).* 2017;10:602.
17. Venkatesan J, Se-Kwon K. Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering — *An. Mar Drugs.* 2010;8:2252–66.
18. Muzzarelli R. Chitin. Primera ed. Editorial Pergamon Press; 1974. pag. 2.
19. Chuc-Gamboa MG. Efecto de la modificación química y térmica en las

- propiedades de andamios de quitosano para regeneración ósea. 2020.
20. Roberts G. Chitin Chemistry. Mcmillan. London; 1998.
  21. Agnihotri S, Mallikarjuna N, Aminabhav T. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*. 2004;100:5–28.
  22. Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, de la Caba K. Chitosan as a bioactive polymer : Processing , properties and applications. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;105:1358–68. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>
  23. Tuyishime P, Lee B, Nsanzabera F. Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. *Appl Biochem Biotechnol*. 2017;181:1314–37.
  24. Mohamed N.B., Alessandro G. Monomers. *Polym Comp Ren Res*. 2008;
  25. Muzzarelli R. Chitosan-based dietary foods. *Carbohydr Polym*. 1996;29(4):309–16.
  26. Goycoolea F, Mato R. Caracterización de Quitina y Quitosano. Fondo Efitorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Perú; 2004.
  27. Ardila N, Daigle F, Heuzey M, Abdellah A. Antibacterial Activity of Neat Chitosan Powder. *Molecules*. 2017;(1):1–19.
  28. Schipper NGM, Varum K, Artrursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharms Res*. 1996;13(11):1686–92.
  29. Dodane V, Khan M, Mervin J. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm*. 1999;182:21–32.
  30. Saravanan S., Leena R.S., Selvamurugan N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2016;93:1354–65.

31. Aiba S. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *I J Biol Macromol.* 1992;14(4):225–8.
32. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol.* 2009;(3):203–30.
33. Baroudi A, García-Payo C, Khayet M. Structural , Mechanical , and Transport Properties of Different Doses. *Polymers (Basel).* 2018;10(117).
34. Ayala-Valencia G. Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Scientia Agroaliment.* 2015;2(December):32–8.
35. Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HI, Wu JC, et al. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25(7):932–6.
36. Du WL, Niu SS, Xu YL, Xu ZR, Fan CL. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2009;75:385–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.07.039>
37. Chung Y, Su Y, Chen C, Jia G, Wang H, Wu J, et al. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Parmacologica Sin.* 2004;25:932–6.
38. Qasim S, Husain S, Huang Y, Pogorielov M, Deineka V, Lyndin M, et al. In vitro and in vivo degradation studies of freeze gelated porous chitosan composite scaffolds for tissue engineering applications. *Polym Degrad Stab.* 2017;136:31–8.
39. Ayala V, Oliveria C, Ferrari R, Vercik A. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using water-soluble starch and its antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*. *Starch/Stärke.* 2013;65:1–7.
40. Sarasam AR, Brown P, Khajotia S, Dmytryk J, Madihally S. Antibacterial activity of chitosan-based matrices on oral pathogens. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19:1083–90.

41. Huang J, Liu Y, Yang L, Zhou F. Synthesis of sulfonated chitosan and its antibiofilm formation activity against *E. coli* and *S. aureus*. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;129:980–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.079>
42. Fujimoto T, Tsuchiya Y, Terao M. Antibacterial effects of Chitosan solution against *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*. 2006;112:96–101.
43. Imani Z, Imani Z, Basir L, Mohsen S, Montazeri EA, Vahid R. Antibacterial Effects of Chitosan, Formocresol and CMCP as Pulpectomy Medicament on *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *Iran Endod J*. 2018;13(3):342–50.
44. Sehmi S, Allan E, MacRobert A, Parkin I. The bactericidal activity of glutaraldehyde-impregnated polyurethane. *Microbiol open*. 2016;5(5):891–7.
45. Grabowska B, Sitarz M, Olejnik E, Kaczmarska K. FT-IR and FT-Raman studies of cross-linking processes with Ca<sup>2+</sup> ions, glutaraldehyde and microwave radiation for polymer composition of poly(acrylic acid)/sodium salt of carboxyme. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* [Internet]. 2015;135:529–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.07.031>
46. Marinucci L, Lilli C, Guerra M, Belcastro S, Becchett E, Stabellini G, et al. Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide: An in vitro study. *J Biomed Mater Res*. 2003;67A(2):504–9.
47. Valizadeh S et al. Development of bioactive composite films from chitosan and carboxymethyl cellulose using glutaraldehyde, cinnamon essential oil and oleic acid. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;134:604–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.071>
48. Yu Q, Song Y, Shi X, Xu C, Bin Y. Preparation and properties of chitosan derivative / poly(vinyl alcohol) blend film crosslinked with glutaraldehyde.

- Carbohydr Polym [Internet]. 2011;84(1):465–70. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.006>
49. Li B, Shan C-L, Zhou Q, Fang Y, Wang Y-L, Xu F, et al. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde. *Mar Drugs*. 2013;11:1534–52.
  50. Pasquet J, Chevalier Y, Pelletier J, Couval E, Bouvier D, Bolzinger M. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2014;457:263–74. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.05.057>
  51. Osredkar J, Sustar N. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *J Clin Toxicol S*. 2011;2(2161):0495.
  52. Pasquet J, Chevalier Y, Couval E, Bouvier D, Noizet G, Morlière C, et al. Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. *Int J Pharm* [Internet]. 2014;460(1–2):92–100. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.10.031>
  53. Bharathi D, Ranjithkumar R, Chandarshekar B, Bhuvaneshwari V. Preparation of chitosan coated zinc oxide nanocomposite for enhanced antibacterial and photocatalytic activity : As a bionanocomposite. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;129:989–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.061>
  54. Yusoff N., Ho L.P., Ong S.A., Wong Y.S., Khalik W. Photocatalytic activity of zinc oxide ( ZnO ) synthesized through different methods. *Desalin Water Treat*. 2016;57(27):12507.
  55. Jin T, Sun D, Su JY, Zhang H, Sue HJ. Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *salmonella enteritidis* and *escherichia coli*. *J Food Sci*. 2009;74(1):M46–56.
  56. Kasraei S, Sami L. Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*.

- Restor Dent Endod. 2014;39:109–14.
57. Miri A, Ebrahimi O, Khatami M, Sarani M. Zinc oxide nanoparticles : Biosynthesis , characterization , antifungal and cytotoxic activity. *Mater Sci Eng C*. 2019;104(April 2018).
  58. Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC. *FEMS. Microbiol Lett*. 2008;279:71–6.
  59. Beyene Z, Ghosh R. Effect of zinc oxide addition on antimicrobial and antibiofilm activity of hydroxyapatite : a potential nanocomposite for biomedical applications. *Mater Today Commun*. 2019;21:100612.
  60. Dias B H, Bernarsi M I B, Ramos M A dos S, Trevisan T C, Bauab T M, Hermamdes A C, et al. Zinc oxide 3D microstructures as an antimicrobial filler content for composite resins. *Microsc Res Tech*. 2017;23:1–10.
  61. Karbowinczek J, Cordero-Arias L, Virtanen S, Misra SK, Valsami-Jones E, Rutkowski B, et al. Electrophoretic deposition of organic/inorganic composite coatings containing ZnO nanoparticles exhibiting antibacterial properties. *Mater Sci Eng*. 2017;77:780–9.
  62. K X, Chun H. ZnO/PVP Nanocomposite Spheres with Two Hemispheres. *J Phys Chem*. 2007;111:13301–8.
  63. Haldorai Y., Shim J. Chitosan-Zinc Oxide hybrid composite for enhanced dye degradation and antibacterial activity. *Compos interfaces*. 2013;20(5):365–77.
  64. Wahid F, Zhou Y, Wang H, Wan T, Zhong C, Chu L. Injectable self-healing carboxymethyl chitosan-zinc supramolecular hydrogels and their antibacterial activity. *Int J Biol Macromol [Internet]*. 2018;114:1233–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.025>
  65. Ficai D, Ardelean IL, Holban AM, Ditu LM, Gudovan D, Sonmez M, et al. Manufacturing nanostructured chitosan-based 2D sheets with prolonged antimicrobial activity. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):517–25.
  66. Youssef AM, Abou-Yousef H, El-Sayed S, Kamel S. Mechanical and

- antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. *Int J Biol Macromol*. 2015;76:25–32.
67. Saafan A, Zaazou M, Sallam MK, Mosallam O, Danaf H. Assessment of Photodynamic Therapy and Nanoparticles Effects on Caries Models. *J Med Sci*. 2018;6(7):1289–95.
  68. Song W, Ge S. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules*. 2019;24:1–15.
  69. Hanemann T, Szabó D. Polymer-nanoparticle composites: From synthesis to modern applications. *Materials (Basel)*. 2010;3:3468–517.
  70. Gnanavel V, Palanichamy V, Selvaraj. R. Biosynthesis and characterization of copper oxide nanoparticles and its anticancer activity on human colon cancer cell lines (HCT-116). *J Photochem Photobiol B Biol*. 2017;
  71. Khodashenas B, Ghorbani HR. Synthesis of copper nanoparticles an overview of the various methods. *Korean J Chem Eng*. 2014;31(7):1105–9.
  72. Cioffi N, Torsi L, Ditaranto N, Tantillo G, Ghibelli L, Sabbatini L, et al. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chem Mater*. 2005;12:5255–62.
  73. Schrand A, Rahman M, Hussain S, Schlager J, Smith D, Syed A. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010;2:21–4.
  74. Kuhn P. Doorknobs: A Source of Nosocomial Infection? *Diagnostic Med*. 1983;
  75. Grigore M, Biscu E, Holban A, Gestal M. Methods of Synthesis, Properties and Biomedical Applications of CuO Nanoparticles. *Pharmaceuticals*. 2016;75(9):1–14.
  76. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *J Hosp Infect*. 2006;63:289–97.

77. Booshehri Y. Simple method of deposition of CuO nanoparticles on a cellulose paper and its antibacterial activity. *Chem Eng J.* 2015;262:999–1008.
78. Kumar R., Münstedt H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. Vol. 26, *Biomaterials.* 2006. 2081-2088 p.
79. Ramyadevi J., Jevasubramanian K., Marikani A., Rajakumar G., Rahuman A.A. Synthesis and antimicrobial property of copper nanoparticles. *Mater Lett.* 2012;71:11–116.
80. Ramyadevi J, Jeyasubramanian K, Marikani A, Rajakumar G, Rahuman A. Synthesis and antimicrobial property of copper nanoparticles. *Mater Lett.* 2015;71:114–6.
81. Gutiérrez MF, Alegría-acevedo LF, Méndez-bauer L, Bermudez J, Dávila-sánchez A, Buvinic S, et al. Biological, mechanical and adhesive properties of universal adhesives containing zinc and copper nanoparticles. *J Dent [Internet].* 2019;(January):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.01.012>
82. Brahma U, Kothari R, P S, Bhandari V. Antimicrobial and anti-biofilm activity of hexadentate macrocyclic complex of copper ( II ) derived from thiosemicarbazide against *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep [Internet].* 2018;8:8050. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-26483-5>
83. Li K, Xia C, Qiao Y, Liu X. Dose-response relationships between copper and its biocompatibility / antibacterial activities. *J Trace Elem Med Biol.* 2019;55:127–35.
84. Tabesh E, Salimijazi H.R., Kharaziha M., Mahmoudi M., Hejazi M. Development of an in-situ chitosan-copper nanoparticle coating by electrophoretic deposition. *Surf Coat Technol [Internet].* 2019;364:239–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.02.040>
85. Hardy JJE, Hubert S, Macquarrie DJ, Wilson AJ. Chitosan-based heterogeneous catalysts for Suzuki and Heck reactions. *Green Chem.* 2004;6:53–6.

86. Tran CD, Makuvaza J, Munson E, Bennett B. Biocompatible copper oxide nanoparticle composites from cellulose and chitosan : facile synthesis , unique structure and antimicrobial activity. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;
87. Revathi T, Thambidurai S. Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of copper oxide incorporated chitosan-neem seed biocomposites. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.214>
88. Rania E, Ahmed M, Shimaa A, Manal M. Multifunctional Nanocomposites of Chitosan, Silver Nanoparticles, Copper Nanoparticles and Carbon Nanotubes for water treatment: Antimicrobial characteristics. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.032>
89. Gritsch L, Lovell C, Goldmann W, Boccaccini A. Fabrication and characterization of copper ( II ) -chitosan complexes as antibiotic-free antibacterial biomaterial. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2018;179(September 2017):370–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.095>
90. Bolaina E, Martínez C, Monleón M, Herrera W, Cauich J, Cervantes J. Electrospun polycaprolactone / chitosan scaffolds for nerve tissue engineering : physicochemical characterization and Schwann cell biocompatibility. *Biomed Mater*. 2017;12.
91. Ki-jae J, Younseong S, Hye-ri S, Ji E, Jeonghyo K, Fangfang S, et al. In vivo study on the biocompatibility of chitosan- hydroxyapatite film depending on degree of deacetylation. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(6):1637–45.
92. Subhani B, Codi-anne C, Johnson C, Akindoju F, Williams E, Swaby J, et al. Synthesis and characterization of Zinc / Chitosan-Folic acid complex. *Heliyon* [Internet]. 2018;4:e00737. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00737>
93. Bujňáková Z, Dutková E, Zorkovská A, Baláz M, Kovác J, Kello M, et al. Mechanochemical synthesis and in vitro studies pf chitosan-coated InAs/ZnS

- mixed nanocrystals. *J Mater Sci.* 2017;52(2):721–35.
94. Beppu M, Vieira R, Aimoli C, Santana C. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde : Effect on ion permeability and water absorption. *J Memb Sci.* 2007;301:126–30.
  95. Muraleedharan K, Alikutty P, Abdul M, Sarada K. Kinetic studies on the thermal Dehydration and degradation of chitosan and citralidene chitosan. *J Polym Envirom.* 2015;23:1–10.
  96. Oyrton AC, Monteiro J, Claudio A. Some studies of crosslinking chitosan – glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *Int J Biol Macromol.* 1999;26:119–28.
  97. Chen JH, Dong XF, He YS. Investigation into glutaraldehyde crosslinked chitosan/cardo-poly-etherketone composite membrane for pervaporation separation of methanol and dimethyl carbonate mixtures. *RSC Adv [Internet].* 2016;6:60765–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA10854G>
  98. Djaja N, Montja A, Saleh R. The Effect of Co Incorporation into ZnO Nanoparticles. *Adv Mater Phys an Chem.* 2013;3:33–41.
  99. Hernández A, Maya L, Sánchez-Mora E, Sánchez E. Sol-gel synthesis , characterization and photocatalytic activity of mixed oxide ZnO-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *J Sol-Gel Techn.* 2007;42:71–8.
  100. Dobruka R, Dugaszweska J. Biosynthesis and antibacterial activity of ZnO nanoparticles using *Trifolium pratense* flower extract. *Saudi J Biol Sci.* 2016;23:517–23.
  101. Gianella F, Natalia A, S R. Desarrollo de Complejos de cobre con actividad antitumoral: síntesis y caracterización de un nuevo complejo de cobre-terpiridina. *Inf Tecnol.* 2012;23(6):2530.
  102. Hanna M, Anna P, Jankun-Ewa S. Crystal and molecular structure of aqua spermine copper (II) sulphate trihydrate studied by X-ray and IR spectroscopy. *J*

- Chem Crystallogr. 1995;25(1):19–23.
103. Ceja-Romero LR, Ortega-Arroyo L, Ortega Rueda de León JM, López-Andrade X, Narayanan J, Aguilar-Méndez MA, et al. Green chemistry synthesis of nanocuprous oxide. *IET Nanobiotechnology*. 2016;10(2):39–44.
  104. Maldonado K, Bárcenas G, Luna E, Padilla F, Hernández E, Betancourt R, et al. Preparation and characterization of copper chitosan nanocomposites with antibacterial activity for applications in tissue engineering. *Rev Mex Ing biomédica*. 2017;38(1):306–13.
  105. Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea F, Arguelles-Monal W, Desbrières R. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer (Guildf)*. 2001;42:3569–80.
  106. Samuels RJ. Solid State Characterization of the Structure of Chitosan Films. *J Polym Sci Polym Phys Ed*. 1981;19:1081–105.
  107. Vartiainen J, Harlin A. Crosslinking as an Efficient Tool for Decreasing Moisture Sensitivity of Biobased Nanocomposite Films. *Mater Sci Appl*. 2011;2:346–54.
  108. Chuc-Gamboa M, Vargas-Coronado R, Cervantes-Uc J, Cauch-Rodríguez J, Escobar-García D, A P-G, et al. The Effect of PEGDE Concentration and Temperature on Physicochemical and Biological Properties of Chitosan. *Polymers (Basel)*. 2019;11:1830.
  109. Ai L, He H, Wang P, Cai R, Tao G, Yang M, et al. Rational Design and Fabrication of ZnONPs Functionalized Sericin / PVA Antimicrobial Sponge. *Int J Mol Sci*. 2019;20:4796.
  110. Gutiérrez M et al. Zinc oxide and copper nanoparticles addition in universal adhesive systems improve interface stability on caries-affected dentin. *J Mech Behav Biomed Mater [Internet]*. 2019;100(July):103366. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.07.024>
  111. Aguilar-Pérez D, Vargas-Coronado R, Cervantes-Uc J, Rodríguez-Fuentes N,

- Aparicio C, Covarrubias C, et al. Antibacterial activity of a glass ionomer cement doped with copper nanoparticles. *Dent Mater J*. 2020;39(3):389–96.
112. Naito PK, Ogawa Y, Kimura S, Iwata T, Wada M. Crystal transition from hydrated chitosan and chitosan/monocarboxylic acid complex to anhydrous chitosan investigated by X-ray diffraction. *J Polym Sci Part B Polym Phys*. 2015;53:1065–9.
113. Grundke K, Pöschel K, Synytska A, Frenzel R, Drechsler A, Nitschke M, et al. Experimental studies of contact angle hysteresis phenomena on polymer surfaces — Toward the understanding and control of wettability for different applications. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2014;1–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.012>
114. Hu ZY, Balay D, Hu Y, McMullen LM, Ganzle MG. Effect of chitosan, and bacteriocin - Producing *Carnobacterium maltaromaticum* on survival of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* on beef. *Int Jorunal Food Microbiol*. 2019;290:68–75.
115. Erickson MC, Liao JY, Payton AS, Cook PW, Adhikari K, Wang S, et al. Efficacy of Acetic Acid or Chitosan for Reducing the Prevalence of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7-Contaminated Leafy Green Plants in Field Systems. *J Food Prot*. 2019;82(5):854–61.
116. Mohamed NA, Fahmy MM. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Novel Cross-Linked Chitosan Hydrogels. *Int J Mol Sci*. 2012;13:11194–209.
117. Chekne SB, Vostrova EL, Sarycheva MA, AV V. Effect of copper and zinc cations bound by gamma-globulin fraction in staphylococcus aureus culture. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2014;3:4–18.
118. K I. The strategy for existence of microorganisms-adhesion to solid surfaces. *J Surf Sci Soc Jpn*. 2001;22:652–62.
119. Yasuyuki M, Kunihiro K, Kurissery S, Kanavillil N, Sato Y, Kikuchi Y. Antibacterial properties of nine pure metals : a laboratory study using

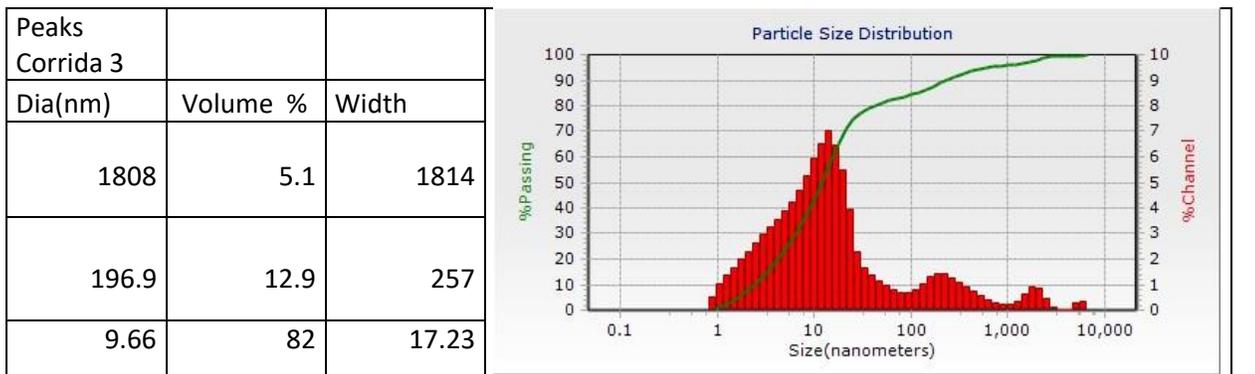
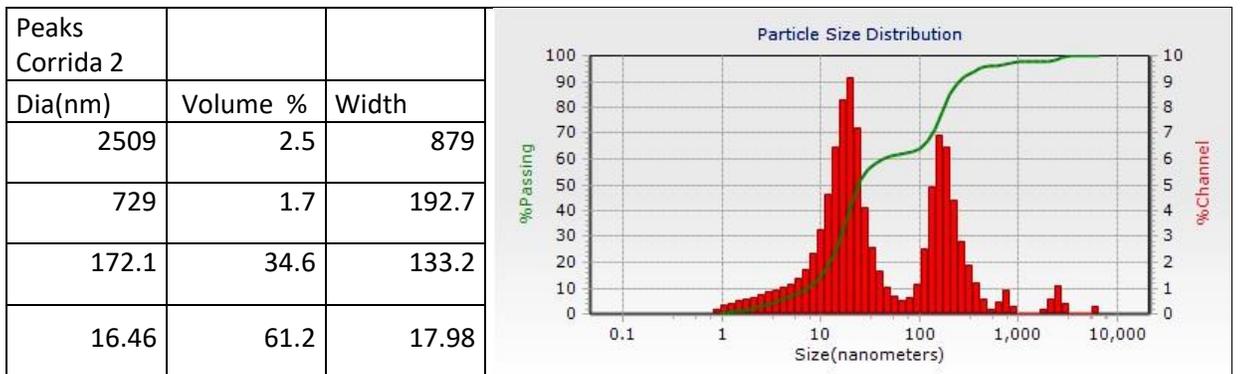
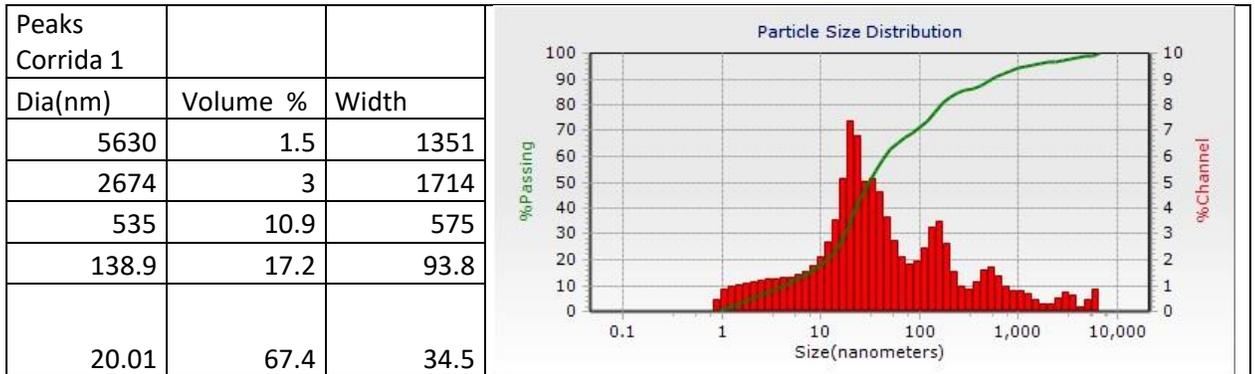
*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biofouling J Bioadhesion Biofilm*. 2010;26(851–858):37–41.

120. Beal JD, Niven A, Campbell A, Brooks PH. The effect of copper on the death rate of *Salmonella typhimurium* DT104:30 in food substrates acidified with organic acids. *Lett Appl Microbiol*. 2003;38:8–12.
121. Achard M, Stafford SL, Bokil NJ, Chartres Jy, Bernhardt PV, Schembri MA, et al. Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection. *Biochem*. 2012;444(1):51–7.

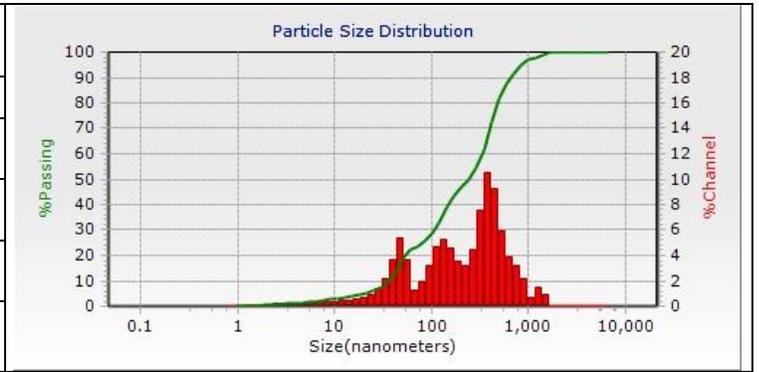
## ANEXOS

### ANEXO 1

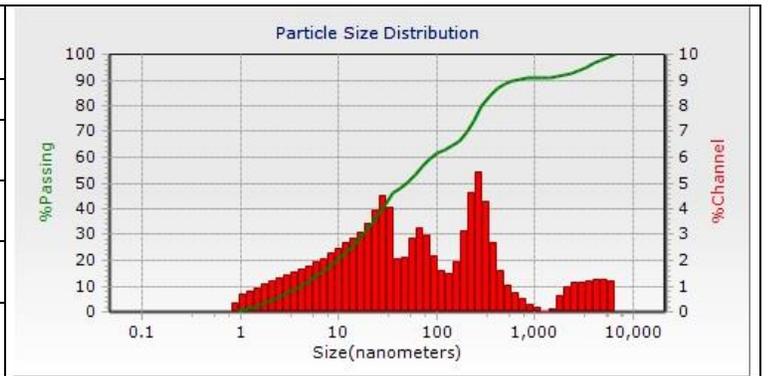
Determinación de tamaño de partícula.



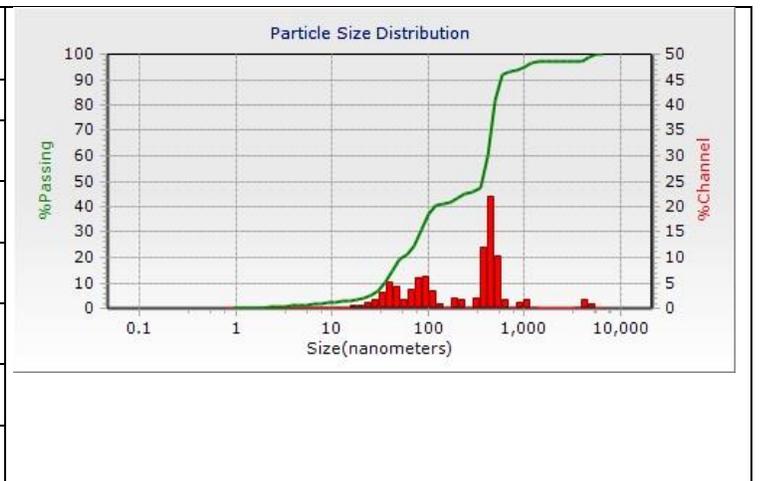
Peaks Corrida 4		
Dia(nm)	Volume %	Width
3490	8.9	3140
259.3	29.6	228.8
63.7	15.4	39.7
12.25	46.1	23.78



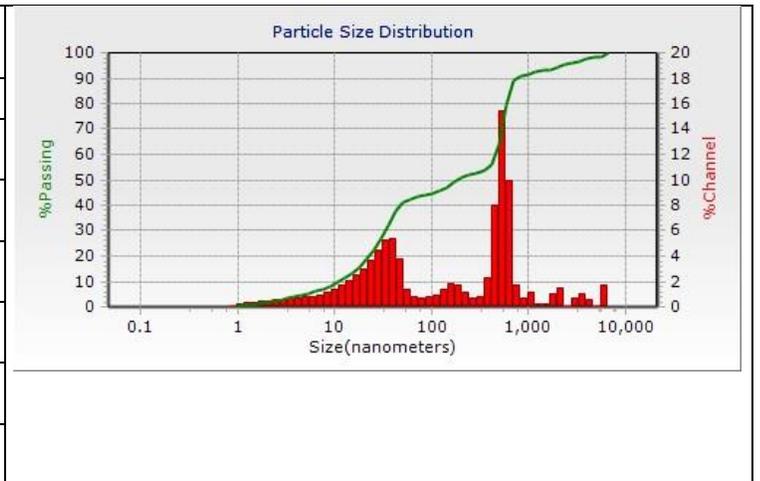
Peaks Corrida 5		
Dia(nm)	Volume %	Width
1287	3.1	355
405	50.2	316
126.3	24.4	78.9
39.3	22.3	38



Peaks Corrida 6		
Dia(nm)	Volume %	Width
4420	3	1028
1000	3.6	247.7
441	48.1	131.9
200.8	4	45.5
85.2	22	37.8
35.4	19.3	29.3



Peaks		
Corrida 7		
Dia(nm)	Volume %	Width
5970	1.9	690
3470	2.5	1055
1944	2.9	531
1009	1.8	208
531	39	185.6
29.66	51.9	69.9



Peaks		
Corrida 8		
Dia(nm)	Volume %	Width
499	61.2	262.1
136.8	38.8	83.5

