

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Sección de Posgrado y Segunda Especialización
Profesional**



Tesis para Optar el Grado Académico
de Maestro en Ciencias con mención en
Energía Nuclear

**"Hidrogeles de PVA - PVP conteniendo
Nanopartículas de Plata obtenidos por
Radiación Gamma"**

Presentada por:

Julieta Gladys Cabrera Sotelo

LIMA - PERÚ

2009

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

SECCIÓN DE POSGRADO Y SEGUNDA ESPECIALIZACIÓN PROFESIONAL

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN ENERGÍA NUCLEAR

Presentado por: Julieta Gladys Cabrera Sotelo,

Asesor de tesis: Dr. Julio Santiago Contreras

“Hidrogeles de PVA-PVP conteniendo nanopartículas de plata
obtenidos por radiación gamma”

Resumen

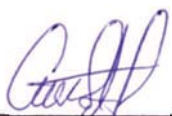
Se ha preparado hidrogeles de alcohol polivinílico (PVA) - polivinil pirrolidona (PVP) conteniendo nanopartículas de plata utilizando radiación gamma. Las nanopartículas de plata fueron introducidas en la matriz polimérica de tres maneras diferentes. En el primer método, los nanocompuestos hidrogel/plata fueron obtenidos a partir de la irradiación de la mezcla de los precursores en solución acuosa. En el segundo método, el nanocompuesto fue obtenido por impregnación de las matrices poliméricas en una solución de AgNO_3 , y posterior reducción de los Ag^+ inducida por irradiación gamma. En el tercer método, los nanocompuestos fueron obtenidos impregnando los hidrogeles en estado de películas secas en soluciones coloidales de nanopartículas de plata. La formación de las nanopartículas en las matrices poliméricas fue confirmada por espectroscopia UV-Visible, FTIR y DRX. Las imágenes obtenidas por MET muestran una distribución más o menos homogénea de las nanopartículas en la matriz de hidrogel cuyos tamaños estarían entre 10 y 15 nm. Así mismo, la topografía de las muestras fue analizada por MFA observándose, principalmente, cambios en la rugosidad por efecto de la incorporación de la plata.

Los hidrogeles de PVA y PVP fueron obtenidos por entrecruzamiento por radiación gamma. Soluciones acuosas de ambos polímeros en diferentes concentraciones fueron mezcladas en distintas proporciones. La concentración total de los polímeros en la mezcla varió entre 9 y 15 %. La dosis de radiación varió entre 10 y 30 kGy a una tasa de dosis constante de 8 kGy/h. Los hidrogeles de PVA alcanzaron grados de

hinchamiento 400% mientras que los hidrogeles de PVA-PVP alcanzaron grados de hinchamiento de 1000%.

Los coloides de nanopartículas de plata fueron obtenidos por reducción inducida por radiación gamma a partir de soluciones acuosas de AgNO_3 , usando isopropanol como neutralizador de radicales y PVP y PVA como estabilizadores del coloide. La influencia de cada componente en la formación de las nanopartículas, fueron evaluadas por espectroscopia UV-Visible y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET), observándose formaciones dendríticas para la solución acuosa de AgNO_3 , partículas aglomeradas para las mezclas AgNO_3 -isopropanol y nanopartículas para las mezclas de AgNO_3 -polímero y AgNO_3 -polímero-isopropanol. Se ha observado que la concentración de isopropanol es determinante en la formación de las nanopartículas, ya que en cantidades insuficientes se ve principalmente favorecida las formaciones de óxidos, en su mayoría Ag_2O . El tamaño y forma de las nanopartículas son fuertemente influenciadas por el tipo de polímero así como de su concentración. El tamaño de las nanopartículas obtenidas usando PVP y concentraciones de alcohol entre 2 y 6 M oscilan alrededor de 25 nm, con una distribución de tamaño de partículas estrecha. Sin embargo, las nanopartículas obtenidas usando PVA presentaron una amplia distribución de tamaños (entre 17 y 100 nm). En este caso se observaron formaciones tipo nanovarillas cuya formación se vio favorecida para concentraciones de PVA al 1%. Los espectros UV-Visible de los coloides obtenidos confirman la presencia de nanopartículas de plata al observarse los máximos de la banda de absorción del plasmón superficial alrededor de 410 nm.

La eficiencia antimicrobiana de los nanocompuestos hidrogel/Ag fue evaluada frente a la bacteria Gram positiva *S. aureus* y frente a la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa* observándose que, ambos presentan actividad antimicrobiana y que ésta depende principalmente de la concentración de plata presente. Por lo tanto, estos hidrogeles tienen un gran potencial para ser utilizados como apósitos en el tratamiento de heridas y quemaduras.



Ing. Julieta Cabrera Sotelo

Tesista



Dr. Julio Santiago Contreras

Asesor

Dedicatoria

ルイース

..... *I've waited all my life for you.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera que las próximas líneas sirvan como reconocimiento a las personas que han hecho posible la realización de ésta tesis. A todas ellas, quiero agradecer de todo corazón por la ayuda otorgada.

A mi asesor, el Dr. Julio Santiago, por su infinita paciencia, apoyo y confianza

A un gran amigo, el Dr. Alcides López, por sus valiosos consejos, por su guía y por haber sido el apoyo moral en los momentos de flaqueza.

A los doctores Juan Rodríguez, José Solís, Justo Rojas y Walter Estrada por habernos brindado la oportunidad de compartir con ellos la maestría.

Al CONCYTEC por financiar este trabajo de tesis.

Al Instituto Peruano de Energía Nuclear, al Lic. Marco Linares y Jhony Vargas; a la Sra. Anita Robles y muy especialmente a la Blga. Ketty León mis más sinceros agradecimientos por sus valiosas aportaciones en el desarrollo de las pruebas microbiológicas.

A mis amigos que me han apoyado desinteresada e incondicionalmente, afortunadamente la lista es larga pero, quisiera nombrar especialmente a Wilson Carhuapoma Bernabé.

Finalmente, a todos los miembros de mi familia en Lima, quienes me han acogido y brindado su apoyo. Mi más enorme gratitud a mis padres, Florencia y Claudio, y a mis hermanos, Melisa, Jose, Javier y Alan, por su invaluable confianza y comprensión, por apoyarme y acompañarme cuando estuve lejos de casa.

RESUMEN

Se ha preparado hidrogeles de alcohol polivinílico (PVA) - polivinil pirrolidona (PVP) conteniendo nanopartículas de plata utilizando radiación gamma. Las nanopartículas de plata fueron introducidas en la matriz polimérica por tres métodos diferentes. En el primer método, los nanocompuestos hidrogel/plata fueron obtenidos a partir de la irradiación de la mezcla de los precursores en solución acuosa. En el segundo método, el nanocompuesto fue obtenido por impregnación de las matrices poliméricas en una solución de AgNO_3 y posterior reducción de los Ag^+ inducida por irradiación gamma. En el tercer método, los nanocompuestos fueron obtenidos impregnando los hidrogeles en estado de películas secas en soluciones coloidales de nanopartículas de plata. La formación de las nanopartículas en las matrices poliméricas fue confirmada por espectroscopia UV-Visible, FTIR y DRX. Las imágenes obtenidas por MET muestran una distribución homogénea de las nanopartículas en la matriz de hidrogel cuyos tamaños estarían entre 10 y 15 nm. Así mismo, la topografía de las muestras fue analizada por MFA observándose, principalmente, cambios en la rugosidad por efecto de la incorporación de la plata.

Los hidrogeles de PVA y PVP fueron obtenidos por entrecruzamiento por radiación gamma. Soluciones acuosas de ambos polímeros en diferentes concentraciones fueron mezcladas en distintas proporciones. La concentración total de los polímeros en la mezcla varió entre 9 y 15 %. La dosis de radiación varió entre 10 y 30 kGy a una tasa de dosis constante de 8 kGy/h. Los hidrogeles de PVA alcanzaron grados de hinchamiento de 400% mientras que los hidrogeles de PVA-PVP alcanzaron grados de hinchamiento hasta de 1000%.

Los coloides de nanopartículas de plata fueron obtenidos por reducción inducida por radiación gamma a partir de soluciones acuosas de AgNO_3 , usando isopropanol como neutralizador de radicales y PVP y PVA como estabilizadores del coloide. La influencia de cada componente en la formación de las nanopartículas, fueron evaluadas por espectroscopia UV-Visible y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET), observándose formaciones dendríticas para la solución acuosa de AgNO_3 , partículas aglomeradas para las mezclas AgNO_3 -isopropanol y nanopartículas para las mezclas de AgNO_3 -polímero y AgNO_3 -polímero-isopropanol. Se ha observado que la concentración de isopropanol es determinante en la formación de las nanopartículas, ya que en cantidades insuficientes se ve principalmente favorecida las formaciones de óxidos, en su mayoría Ag_2O . El tamaño y forma de las nanopartículas son fuertemente

influenciadas por el tipo de polímero así como de su concentración. El tamaño de las nanopartículas obtenidas usando PVP y concentraciones de alcohol entre 2 y 6 M oscilan alrededor de 25 nm, con una distribución de tamaño de partículas estrecha. Sin embargo, las nanopartículas obtenidas usando PVA presentaron una amplia distribución de tamaños (entre 17 y 100 nm). En este caso se observaron formaciones tipo nanovarillas cuya formación se vio favorecida para concentraciones de PVA al 1%. Los espectros UV-Visible de los coloides obtenidos confirman la presencia de nanopartículas de plata al observarse los máximos de la banda de absorción del plasmón superficial alrededor de 410 nm.

La eficiencia antibacteriana de los coloides y nanocompuestos hidrogel/Ag fue evaluada frente a la bacteria Gram positiva *S. aureus* y frente a la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa* observándose que, ambos presentan actividad antibacteriana y que ésta depende principalmente de la concentración de plata presente. Por lo tanto, estos hidrogeles tienen un gran potencial para ser utilizados como apósitos en el tratamiento de heridas y quemaduras.

HIDROGELES DE PVA-PVP CONTENIENDO NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDOS POR RADIACIÓN GAMMA

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	iv
Índice.....	vi

INDICE

1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.2 Situación actual de la investigación.....	2
1.3 Objetivos	5
2. Fundamento Teórico	6
2.1 Fundamentos de las Radiaciones Ionizantes	6
2.1.1 Clasificación de las radiaciones ionizantes	6
2.1.2 Tipos de radiaciones ionizantes.....	6
2.1.3 Interacción de la radiación con la materia.....	8
2.1.3.1 Radiólisis del agua.....	10
2.1.4 Definiciones y unidades de magnitudes dosimétricas	12
2.1.5 Fuentes de radiaciones ionizantes	13
2.1.6 Aplicaciones de las radiaciones en la industria.....	15
2.2 Hidrogeles.....	17

2.2.1 Mecanismos de obtención de hidrogeles.....	17
2.2.2 Uso de radiaciones para la formación de hidrogeles	18
2.2.3 Mecanismos de entrecruzamiento inducido por radiaciones en polímeros en solución acuosa.....	18
2.2.4 Aplicaciones biomédicas de los hidrogeles.....	20
2.2.5 Características de los hidrogeles para apósitos de heridas	21
2.2.6 Ventajas de la tecnología de la radiación comparada con los métodos convencionales.....	22
2.3 Materiales nanoestructurados	22
2.3.1 Propiedades de nanopartículas	23
2.3.2 Estrategias para contener nanopartículas.....	28
2.3.3 Síntesis radiolítica de nanopartículas de plata.....	29
2.3.4 Propiedades de nanopartículas plata en apósitos de heridas y otros	30
3. Descripción de técnicas experimentales	31
3.1 Obtención de Hidrogeles PVA y PVA-PVP por radiación gamma.....	31
3.2 Síntesis radiolítica de nanopartículas de plata.....	32
3.2.1 Síntesis de nanopartículas de plata utilizando PVP como estabilizador del coloide.....	32
3.2.2 Síntesis de nanopartículas de plata utilizando PVA como estabilizador del coloide.....	33
3.3 Preparación de los nanocompuestos hidrogel/Ag.....	33
3.3.1 Método I	33
3.3.2 Método II	34
3.3.3 Método III	34
3.4 Evaluación de propiedades de hidrogeles y coloides	35

3.4.1	Determinación del grado de hinchamiento de hidrogeles.....	35
3.4.2	Evaluación de la actividad antibacteriana de coloides e hidrogles	35
3.5	Técnicas de caracterización	36
3.5.1	Espectroscopia infrarroja por transformada de fourier (FTIR)	36
3.5.2	Espectroscopia Ultravioleta y Visible (UV-Vis)	38
3.5.3	Difracción de Rayos X (DRX)	40
3.5.4	Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).....	43
3.5.5	Microscopia de Fuerzas Atómicas (MFA)	45
4.	Resultados y Discusión	49
4.1	Hidrogeles de PVA y PVA-PVP	49
4.1.1	Determinación del grado de hinchamiento.....	52
4.1.2	Caracterización de películas PVA y PVA-PVP por FTIR.....	55
4.1.3	Caracterización de películas PVA y PVA-PVP por UV-Vis.....	59
4.1.4	Caracterización de películas PVA y PVA-PVP por DRX.....	59
4.2	Nanopartículas de plata empleando PVP como estabilizador del coloide.....	61
4.2.1.	Coloides obtenidos a partir de mezclas AgNO ₃ -PVP	61
4.2.2.	Coloides obtenidos a partir de mezclas AgNO ₃ -PVP-isopropanol.....	64
	a) Efecto de la concentración de AgNO ₃	64
	b) Efecto de la concentración del isopropanol	66
4.3	Nanopartículas de plata empleando PVA como estabilizador del coloide.....	69
4.3.1	Coloides obtenidos a partir de mezclas AgNO ₃ -PVA	69
4.3.2	Coloides obtenidos a partir de mezclas AgNO ₃ -PVA-isopropanol.....	72
	a) Efecto de la concentración de AgNO ₃	72

b) Efecto de la concentración del isopropanol.....	75
c) Efecto de la concentración del PVA.....	76
4.4 Efecto de la dosis de irradiación en la formación de nanopartículas	79
4.5 Nanocompuestos Hidrogel/Ag	81
4.5.1 Método I	82
4.5.1.1. Caracterización de los nanocompuestos	84
4.5.1.2. Evaluación de la actividad antibacteriana de los nanocompuestos	90
4.5.2 Método II.....	92
4.5.2.1. Caracterización de los nanocompuestos.....	93
4.5.2.2. Evaluación de la actividad antibacteriana de los nanocompuestos	96
4.5.3 Método III	97
4.5.3.1. Evaluación de la actividad antibacteriana de los coloides	99
4.5.3.2. Caracterización de los nanocompuestos	103
4.5.3.3. Evaluación de la actividad antibacteriana de los nanocompuestos ...	104
5. Conclusiones y Recomendaciones	108
6. Anexos	113
6.1 Anexo 1	113
6.2 Anexo 2.....	114
7. Bibliografía.....	116

1. Introducción

El estudio y preparación de partículas metálicas con dimensiones nanométricas son de gran interés en investigación y tecnología de los materiales debido a que poseen propiedades ópticas, magnéticas y electrónicas importantes. Las propiedades intrínsecas de las nanopartículas metálicas están determinadas por su tamaño, forma, composición y cristalinidad. [1,2]. En tal sentido, las nanopartículas pueden ser ventajosamente utilizadas en el desarrollo y fabricación de nuevos dispositivos tales como biosensores, dispositivos electro ópticos, materiales con alta capacidad de almacenamiento de datos o catalizadores [3-6].

Actualmente, las nanopartículas de plata y sus compuestos están siendo muy estudiados en virtud de sus numerosas aplicaciones en diferentes campos de la ciencia, tales como substratos optimizados para espectroscopia Raman (SERS) [7,8], biosensores ópticos [9], sondas ópticas de campo cercano [10], como catalizador [11] y quizá su aplicación mas prometedora es en el campo de la medicina como agentes antimicrobianos [12-14].

Se han reportado numerosas técnicas para la preparación de nanopartículas de plata, tales como reducción química [15-17], fotoquímica [18,19], electroquímica [20,21], sonoquímica [22] y radiolítica [23-25]. De éstas, la síntesis radiolítica es la mas promisorio debido a que posee algunas importantes ventajas comparado con los métodos químicos y fotoquímicos convencionales como son: (i) El proceso es simple y limpio (ii) la irradiación con rayos gamma es segura e inofensiva (iii) la reducción controlada de iones metálicos puede llevarse a cabo sin usar excesivo agente reductor o generar productos de oxidación indeseados (iv) el método puede proporcionar nanopartículas metálicas completamente reducidas y de alta pureza y estabilidad [25].

Por su parte, los hidrogeles constituyen una clase de biomateriales poliméricos de un amplio campo de aplicación, siendo su uso en el campo de la medicina y farmacia el más exitoso y promisorio. Una parte de este éxito está relacionado con algunas propiedades importantes que poseen, son blandos, elásticos e hidrofílicos pero insolubles en agua. Tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua hinchándose y aumentando considerablemente su volumen sin perder su forma hasta alcanzar un equilibrio de hinchamiento [26]. El Alcohol Polivinílico y la Polivinil Pirrolidona son dos de los polímeros más utilizados en la preparación de esta clase de materiales. Debido a su hidrofilia, no toxicidad y facilidad para formar complejos, estos hidrogeles se utilizan en medicina, en las industrias farmacéuticas y de alimentos y constituyen una excelente matriz para contener nanopartículas.

1.1. Antecedentes

A pesar de los avances en el tratamiento de heridas por quemaduras, las infecciones continúan siendo la principal causa de mortandad en pacientes lesionados por quemaduras [13]. Se conoce desde la época de Hipócrates el efecto germicida de la plata. Los colonizadores de Norte América mantenían una moneda de plata en sus cantimploras para purificar el agua. Así mismo cuando antaño los bebés eran alimentados con cucharas de plata, se observaba que eran más sanos que los bebés que los que no las usaban. Así mismo, en tiempos del presidente mexicano Porfirio Díaz, el nitrato de plata fue uno de los elementos más importantes para los servicios públicos de salud, pues se aplicaba en los ojos de los niños recién nacidos para evitar infecciones bacterianas ocasionadas por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, o bien virales, como el herpes. Esa sola medida disminuyó la ceguera en un 95% [28]. Por esta razón compuestos basados en plata han sido usados ampliamente en muchas aplicaciones bactericidas. En el campo médico se han usado los compuestos de plata para tratar quemaduras y una variedad de infecciones. Se ha demostrado que los iones de plata son útiles y efectivos en aplicaciones bactericidas [29], pero debido a las propiedades únicas de las nanopartículas, la nanotecnología presenta una razonable alternativa para el desarrollo de nuevos bactericidas. Aunque la aplicación de la nanotecnología en medicina parece ser relativamente nueva, los alcances básicos de la nanotecnología para aplicaciones medicas datan de hace varias décadas. El primer sistema polimérico de liberación controlada de macromoléculas fue descrito en 1976 [30]; el primer punto cuántico bioconjugado fue descrito en 1998 [31-32], el primer nanohilo-nanosensor data del 2001 [33]. Las partículas metálicas en el rango del tamaño nanométrico exhiben propiedades físicas que son diferentes de los iones y el material en dimensiones grandes, Esto las hace interesantes para ser aplicados en diversos campos de la ciencia e ingeniería.

1.2. Situación actual de la investigación

El uso de hidrogeles como biomateriales se ha incrementado últimamente. Desde los 60's cuando Whichterle estudió hidrogeles de poli(2 hidroxí etil metacrilato) (PHEMA) para usos en oftalmología, las aplicaciones de estos materiales se ha extendido en diversas áreas de la medicina [34]. El primer apósito de hidrogel producido y comercializado no estaba muy lejos del estándar ideal de los apósitos para heridas. Este apósito fue producido por polimerización y entrecruzamiento químico de acrilamida y metil-bis-acrilamida en solución acuosa. En lugar de los métodos

químicos, en los últimos años la utilización de técnicas radiactivas para la formación de hidrogeles está siendo extensamente usada en todo el mundo. Hidrogeles para apósitos de heridas comerciales registrados bajo los nombres de Vigilon, Ivalon, Kik gel y HRD o Aqua Gel, vendidos principalmente en Europa Central, son sintetizados usando esta técnica. El creciente interés en el campo de la aplicación de la radiación a la bioingeniería fue también reconocido por la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA), la cual financió programas relacionados a estos estudios [35-37].

La inmovilización de especies biológicamente activas en matrices de hidrogeles, su uso como sistemas de liberación controlada de drogas y trampas para enzimas así como modificación superficial de materiales para mejorar su biocompatibilidad y habilidad de enlazar antígenos y anticuerpos son algunos de los objetivos de muchas investigaciones actuales. Así mismo, en vista de la creciente necesidad por desarrollar nuevos materiales bactericidas debido al incremento de la resistencia de las bacterias a los actuales antibióticos y aprovechando las ya muy bien conocidas propiedades antimicrobianas de la plata, actualmente se vienen desarrollando muchas investigaciones en este campo, especialmente en la síntesis de nanopartículas de plata. En relación a ello, Bertino y colaboradores [38], Choi y colaboradores [39] y Lee y Kang [40] sintetizaron aglomerados metálicos (Ag-Pt), nanopartículas de plata y nanopartículas magnéticas, respectivamente. En el trabajo de Bertino y colaboradores se empleó el método radiolítico para sintetizar nanoestructuras bimetálicas Ag-Pt, ellos encontraron que los parámetros para la formación de nanohilos son la tasa molar entre los dos metales y el grado de hidrólisis del PVA empleado como polímero recubridor de las nanopartículas. Taihua Li y colaboradores [25] han presentado la preparación inducida por radiación gamma de nanopartículas de plata y oro empleando PVP como estabilizador del coloide, y los compararon con aquellos obtenidos por métodos químicos. Junhwa Sinh y colaboradores [41] estudiaron el efecto del acetato de sodio, presente como impureza en el PVA, en la formación de nanopartículas de plata, ellos demostraron que el acetato de sodio promueve la formación radiolítica de nanopartículas de plata vía la formación de complejos los cuales podrían facilitar, en subsecuentes procesos de crecimiento, la creación de partículas más grandes.

Otro grupo de investigadores han estudiado las propiedades antimicrobianas de sistemas conteniendo nanopartículas de plata. A. Petica y colaboradores [14] han evaluado la eficiencia antibacteriana determinando la mínima concentración inhibitoria sobre bacterias Gram positiva y Gram negativa, de soluciones de plata coloidales obtenidos por técnicas electroquímicas. S. D. Oh y colaboradores [12] sintetizaron compuestos de nanopartículas de plata sobre poliestireno (PS) usando irradiación gamma, por dos métodos diferentes (procesos de dos pasos y un solo paso). En el

método de dos pasos, primero se sintetizaron las nanopartículas de PS por polimerización radiolítica y después se cargaron las nanopartículas de plata sobre la superficie del PS por medio de la reducción radiolítica de los iones de plata. En el método de un paso, tanto la polimerización radiolítica como la formación de las nanopartículas de plata se llevaron a cabo irradiando una solución que contenía iones plata y estireno. En este método de un paso las nanopartículas de plata se encontraron distribuidas dentro de las partículas de poliestireno, mientras que en el método de dos pasos las nanopartículas se encontraron mayormente en la superficie del PS. Un tejido recubierto con estas partículas mostraron una alta eficiencia antimicrobiana del 99.9% contra dos bacterias, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

Así mismo, en la búsqueda de diversos materiales para contener las nanopartículas de plata que puedan ser usados como apósitos para heridas, se han desarrollado diversas investigaciones, por ejemplo, nanocompuestos plata-polímero. Jum J. y colaboradores [42] han preparado nanofibras de PVA preparadas por electrospinning de soluciones acuosas de PVA con nanopartículas de fosfato de Zirconio cargadas con Ag^+ , para su potencial uso en materiales de curación de heridas. Thomas V. y colaboradores [43] han sintetizado nanocompuestos hidrogel/Ag por una metodología que implica la formación de nanopartículas de plata dentro de hidrogeles de poli(acrilamida-co-ácido acrílico) empleando métodos químicos, tanto para la formación del hidrogel como para la reducción de la plata. Por su parte, Yu H. y colaboradores [13] han incorporado nanopartículas de plata a hidrogeles de PVA-PVP que fueron preparados por métodos físicos de calentamiento y enfriamiento, mientras que la reducción de la plata para la formación de nanopartículas de plata se llevó a cabo por reducción química con citrato de sodio.

Se ha demostrado que la morfología, distribución de tamaños de partícula, estabilidad y propiedades de las nanopartículas de plata, así como de sus correspondientes compuestos, son fuertemente dependientes del método de preparación. En tal sentido se ha reportado que métodos basados en irradiación gamma permite obtener coloides de nanopartículas de plata con distribución de tamaños estrecho comparados con los métodos de reducción química convencionales [25].

En este trabajo se presentan los resultados de la obtención de coloides de nanopartículas de plata y de la incorporación de nanopartículas de plata a matrices poliméricas de hidrogeles de PVA y PVA-PVP por tres métodos diferentes. Se ha empleado técnicas radiolíticas tanto para la formación de las nanopartículas como para la formación del nanocompuesto hidrogel/plata. Estos materiales han sido caracterizados por diversas técnicas espectroscópicas y además se ha evaluado la

actividad antibacteriana frente a la bacteria Gram positiva, *S. aureus*, y frente a la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa*. Los nanocompuestos hidrogel/Ag obtenidos podrían ser empleados como apósitos para el tratamiento de quemaduras o lesiones graves a la piel.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Incorporar nanopartículas de plata a hidrogeles PVA y PVA-PVP, obtenidos radiolíticamente, a fin de que puedan ser empleados como apósitos para heridas.

1.3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar por técnicas radiolíticas nanopartículas de plata y evaluar su actividad antibacteriana.
- Evaluar el método más conveniente para la obtención de nanocompuestos hidrogel/Ag.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los nanocompuestos hidrogel/Ag obtenidos.

2. Fundamento teórico

2.1. Fundamentos de las Radiaciones Ionizantes

El término radiación, podemos definirlo como energía electromagnética o haz de partículas materiales que se propaga en el espacio a partir de un pozo emisor. Es también el término empleado para describir la emisión y transmisión de energía a través del espacio en forma de onda.

Por su parte, las radiaciones ionizantes son las radiaciones que en su interacción con la materia, viva o inerte, es capaz de ionizarla (desplazar electrones de los átomos o moléculas generando iones). Las principales radiaciones ionizantes son la radiación alfa, beta, gamma, los rayos X y la radiación de neutrones.

2.1.1. Clasificación de las radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes, por su naturaleza de interacción, se pueden clasificar de en:

Radiaciones directamente ionizantes: Radiación formada por fotones o partículas cargadas con la energía cinética suficiente para formar iones al colisionar con otros átomos. Estos son principalmente, los electrones energéticos, los positrones, los protones, las partículas alfa, los mesones cargados, los muones y los iones pesados (átomos ionizados).

Radiaciones indirectamente ionizantes: Radiación formada por partículas sin carga que interaccionan con la materia liberando partículas cargadas directamente ionizante. Los tipos más comunes de radiación indirectamente ionizante son los fotones con energía superior a 10 keV (rayos X y rayos gamma) y todos los neutrones.

2.1.2. Tipos de radiaciones ionizantes

Partículas alfa: Una partícula alfa es un conjunto de dos protones y dos neutrones estrechamente unidos. Es idéntica a un núcleo de helio 4 (^4He). De hecho, su destino último después de haber perdido la mayoría de su energía cinética es capturar dos electrones y convertirse en un átomo de helio.

Partículas beta: Una partícula beta es un electrón o positrón muy energético. (El positrón es la antipartícula del electrón. Tiene la misma masa y la mayoría de las demás propiedades del electrón, salvo su carga, cuya magnitud es exactamente la misma que la del electrón, pero de signo positivo). Los radionucleidos emisores beta pueden ser de peso atómico alto o bajo.

Radiación gamma: La radiación gamma es radiación electromagnética emitida por un núcleo cuando experimenta una transición de un estado de energía más alta a un estado energético más bajo. El número de protones y neutrones del núcleo no varía en estas transiciones. El núcleo puede haber quedado en el estado de más energía después de una desintegración alfa o beta anterior. Es decir, los rayos gamma se emiten a menudo inmediatamente después de una desintegración alfa o beta. Los rayos gamma también pueden ser el resultado de la captura de un neutrón y de la dispersión inelástica de partículas subatómicas por núcleos. Los rayos gamma más energéticos se han observado en los rayos cósmicos.

En la Figura 2.1 se representa el esquema de desintegración del cobalto 60 (^{60}Co). Muestra una cascada de dos rayos gamma emitidos para transformarse en níquel 60 (^{60}Ni), con energías de 1,17 MeV y 1,33 MeV, después de la desintegración beta del ^{60}Co . Mientras que las partículas alfa y beta tienen alcances definidos en la materia, los rayos gamma experimentan una atenuación exponencial (si se pasa por alto la acumulación que resulta de la dispersión dentro de un material) a medida que atraviesan la materia.

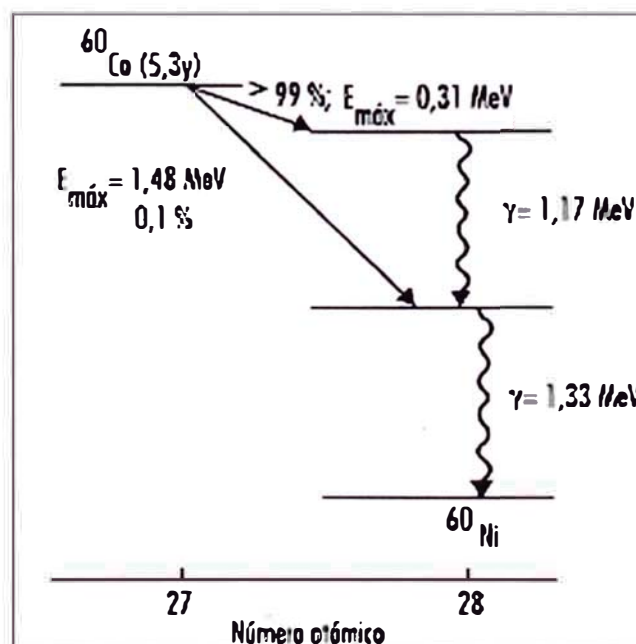


Figura 2.1. Esquema de desintegración radiactiva del ^{60}Co .

Rayos X: Son una radiación electromagnética de corta longitud de onda (entre 100 y 1Å) y muy penetrante producida por la desexcitación de los niveles energéticos profundos de los átomos de número atómico Z mayor de 10. La radiación X es de naturaleza esencialmente idéntica a la radiación gamma, diferenciándose exclusivamente por su origen; mientras la radiación gamma procede de cambios energéticos ocurridos en el interior del núcleo atómico, la radiación X se origina por procesos atómicos exteriores al núcleo.

2.1.3. Interacción de las radiaciones con la materia

El paso de partículas cargadas y fotones a través de la materia está gobernado por las leyes de la Física Atómica, si bien algunas interacciones ocurren en los núcleos. Se pueden producir tres tipos de situaciones:

- i) La partícula sufre muchas interacciones: Pierde una pequeña cantidad de energía o desvía su trayectoria.
- ii) Pasa sin sufrir ninguna interacción
- iii) La partícula es absorbida por material

Una partícula cargada cubierta por su campo de fuerza eléctrica coulumbiana, interactúa con uno o más electrones o con los núcleos de prácticamente todo átomo que esté en su recorrido. En la mayoría de estas interacciones individuales se transfiere solamente una mínima fracción de la energía cinética de la partícula incidente. Las interacciones coulumbianas entre el electrón incidente y los electrones orbitales del material tienen como resultado la ionización y excitación de átomos. Las partículas cargadas a diferencia de las eléctricamente neutras inducen gran cantidad de ionización y excitación durante todo su recorrido.

Los fotones de los rayos X y gamma interactúan con la materia y causan ionización de tres maneras diferentes (Figura 2.2):

- 1) Los fotones de energía más baja interactúan sobre todo mediante el efecto fotoeléctrico, por el cual el fotón cede toda su energía a un electrón, que entonces abandona el átomo o molécula. El fotón desaparece.
- 2) Los fotones de energía intermedia interactúan fundamentalmente mediante el efecto Compton, en virtud del cual el fotón y un electrón colisionan esencialmente como partículas. El fotón continúa su trayectoria en una nueva dirección con su

energía disminuida, mientras que el electrón liberado parte con el resto de la energía entrante (menos la energía de unión del electrón al átomo o a la molécula).

- 3) La producción de pares sólo es posible con fotones cuya energía sea superior a 1,02 MeV. (Sin embargo, cerca de 1,02 MeV, el efecto Compton predomina todavía. La producción de pares predomina con energías más altas.) El fotón desaparece, y en su lugar aparece el par electrón-positrón (este fenómeno sólo ocurre en la proximidad de un núcleo, por consideraciones de conservación del momento cinético y de la energía). La energía cinética total del par electrón-positrón es igual a la energía del fotón menos la suma de las energías de la masa residual de electrón y positrón (1,02 MeV). Estos electrones y positrones energéticos se comportan entonces como radiación ionizante directa. A medida que pierde energía cinética, un positrón puede llegar a encontrarse con un electrón, y las partículas se aniquilarán entre sí. Entonces se emiten dos fotones de 0,511 MeV (por lo general) desde el punto de aniquilación, a 180 grados uno de otro. Con un fotón dado puede ocurrir cualquiera de estos supuestos, salvo que la producción de pares sólo es posible con fotones de energía superior a 1,022 MeV. La energía del fotón y el material con el que interactúa determinan qué interacción es la más probable.

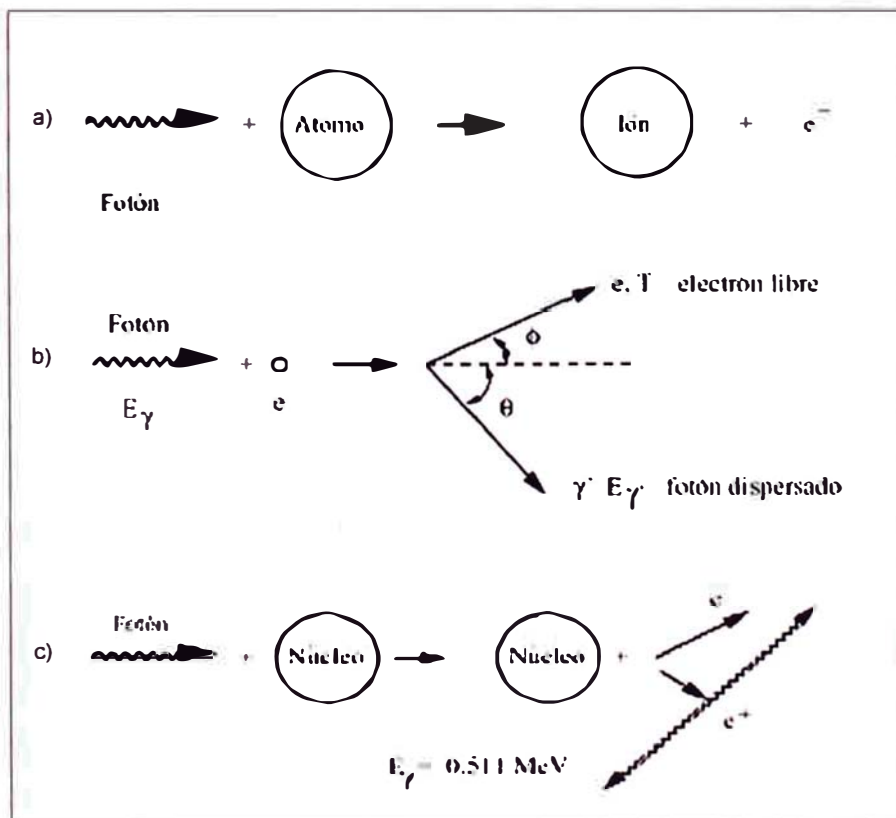


Figura 2.2. Procesos de interacción de los fotones con la materia a) Efecto Fotoeléctrico, b) Efecto Compton y c) Creación de pares.

La Figura 2.3 muestra las regiones en las que predomina cada tipo de interacción en función de la energía del fotón y del número atómico del absorbente.

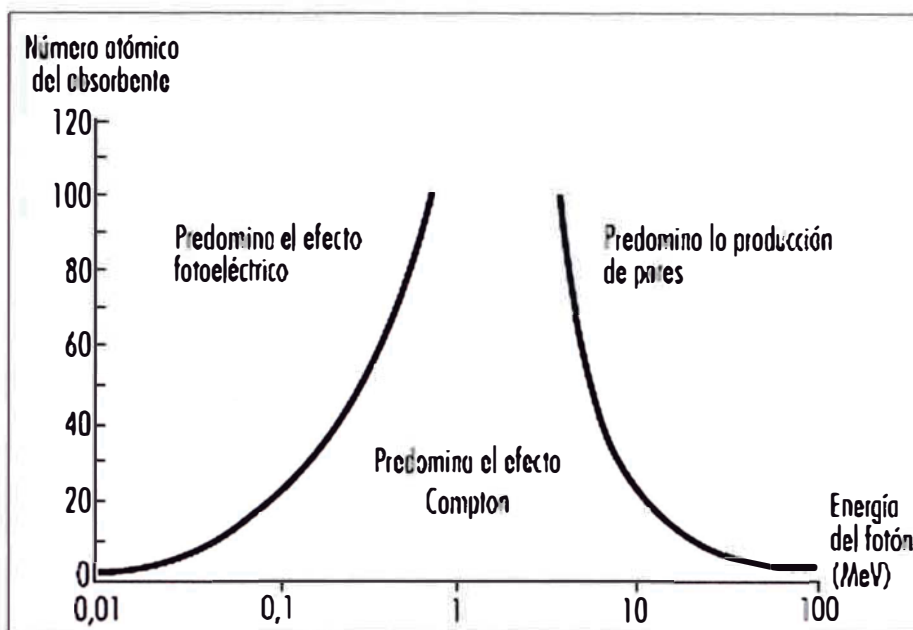


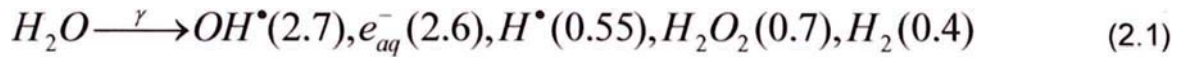
Figura 2.3. Importancia relativa de las tres interacciones de los fotones con la materia.

Las interacciones más comunes del neutrón con la materia son colisiones inelásticas, captura (o activación) de neutrón y fisión. Todas ellas son interacciones con núcleos. Un núcleo que colisiona inelásticamente con un neutrón queda en un nivel de energía más alto. Entonces puede liberar esta energía en forma de un rayo gamma, mediante la emisión de una partícula beta o de ambas formas. En la captura de neutrones, un núcleo afectado puede absorber el neutrón y expulsar energía en forma de rayos gamma o X o partículas beta, o ambas cosas. Las partículas secundarias causan después ionización, como se ha visto antes. En la fisión, un núcleo pesado puede absorber al neutrón y se desdobra en dos núcleos más ligeros, que casi siempre son radiactivos.

2.1.3.1 Radiólisis del agua

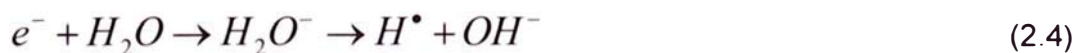
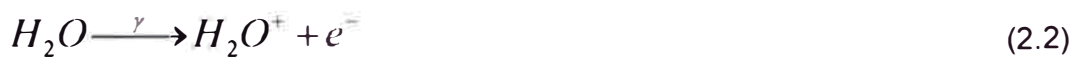
Para el caso de materiales biológicos y de aquellos, no biológicos, que se encuentren en sistemas acuosos; producto de la interacción de los fotones con la materia ocurren eventos fisicoquímicos, en particular la radiólisis del agua, produciendo electrones altamente reactivos, iones radicales y radicales neutros; según la ecuación (2.1). Los valores en paréntesis son los valores G definidos como el número de moléculas o especies formadas por 100 eV de energía absorbida.

Puesto que las condiciones en las que se desarrollan nuestro trabajo, es en presencia de agua, básicamente, el proceso inicial durante la irradiación será la radiólisis del agua, la cual es importante describir para la comprensión de los mecanismos que se desarrollarán al interactuar la radiación gamma con nuestros sistemas.



La radiólisis del agua produce casi igual número de poderosos radicales primarios oxidantes y reductores. Aunque la acción de las radiaciones sobre el agua o radiólisis del agua es una suma de procesos complejos, puede simplificarse resumiéndose en dos casos: La descomposición molecular del agua y la formación de radicales libres.

En primer lugar la radiación incidente sobre las moléculas de agua puede ionizarlas de tal manera que deja un ion H_2O^+ y un electrón libres de acuerdo a la ecuación 2.2. A este electrón se le llama electrón acuoso o hidratado pues es muy lento ya que casi toda la energía se ha invertido en arrancarlo de la molécula. El ion H_2O^+ es muy inestable y rápidamente se descompone en un H^+ y en un radical OH^\bullet , ecuación (2.3). El electrón acuoso, puede reaccionar con otras moléculas orgánicas o con una segunda molécula de agua produciendo radicales H^\bullet e iones hidroxilo OH^- , ecuación (2.4).



Los radicales H^\bullet y OH^\bullet son moléculas neutras con gran reactividad química pues tienen un electrón desapareado que con muy poco esfuerzo tenderá a crear enlaces y robar así átomos a otras moléculas. Los iones hidroxilo y los protones libres al ser partículas con cargas opuestas no son peligrosos pues tenderán a atraerse neutralizándose y formando de nuevo agua.

Existe también la posibilidad más directa de formar los radicales libres con la sola excitación inducida a partir de la radiación de una molécula de agua de acuerdo a la ecuación (2.5). Los fenómenos que se producen al excitarse la molécula de agua, no son bien conocidos, pero teóricamente es posible la disociación de esta en radicales H^\bullet

y OH^\bullet . De una manera u otra se forman radicales que no poseen electrones apareados, lo que los hace altamente reactivos, bien como agentes oxidantes o reductores.



Los radicales se distribuyen de forma heterogénea a lo largo de la trayectoria de radiación, dependiendo de la transferencia lineal de energía de radiación (LET en inglés). Una buena parte de ellos se pierden en reacciones neutralizadoras combinándose de acuerdo a las ecuaciones (2.6) a (2.8).



Pero otros se propagan pudiendo llegar a desencadenar nuevas reacciones como se muestra en la ecuación (2.9).



2.1.4. Definiciones y unidades de magnitudes dosimétricas

Dosis absorbida: Es la cantidad dosimétrica fundamental de la radiación ionizante. En esencia, es la energía que la radiación ionizante imparte a la materia por unidad de masa. Se expresa por:

$$D = \frac{d\varepsilon}{dm} \quad (2.10)$$

Donde D es la dosis absorbida, $d\varepsilon$ es la energía media impartida a la materia de masa dm . La unidad de dosis absorbida es el julio por kilogramo (J kg^{-1}). A esta unidad, en el sistema internacional, se le da el nombre de Gray, abreviado Gy. Equivale a la absorción de la energía de 1 julio por kilogramo de sustancia irradiada. La unidad

tradicional es el rad, que a su vez equivale a la absorción de 100 ergios de energía por gramo de sustancia irradiada. $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg} = 10^4 \text{ erg/g} = 100 \text{ rads}$.

Tasa de dosis absorbida: La tasa de dosis de radiación es la dosis de radiación por unidad de tiempo, expresado como:

$$\dot{D} = \frac{dD}{dt} \quad (2.11)$$

Donde \dot{D} es la tasa de dosis, dD es el incremento de la dosis absorbida en el intervalo de tiempo dt . Sus unidades son: $\text{J.kg}^{-1}.\text{s}^{-1}$ o Gy.s^{-1} .

Actividad de una fuente radiactiva: Número de desintegraciones de una determinada masa de material radiactivo por unidad de tiempo. Conforme a la ley de la desintegración radiactiva es igual al producto del número de átomos del isótopo radiactivo presentes (N), por la constante de desintegración (λ)

$$A = \frac{dN}{dt} = \lambda N = \lambda N_0 e^{-\lambda t} = A_0 e^{-\lambda t} \quad (2.12)$$

Siendo:

- N_0 número inicial de átomos
- λN_0 actividad inicial (A_0)
- λN actividad en un tiempo cualquiera t

La unidad en el Sistema Internacional es el Becquerelio (Bq), que equivale a una desintegración por segundo. La unidad tradicional, muy utilizada, es el Curio (Ci), que equivale a 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo o becquerelios.

2.1.5. Fuentes de radiación ionizante

Normalmente se definen como fuentes radiactivas o de radiación a aquellas fuentes encapsuladas y selladas utilizadas en radioterapia, radiografía o en varios tipos de medidas industriales. Los aceleradores y generadores de radioisótopos pueden considerarse también fuente de radiación.

Diversos tipos de radiación están disponibles: rayos gamma a partir del radioisotopo ^{60}Co , haces de iones y electrones generados por aceleradores de partículas y neutrones a partir de reactores, aceleradores ó radioisótopos.

En tal sentido, los irradiadores con material radiactivo son máquinas útiles para llevar a cabo procesos inducidos por la radiación ionizante. En ellas se usa material radiactivo (^{60}Co o ^{137}Cs , principalmente) para uso industrial o para apoyo de la investigación científica.

El diseño de los irradiadores se ha dado en función de las necesidades. Así, por ejemplo, los hay móviles para que se pueden desplazar hacia los campos de cultivo agrícola, otros son relativamente pequeños y con autoblindaje, conocidos como los "gammacell", con peso aproximado de cinco toneladas, que se utilizan comúnmente en laboratorios de investigación de las áreas médica, química, farmacéutica, física, etcétera, hasta los de tipo semi-industrial e industrial con capacidades de trabajo diario de varias toneladas de procesamiento de productos inorgánicos y orgánicos.

Otras de las facilidades de irradiación mas empleadas son la denominada tipo "piscina" en estas el material radiactivo (^{60}Co generalmente) está ensamblado en barras de acero inoxidable sellado, que evita el contacto directo con el blindaje biológico (agua des-ionizada) y con las muestras de laboratorio o los productos industriales. El manejo de las barras se opera de manera remota a través de una consola y una llave clave de acceso. Los productos o muestras a irradiar pueden colocarse por tiempos predeterminados con el fin de alcanzar la dosis deseada, y pueden obtenerse dosis variables seleccionando el número de fuentes, sus posiciones o alturas respecto del piso o distancia respecto al centro de las mismas.

El Perú cuenta con una Planta de Irradiación Multi Uso (PIMU), tipo piscina, ubicada en el distrito de Santa Anita. Así mismo, el Centro Nuclear RACSO del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN) cuenta con el reactor RP-10, un reactor tipo piscina con una potencia térmica de 10 MW generado por un combustible tipo MTR conteniendo (U_3O_8) enriquecido al 20% en ^{235}U , empleado principalmente para la producción de radioisótopos, y un equipo de Irradiación Gammacell (Figura 2.4).



Figura 2.4. Irradiador Gammacell 220 Excel del Centro Nuclear RACSO del IPEN.

2.1.6. Aplicaciones de las radiaciones en la industria

La utilización de radiaciones ionizantes ha sido de enorme interés académico y de aplicación industrial directa. Es un medio, algunas veces único, para inducir estados de no equilibrio en la materia, con lo cual nuevos materiales pueden crearse con nuevas propiedades. Utilizando esta habilidad para alterar las propiedades de los materiales, la radiación ha sido ampliamente aplicada en agricultura, medicina y conservación ambiental así como en industria para mejorar nuestra vida.

En la industria, muchas aplicaciones de irradiación de materiales han sido desarrolladas para la producción de micro y nano materiales de alto interés tecnológico. En el área médica, uno de los principales usos de la radiación ionizante, ha sido la esterilización de artículos médicos desechables: suturas, sondas, etc. Esta aplicación se empezó a utilizar a escala comercial a mediados de la década de los 50's, cuando se tuvo acceso a grandes fuentes de radiación, tales como plantas de irradiación gamma con fuentes de ^{60}Co o de ^{137}Cs y aceleradores de electrones. En la década de los 70's se esterilizaban con radiación menos del 10% de los artículos médicos desechables fabricados, actualmente, se esterilizan con este método casi el 50% de los mismos, con tendencia a incrementarse [44]. Otra de aplicación industrial de las radiaciones ionizantes es en la modificación molecular de polímeros. Esta se

emplea generalmente con el fin de mejorar las propiedades físicas, mejor resistencia al calor, a los solventes agresivos, etc.

Actualmente el IPEN, aplica la Tecnología de Irradiación para el tratamiento de Alimentos secos o Vegetales deshidratados en polvo, como harinas de maca, espárrago, plátano, lúcuma. En plantas y Hierbas medicinales (complementos nutricionales) por ejemplo: uña de gato, pasuchaca, muña, graviola, sangre de grado, manayupa. En Especies y condimentos como la pimienta, comino, palillo, orégano. En Colorantes orgánicos naturales como el carmín, cúrcuma achiote y en hierbas aromáticas como la manzanilla, anís, hierba luisa, té. También el proceso de irradiación permite reducir la población microbiana nativa y eliminar la presencia de microorganismos patógenos en productos frescos o congelados como: camarones, langostinos, tentáculos de pulpo, conchas de abanico, etc.

La irradiación de alimentos elimina microorganismos sin introducir sustancias extrañas. Al prolongar la vida útil permite alcanzar mercados más distantes. Al mejorar la calidad sanitaria, permite alcanzar mercados exigentes. La radiación gamma es una alternativa como tratamiento cuarentenario para la exportación de frutas y hortalizas, debemos agregar que: El Perú es el primer exportador Mundial de Espárragos verdes a Estados Unidos, para solucionar problemas fitosanitarios los espárragos son fumigados con Bromuro de Metilo, fumigante Químico cuyo uso ha sido prohibido a partir del 2005, según el Protocolo de Montreal de 1997 por ser perjudicial para la salud y un gran depresor de la capa de ozono. El IPEN ha firmado un convenio con el Instituto Peruano del Espárrago y Hortalizas (IPEH) para solucionar este problema fitosanitario (*Lepidóptero Copitarsia sp*) para la exportación de los espárragos.

En el Perú por el problema de plagas no podemos exportar frutas y vegetales a los Estados Unidos y Japón, con la tecnología de Irradiación como tratamiento Cuarentenario previa investigación podríamos introducir nuestras frutas y vegetales de exportación (Mangos Haden y Kent, de Piura, Palta Hass y Fuerte de Ayacucho, Espárragos de la Costa Sur y Norte, Alcachofas, Cítricos de Huaral como Naranja Huando, Mandarina Satsuma, etc) ha estos países con restricciones fitosanitarias. En el IPEN se han desarrollado investigaciones en Mangos con la finalidad de conservarlos para la exportación a Europa y como Tratamiento cuarentenario para la exportación a los Estados Unidos o Japón. También la irradiación permitiría la producción de alimentos especiales para sectores poblacionales específicos (pacientes inmunodeprimidos y ancianos).

2.2. Hidrogeles

Los hidrogeles pueden definirse como sistemas bi o multicomponentes que consisten de una red tridimensional de cadenas poliméricas y agua que llena el espacio entre macromoléculas. Dependiendo de las propiedades del polímero usado así como de la naturaleza y densidad de las uniones en la red, tales estructuras en un equilibrio pueden contener grandes cantidades de agua, aumentando considerablemente su volumen, manteniendo memoria de su forma en seco, hasta alcanzar un equilibrio.

En general un solo monómero no proporciona al mismo tiempo buenas propiedades mecánicas y gran retención del agua por lo que es necesario recurrir a la copolimerización o blendas para poder obtener ambas propiedades.

Se pueden definir dos clases de hidrogeles:

- **Geles físicos** (pseudogeles) donde las cadenas están conectadas por fuerzas electrostáticas, enlaces de Hidrógeno y enredos (marañas) de cadenas. Tales geles no son permanentes y usualmente pueden ser convertidos a polímeros en solución por calentamiento.
- **Hidrogeles químicos** (verdaderos o permanentes), son hidrogeles con enlaces covalentes uniendo las cadenas. Estos enlaces son los mismos que se encuentran en la cadena principal de modo que son resistentes a cualquier solvente y a procesos de fusión. Ellos pueden romperse por reacciones químicas o estrés, y tal escisión es irreversible.

En este trabajo nos avocaremos a la formación y aplicación de redes poliméricas permanentes.

2.2.1. Mecanismos de obtención de hidrogeles

En general, los hidrogeles pueden obtenerse por dos técnicas:

- **Técnicas no radiactivas:** Dentro de estas podemos mencionar a los métodos químicos, en los cuales se usan reactivos químicos como glutaraldehído, formaldehído, persulfato de amonio, entre otros, para entrecruzar las cadenas poliméricas. Y métodos físicos, en donde la

formación del gel se lleva a cabo por procesos repetitivos de calentamiento y enfriamiento de los polímeros en solución acuosa.

- **Técnicas radiactivas:** Esta técnica incluye la irradiación del polímero en estado sólido, polímero en solución acuosa o la irradiación del monómero. Para la obtención de hidrogeles empleando técnicas radiactivas, generalmente se emplean fuentes de radiación gamma, a partir de isótopos como el ^{60}Co .

2.2.2. Uso de Radiaciones para la formación de Hidrogeles

La radiación comúnmente ha sido desde hace mucho reconocida como una herramienta muy apropiada para la formación de hidrogeles ya que permite obtener productos con propiedades deseadas, tales como ausencia de sustancias tóxicas (monómeros, iniciadores, agentes de entrecruzamiento y aditivos) que son normalmente usados en los procedimientos químicos.

Cuando un polímero es sujeto a radiaciones ionizantes usualmente se observa el entrecruzamiento y la escisión de la cadena principal, estos procesos causan finalmente la formación de un gel insoluble si el entrecruzamiento predomina sobre la escisión. El método especialmente conveniente para ello es la irradiación de polímeros en solución acuosa, puesto que tales sistemas no contienen ni monómeros ni agentes entrecruzantes (frecuentemente usados en la formación del gel) son fáciles de controlar y estudiar. También con la aplicación de este método disminuye el número de procesos no deseados como injertos del monómero sobre la cadena polimérica principal, lo cual puede conducir a estructuras poliméricas ramificadas. Por último, pero no menos importante, los hidrogeles así formados son apropiados para uso biomédicos y no necesitan purificación posterior. Ejemplos típicos de polímeros sintéticos usados para la formación de hidrogeles por este método son el Polivinil alcohol (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polióxido de etileno (PEO), poliacrilamida (PAAm) y poliácidoacrílico (PAA).

2.2.3. Mecanismos de entrecruzamiento inducido por radiaciones en polímeros en solución acuosa

Cuando un polímero en solución acuosa es sometido a radiaciones ionizantes se forman intermediarios reactivos. Esto puede resultar de la acción directa de una

cadena polimérica y de efectos indirectos; por ejemplo: reacción de los intermediarios generados en agua con moléculas poliméricas.

Las tres especies reactivas principales formadas en agua bajo irradiación son: electrones hidratados (e^-_{aq}), radicales hidroxilo (OH^\bullet) y átomos de Hidrógeno. Se ha demostrado que los radicales hidroxilos son las principales especies responsables de transferir reactividad desde el agua hacia la cadena polimérica. Estos extraen átomos de Hidrógeno de las macromoléculas, formando así radicales poliméricos, los cuales posteriormente se recombinan para formar la red tridimensional del hidrogel.

En base a los datos disponibles para PVP y PVA, como se puede ver en la Figura 2.5, se sabe no hay un blanco único para el ataque de los OH^\bullet sobre estas macromoléculas. Para el caso del PVA se observa algo de selectividad, dado que el ataque de los grupos hidroxilo es preferentemente sobre los carbonos en la posición α . Del mismo modo que para el PVP, dos de las cinco posiciones son los principales sitios de ataque.

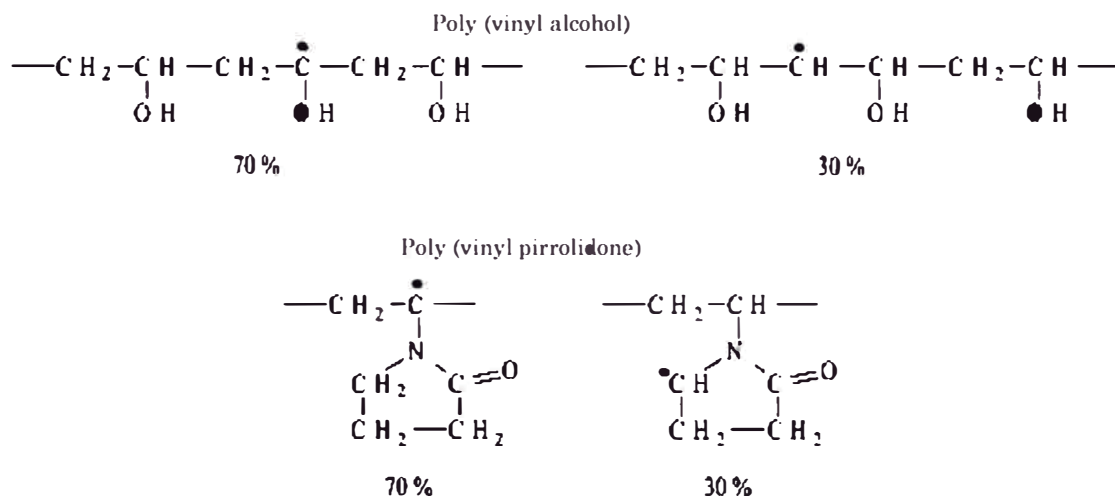


Figura 2.5. Estructura de los radicales poliméricos formados por irradiación del PVA y PVP en solución acuosa.

Puesto que la estructura del material entrecruzado y la energía de enlaces entre cadenas dependen de la estructura de la recombinación de los radicales uno puede anticipar que la localización de los radicales antes de producirse el entrecruzamiento puede influenciar la estructura y propiedades del producto final.

Desde el punto de vista práctico en la formación de hidrogeles, la reacción más importante de macro radicales es de entrecruzamiento intermolecular, por ejemplo la recombinación de dos radicales localizados sobre dos macro radicales diferentes.

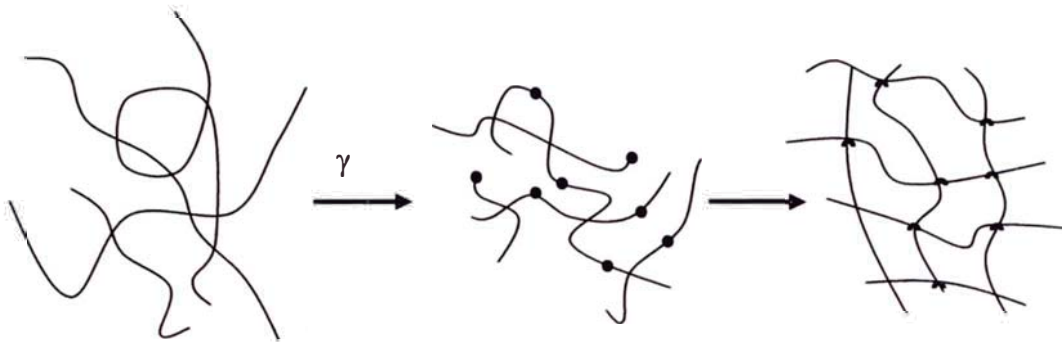


Figura 2.6. Representación esquemática del entrecruzamiento intermolecular de las cadenas poliméricas debido a la creación de macro radicales.

Sin embargo hay una competencia entre el entrecruzamiento Inter e Intramolecular que depende de la concentración del polímero. Otro parámetro igualmente importante para esta competencia es la tasa de dosis, por ejemplo una tasa de dosis alta reduce enormemente la recombinación intermolecular.

Los estudios al respecto afirman que alta concentración de polímero y baja tasa de dosis promueve la formación de gel mientras que en soluciones diluidas irradiadas con altas tasas de dosis se puede esperar la predominación de recombinación intramolecular.

Otro parámetro en contra a la formación de hidrogeles es la presencia de oxígeno ya que se sabe que la formación de geles es más eficiente en sistemas libres de oxígeno ya que en soluciones poliméricas que contienen oxígeno los macro radicales inicialmente generados reaccionaran con el oxígeno para formar radicales peroxil los cuales forman enlaces inestables [45].

En la Figura 2.6 se representa esquemáticamente el entrecruzamiento intermolecular de las cadenas poliméricas para la formación de la red tridimensional del hidrogel.

2.2.4. Aplicaciones biomédicas de los hidrogeles

Los hidrogeles han sido usados como implantes para reparar defectos de cráneo, nariz y mentón, paladar hendido, como películas para reemplazos de tímpanos de oído y para otros propósitos especiales. Sin embargo, su aplicación mas difundida ha sido la liberación controlada de agentes bioactivos el cual consiste en la difusión del fármaco a

través del polímero, inicialmente en estado vítreo, bajo difusión en contracorriente de agua o fluido biológico. El comportamiento de hinchamiento del hidrogel va a determinar el mecanismo de liberación difusional del fármaco. Otras aplicaciones conocidas son:

- Lentes de contacto suaves.
- Reparación y Regeneración de Tejidos.
- Biosensores.
- Apósitos para heridas.
- Sistemas de liberación de drogas.
- Súper absorbentes.
- Aplicaciones dentales.
- Sistemas transdérmicos.
- Implantes y otros.

2.2.5. Características de hidrogeles para apósitos de heridas

En general las características que se buscan en hidrogeles para apósitos de heridas suelen ser:

- El hidrogel debe formar una barrera contra la excesiva pérdida de fluido corporal.
- Permitir la difusión de Oxígeno hacia la herida.
- Ser suave y elástico pero mecánicamente lo suficiente fuerte.
- Poseer buena adhesión a la herida y a la piel sana, pero sin una tendencia de pegajosidad excesiva ya que debe permitir su remoción sin dolor o cambio del apósito sin perturbar el proceso de curación.
- Debe de ser transparente de modo que pueda ser monitoreado el proceso de curación, sin necesidad de remover el apósito.
- Debe permitir un fácil tratamiento de la herida con drogas (por difusión de la droga en solución desde la superficie exterior por inyección de la droga entre el apósito y la herida o al empapar el apósito en la droga en solución antes de colocarlo sobre la herida).
- Aliviar el dolor y proveer un ambiente óptimo de humedad constante para la curación de la herida.
- No provocar reacciones alérgicas.
- Ser estéril y fácil de usar.

2.2.6. Ventajas de la tecnología de la radiación comparada con los métodos convencionales

El uso de la radiación para la formación y modificación de hidrogeles para propósitos biomédicos tiene algunas ventajas generales como:

- Permite resolver el problema de esterilización ya que se puede obtener un producto completamente estéril.
- Permite obtener productos puros, no contaminados con residuos de iniciadores tóxicos.
- Es flexible, por ejemplo puede adaptarse a varias escalas y métodos (batch, continuo).

Debido a estas ventajas y las excelentes propiedades de los hidrogeles obtenidos por técnicas radiolíticas, es que se desarrollan diversas investigaciones en este campo.

2.3. Materiales Nanoestructurados

En los últimos años la nanociencia y nanotecnología se han convertido en uno de los más importantes desarrollos, donde confluyen la Física, la Química, la Biología y la Ingeniería. Mientras que la palabra nanotecnología es relativamente nueva, la existencia de dispositivos funcionales y estructuras de dimensiones nanométricas, no lo es. De hecho, estructuras de este tipo han existido en la Tierra desde que existe la vida. La concha del molusco *avalón*, muy común en el Caribe, que presenta una dureza excepcional, está compuesta por bloques nanoestructurados de carbonato cálcico pegados por una mezcla de carbohidratos y proteínas y es una demostración viva de que los materiales nanoestructurados son mecánicamente más resistentes. Los humanos hemos aprovechado los materiales nanoestructurados desde hace mucho tiempo. Los vidrieros romanos fabricaban vidrios con nanopartículas metálicas ya en el siglo IV antes de Cristo. La copa de Licurgo es un bello objeto de vidrio que se encuentra en el Museo Británico en Londres y contiene partículas de Au y Ag de unos 50 a 70 nm de diámetro distribuidas en el interior del vidrio. Estas nanopartículas hacen, como muestra la Figura 2.7, que la copa se vea verde cuando se ilumina con luz reflejada y roja con luz transmitida (por ejemplo, al situar una fuente de luz en su interior). Un uso similar de nanopartículas para modificar el color del vidrio fue ampliamente empleado posteriormente en las vidrieras de catedrales. Así mismo, el

uso común de la fotografía ha dependido de la producción de nanopartículas de Ag sensibles a la luz.



Figura 2.7. Color cambiante de la Copa de Licurgo (verde con luz reflejada y rojo con luz transmitida) y una de las nanopartículas de Au que contiene el vidrio del que está hecha.

Por tanto, la preparación y estudio de nanomateriales son importantes áreas de investigación, especialmente debido a sus propiedades físicas y químicas que dependen del tamaño de las partículas así como de su forma. Puesto que el tamaño de los nanomateriales es similar a la mayoría de las moléculas biológicas, los nanomateriales pueden ser útiles para aplicaciones e investigación biomédica in vivo o in Vitro. La integración de nanomateriales con la biología ha conducido al desarrollo de dispositivos de diagnóstico, agentes de contraste, herramientas analíticas, aplicaciones en terapia física, y vehículos para liberación de drogas.

2.3.1. Propiedades de las nanopartículas

A lo largo de los años se ha ido generando evidencias experimentales de que los materiales se pueden estructurar a escala nanoscópica de modo que éstos muestren nuevas propiedades. Estas evidencias empíricas se basan en que las propiedades ópticas, magnéticas, mecánicas, electrónicas o químicas de la materia tienen longitudes características asociadas y, si se produce un trozo de materia de dimensiones menores que estas longitudes características (al menos en una dimensión), las propiedades de este trozo de materia nanoestructurado son muy diferentes de las del mismo material en forma volumétrica. Por ejemplo, la conductividad eléctrica tiene asociada una longitud característica que se denomina "recorrido libre medio" y que representa la distancia promedio que un electrón recorre en el material antes de colisionar con impurezas o con los mismos átomos del material. Cuando un

trozo de metal tiene alguna dimensión comparable o menor que el correspondiente "recorrido libre medio", el transporte de electrones se convierte en balístico y no se cumple la conocida ley de Ohm. La necesidad de la ciencia básica a la nanoescala surge del hecho de que muchas de estas longitudes características se sitúan en el rango de unos pocos nanómetros y por tanto, las nuevas propiedades a la nanoescala no son escalables a partir de las leyes conocidas.

Otro hecho asociados al tamaño nanoscópico es que, cuando los electrones están confinados en una región pequeña del espacio, sus estados accesibles están cuantizados. Estos estados discretos son conocidos como Estados de Pozo Cuántico (Quantum Well States) y su espaciamiento en energía depende muy notablemente del tamaño de la zona espacial en que estén confinados. Como el estado fundamental de un sistema físico es función de la densidad electrónica y ésta cambia abruptamente cada vez que una nueva banda de Estados de Pozo Cuántico (QWS) cruza el nivel de Fermi, hay que suponer que hay una gran cantidad de propiedades que dependerán del tamaño: Estos son los llamados Efectos de Tamaño Cuántico. Los estados de Pozo Cuántico en películas metálicas de espesor nanométrico son responsables de un amplio rango de propiedades nuevas asociadas a las nanoestructuras. En particular, muchas propiedades oscilan con el tamaño con un periodo que es la mitad de la longitud de onda de Fermi (del orden del nanometro). Hay evidencia experimental de oscilaciones cuánticas con el espesor en muchas propiedades físicas de películas ultradelgadas, como la resistividad eléctrica [46], el acoplamiento magnético oscilatorio [47] y la magnetorresistencia gigante asociada, el coeficiente Hall [48], la función de trabajo [49] las distancias interplanares [50] o la temperatura de transición superconductor [51].

A continuación se ilustrará brevemente algunas de estas propiedades que dependen del tamaño, en particular la reactividad química y la estabilidad estructural de nanoestructuras.

a) Propiedades químicas de nanoestructuras: Un ejemplo paradigmático de propiedad que depende del tamaño es la reactividad química de nanopartículas de oro. Venimos usando oro para hacer joyas desde hace milenios ya que el oro es, obviamente, uno de los metales menos reactivos. Esto es cierto en tanto las partículas de oro son relativamente grandes. Cuando los cristallitos de Au tienen un tamaño del orden de 3-5 nm se convierten en extraordinariamente reactivos y son capaces de oxidar CO, incluso a temperaturas del orden de 200 K [52]. Este descubrimiento ha conducido ya a la comercialización de productos para eliminar el olor en los cuartos de

baño basados en nanopartículas de Au sobre un sustrato de Fe_2O_3 . Una evidencia experimental incuestionable sobre la diferencia en reactividad de partículas en función de su tamaño fue suministrada por Leuchtner y colaboradores al observar el espectro de masas de nanopartículas de Al que habían atravesado una región rica en oxígeno [53]. La altura relativa de los picos correspondientes a nanopartículas de Al_{13} y Al_{23} , menos reactivas, había aumentado substancialmente con respecto a la distribución inicial, mientras que los picos correspondientes a Al_{12} , Al_{14} y Al_{20} habían desaparecido del espectro, al ser estas partículas más reactivas. Una dependencia con el tamaño similar se ha encontrado para otros metales (p.ej. Fe) y otras reacciones [54].

¿Qué es lo que produce la inesperada reactividad química al disminuir el tamaño de una partícula de oro? ¿Qué hace que nanopartículas de Al con 12 átomos sean mucho más reactivas que aquellas que contienen 13? Hallar la respuesta a estas preguntas tiene importantes implicaciones para el diseño de catalizadores más eficientes y selectivos. Es bien sabido que la estructura electrónica de un objeto material depende de su tamaño y estructura cristalina. Puesto que la reactividad química depende crucialmente de la estructura electrónica, es natural suponer que la reactividad de una nanopartícula dependerá de su tamaño y estructura cristalina. Es, pues, importante determinar directamente la relación entre la estructura electrónica dependiente del tamaño y los posibles cambios en la reactividad química.

b) Estados de pozo cuántico y reactividad química: Cuando el espesor de una película metálica alcanza los nanómetros y si el sustrato es adecuado, las funciones de onda de los electrones se confinan en la dirección perpendicular al plano de la película y los estados electrónicos accesibles se discretizan. Estos Estados de Pozo Cuántico (QWS) se pueden observar experimentalmente mediante Microscopia de Efecto Túnel (STM) o Espectroscopia de Fotoemisión. La parte izquierda de la Figura 2.8 muestra espectros de la densidad de estados electrónicos medidos localmente sobre islas de Pb de diferente altura atómica crecidas a temperatura ambiente sobre la superficie de un monocristal de Cu. Los picos corresponden a los Estados de Pozo Cuántico. Nótese que la separación en energía entre los QWS se hace menor cuanto mayor es el espesor de la isla de Pb, de acuerdo con las predicciones de la mecánica cuántica para una partícula confinada en un pozo de potencial unidimensional de profundidad infinita y ancho creciente. Estos estados corresponden a la formación de ondas estacionarias en el pozo. Al cambiar el espesor de las islas los estados cruzan periódicamente el nivel de Fermi, por lo que la densidad de estados electrónicos al nivel de Fermi oscila con la misma periodicidad. La imagen STM del panel derecho de la Figura 2.8 muestra la morfología de estas islas de Pb

nucleadas, en su mayor parte, en las proximidades de los escalones monoatómicos del cristal de Cu.

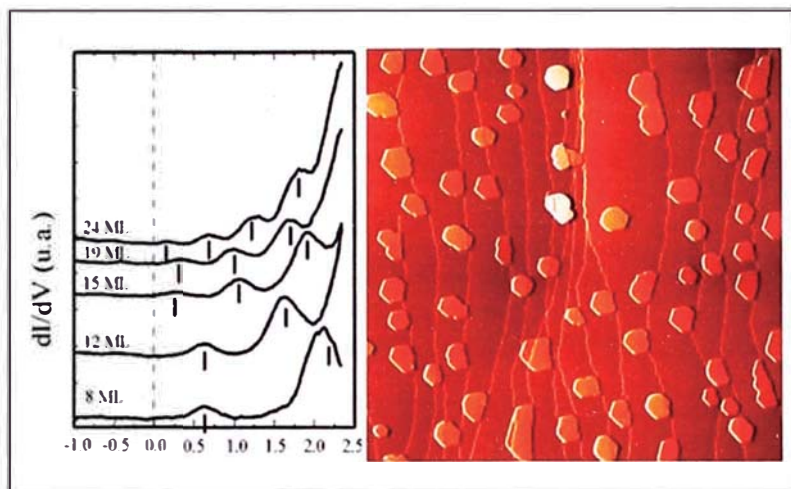


Figura 2.8. Espectros de la densidad de estados electrónicos medidos localmente sobre islas de Pb de diferente altura atómica crecidas a temperatura ambiente sobre la superficie de un monocristal de Cu. Los picos corresponden a los Estados de Pozo Cuántico (Izquierda). La imagen STM de la derecha muestra estas islas de Pb nucleadas, en su mayor parte, en las proximidades de los escalones monoatómicos del sustrato

La reactividad química depende de la densidad de estados al nivel de Fermi. Al crecer películas ultradelgadas de Cu sobre un cristal de Fe, aparecen Estados de Pozo Cuántico que hacen oscilar la densidad de estados al nivel de Fermi al cambiar el espesor. El panel izquierdo de la Figura 2.9 muestra los espectros de desorción térmica de CO adsorbido en películas de Cu de distinto espesor crecidas sobre un cristal de Fe [55]. La temperatura del máximo de desorción está relacionada con la energía de ligadura de la molécula adsorbida con la superficie. Nótese que esta temperatura oscila con el espesor de la película de Cu mostrando máximos para espesores de 5 y 10 monocapas. El panel derecho de la Figura 2.9 prueba que los máximos en la temperatura de desorción del CO están correlacionados con máximos en la densidad de estados al nivel de Fermi en la superficie producidos por los Estados de Pozo Cuántico. Por tanto la película es más reactiva cuando su densidad de estados electrónicos al nivel de Fermi es mayor. Resultados similares se han obtenido para la oxidación de películas de Mg de diferentes espesores [56]. Más arriba se ha descrito cómo agregados metálicos con un número determinado de átomos mostraban inusualmente alta o baja actividad química. Este efecto podría ser debido a una particularmente alta densidad de estados al nivel de Fermi para los nanoagregados más reactivos producida por el confinamiento de electrones en ellos.

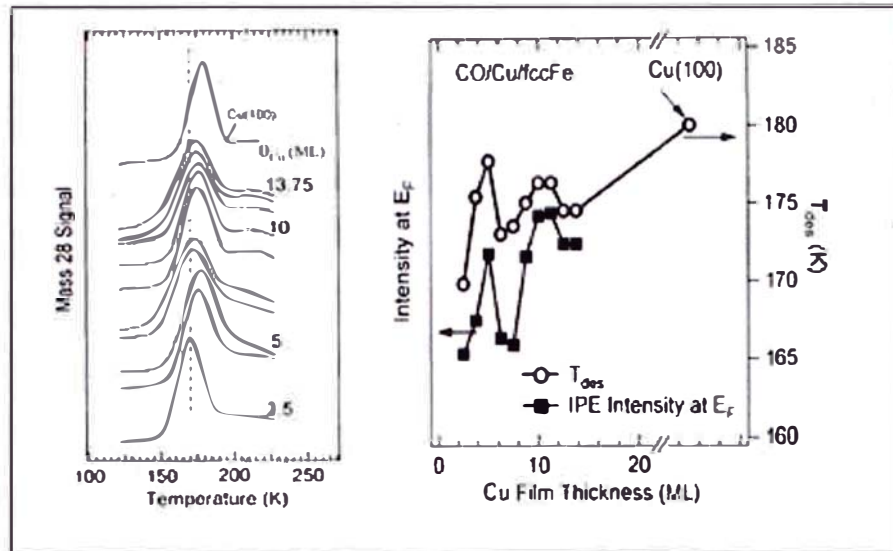


Figura 2.9. La parte izquierda de la figura muestra los espectros de desorción térmica de CO adsorbido en películas de Cu de distinto espesor crecidas sobre un cristal de Fe. La temperatura del máximo de desorción está relacionada con la energía de ligadura de la molécula adsorbida con la superficie. Nótese que esta temperatura oscila con el espesor de la película de Cu

c) Tamaños mágicos: Sabemos desde hace algún tiempo que muchos sistemas físicos (núcleos, agregados de gases nobles, etc) presentan números "mágicos", de modo que estos sistemas cuando contienen cierto número de partículas son especialmente estables. Un núcleo atómico, por ejemplo, es más estable si contiene un número mágico ($N= 2, 8, 20, 28$) de protones o neutrones. Las nanopartículas metálicas también presentan tamaños "mágicos" [57]. Por ejemplo en materiales que cristalizan en la estructura cúbica centrada en las caras (FCC), las partículas con $N= 1, 13, 55, 147, 309$, etc., en las que la estructura forma capas cerradas de mínimo volumen, son especialmente estables. Algunas de estas partículas, como Au_{55} , que tiene un diámetro de 1.4 nm, son especialmente reactivas y tienen una corta vida media, aunque pueden ser estabilizadas adsorbiendo ligandos en su superficie. Por otro lado como el confinamiento electrónico en las nanopartículas depende tan fuertemente del tamaño, puede ocurrir que el factor dominante para determinar la configuración de mínima energía sea la interacción de los electrones de valencia con el potencial promedio dentro del nanocristalito, lo que produce números mágicos "electrónicos" adicionales. Un modo de preparar partículas con un pequeño número de átomos es evaporando material de un disco metálico mediante un láser. Los átomos metálicos evaporados son arrastrados por un haz de He, cuyo enfriamiento produce la formación de los nanocristalitos. Cuando se examina con un espectrómetro de masa un haz de Pb se encuentra que los agregados con 7 y 10 átomos son mucho

más frecuentes que los demás, lo que quiere decir que son más estables [57]. En el caso del Na, estos números mágicos "electrónicos" son $N= 3, 9, 20, 36$ and 61 y corresponden a completar capas electrónicas, como si se tratara de "superátomos" [58]. En general los agregados pequeños están dominados por efectos electrónicos y los grandes, por efectos estructurales.

2.3.2. Estrategias para contener nanopartículas

Puesto que muchas de las nanopartículas son obtenidas en medios coloidales, se hace necesario buscar estrategias que permitan incorporar estas nanopartículas a sistemas que permitan su mejor manipulación y aprovechamiento. Ya que nuestro trabajo está enfocado en la utilización de matrices poliméricas, nos centraremos en la descripción de aquellas estrategias, en las que se hace uso de polímeros como matrices para contener nanopartículas.

En la actualidad, muchos estudios están enfocados en la síntesis de nanopartículas metálicas dentro de redes de hidrogeles hinchados, y los productos resultantes han conducido hacia nuevos sistemas compuestos o híbridos que tienen aplicaciones versátiles en bioingeniería y campos biomédicos. Los hidrogeles han sido también empleados para entrapar nanopartículas magnéticas. Para el caso de contener nanopartículas de plata, se han propuesto diversas series de materiales que pueden ser usados para contener dichas nanopartículas. Por ejemplo: Apósitos para heridas basados en quitosano conteniendo sulfadiazina-plata [59, 60], complejos y nanocompuestos dendrimero-plata [61] y fibras compuestas nanopartículas de plata/acetato de celulosa [62].

Algunas de las estrategias generalmente empleadas para contener las nanopartículas son [43]:

- 1) Polimerización del monómero en presencia de nanopartículas metálicas funcionalizadas con el iniciador.
- 2) Mezcla de soluciones coloidales de nanopartículas de plata con soluciones poliméricas acuosas, seguido por evaporación del solvente.
- 3) Formación de las nanopartículas dentro de un hidrogel hinchado.

2.3.3. Síntesis radiolítica de nanopartículas de plata

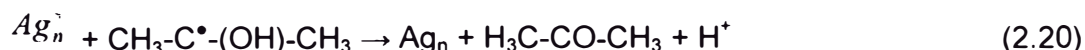
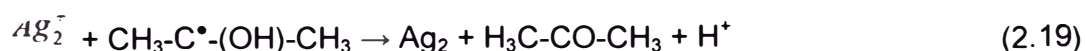
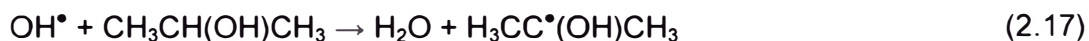
Se han reportado numerosas técnicas para la preparación de nanopartículas, tales como reducción química [15-17], fotoquímica [18,19], electroquímica [19,20], sonoquímica [22] y radiolítica [23-25]. De éstas, la síntesis radiolítica es la más promisoría debido a que posee algunas importantes ventajas comparado con los métodos químicos y fotoquímicos convencionales como son [25]:

- 1) El proceso es simple y limpio.
- 2) La irradiación con rayos gamma es segura e inofensiva.
- 3) La reducción controlada de iones metálicos puede llevarse a cabo sin usar excesivo agente reductor o generar productos de oxidación indeseados.
- 4) El método puede proporcionar nanopartículas metálicas completamente reducidas y de alta pureza y estabilidad.

En este método, soluciones acuosas desaireadas de sales metálicas son expuestas a la radiación gamma. El agua bajo irradiación reacciona de acuerdo a la ecuación (2.13), creando electrones solvatados, e^-_{aq} , los cuales reducen los iones metálicos, de acuerdo a las ecuaciones (2.14) y (2.15). Los átomos metálicos se unen formando partículas que coalescen para formar aglomerados como se muestra en la ecuación (2.16) [38].



Como las nanopartículas formadas por radiación gamma, o por otros métodos, tienden a coalescer y formar partículas grandes. Para evitar este fenómeno se agregan estabilizadores, generalmente estructuras poliméricas (PVA, PVP, PAA, etc), con grupos funcionales que coordinan ligeramente a la plata. Así mismo, se suele emplear un removedor de radicales OH^\bullet y H^\bullet . En tal sentido, el alcohol juega un rol importante ya que con la remoción de radicales se impide la oxidación de la plata Ag^0 . Alguno de los alcoholes usados para este fin son: metanol, etanol, isopropanol e isobutanol, pero el isopropanol es mayormente empleado debido a su eficiencia como removedor de radicales y acción reductora de acuerdo a las ecuaciones (2.17) a (2.20).



Es entonces de esta manera que en condiciones experimentales la reducción de los iones Ag^+ tiene lugar por la reacción con electrones hidratados y radicales isopropanol. Así mismo, se ha reportado que el tamaño de partícula, el rendimiento de la formación de estas, la forma, entre otras propiedades, suelen ser influenciadas por la dosis y tasa de dosis de irradiación además del tipo de polímero, la concentración de iones, etc [23, 24, 38].

2.3.4. Propiedades de las nanopartículas de plata en apósitos para heridas y otros

Las propiedades de las nanopartículas de plata, están siendo principalmente estudiadas en virtud de sus propiedades antibacterianas. De todos los nanomateriales con propiedades antibacterianas, las nanopartículas metálicas son las mejores debido a su actividad química. Este hecho toma mayor importancia si se considera el incremento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos. Esto ha promovido la investigación en la ya conocida actividad antibacteriana de los iones y compuestos basados en plata [27].

Algunos investigadores han probado el efecto bactericida de las nanopartículas de plata en diversos microorganismos, incluyendo bacterias como *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Vibrio colerae*. Cuando se ponen en contacto nanopartículas de plata en un cultivo de bacterias éstas prácticamente no se reproducen, y se observa que la plata inhibe en forma mucho más general estas bacterias, a diferencia de los antibióticos, que lo hacen de manera diferenciada [63]. Así mismo, los iones de plata exhiben actividad antibacteriana hacia un amplio espectro de bacterias y hongos encontrados en catéteres asociados con infecciones en el tracto urinario (CAUTI; urological catheters) [64]. Otras ventajas son su baja toxicidad a células de mamíferos [65] y en contraste con los antibióticos, la plata no provocaría fácilmente resistencia microbiana [66].

3. Descripción de técnicas experimentales

Los reactivos empleados fueron: polivinil pirrolidona, PVP, de 40 kDa (Loba Chemie), polivinil alcohol, PVA, de peso molecular 70-100 kDa con grado de hidrólisis 99% (Sigma-Aldrich), isopropanol (Fermont) y AgNO_3 (Movilab). Todos de grado analítico y usados sin ninguna purificación posterior. Todas las concentraciones citadas en % son p/v.

Para los trabajos de irradiación se utilizó el equipo Gammacell 220 Excel del Centro Nuclear del IPEN ubicado en Huarangal, que cuenta con una fuente gamma de ^{60}Co . Se utilizaron dosis desde 5 hasta 50 kGy, manteniendo constante la tasa de dosis en 8 kGy/h.

3.1. Obtención de Hidrogeles de PVA y PVA-PVP por radiación gamma

Se prepararon soluciones acuosas de PVA al 8% y PVP al 10 y 20%. Esto se hizo, disolviendo con agitación magnética la cantidad adecuada de cada polímero en agua destilada a 80 °C hasta observar la completa disolución del polímero (40 a 60 minutos aproximadamente). Las soluciones así obtenidas fueron posteriormente mezcladas en distintas proporciones (40:60, 50:50, 60:40 y 70:30 PVA:PVP), variando así la concentración total de cada polímero en la mezcla. Las diferentes mezclas poliméricas obtenidas, fueron contenidas en recipientes de poliestireno y burbujeadas con N_2 por aproximadamente 5 minutos a fin de eliminar el O_2 presente. El entrecruzamiento de los polímeros fue inducido por radiación con una fuente gamma de ^{60}Co .

A fin de determinar las condiciones óptimas para la obtención de los hidrogeles se realizaron distintas pruebas donde los parámetros que se evaluaron fueron: la concentración total de los polímeros en la mezcla y la dosis de irradiación

En una primera etapa, se prepararon soluciones acuosas de PVA al 8% y PVP al 20%. Estas soluciones fueron combinadas en proporciones de 40:60, 50:50 y 60:40 PVA:PVP, de modo que la concentración total de polímero en la mezcla estuvo entre 13 y 15%. Por otro lado, para evaluar el efecto de la dosis de irradiación en el entrecruzamiento de cada polímero, se prepararon e irradiaron individualmente las soluciones acuosas de PVA y PVP. En ambos casos la dosis de irradiación varió entre 10 y 30 kGy. Así mismo, para evaluar el efecto de la concentración de los polímeros en la gelificación del hidrogel se irradiaron, a 25 kGy, soluciones acuosas de PVA con

concentraciones que variaron entre 6 y 10% y soluciones de PVP con concentraciones entre 10 y 20%.

En una segunda etapa, se prepararon nuevas mezclas a partir de soluciones acuosas de PVA al 8% y PVP al 10 y 20% y las mezclas se hicieron en proporciones 50:50, 60:40 y 70:30 PVA:PVP con lo cual la concentración total de polímero en la mezcla estuvo entre 9 y 14%. La dosis de irradiación fue de 25 kGy.

El total de muestras evaluadas en ambas etapas fue de 25 muestras.

3.2. Síntesis radiolítica de nanopartículas de plata

Los coloides conteniendo nanopartículas de plata fueron obtenidos mediante la síntesis inducida por radiación gamma a partir de soluciones acuosas de AgNO_3 , en presencia de isopropanol como neutralizador de radicales y de polivinil pirrolidona (PVP) y alcohol polivinílico (PVA) como estabilizadores del coloide.

3.2.1. Síntesis de nanopartículas de plata utilizando PVP como estabilizador del coloide

Se prepararon soluciones acuosas de AgNO_3 en PVP y soluciones acuosas de AgNO_3 en PVP e Isopropanol. Para las mezclas binarias se utilizó una concentración de AgNO_3 de 2×10^{-2} M, mientras que las concentraciones del PVP fueron de 0,5; 0,8 y 1%. Para las mezclas ternarias se prepararon dos series de mezclas a fin de evaluar el efecto de la concentración del AgNO_3 y el efecto de la concentración del isopropanol en las mezclas. Para ambos casos se utilizó el PVP al 0,5%. Para el primer caso, las mezclas se prepararon utilizando concentraciones de isopropanol de 0.2 M y las concentraciones de AgNO_3 fueron de 2×10^{-2} y 2×10^{-4} M. Para el segundo caso, las concentraciones de isopropanol empleadas fueron de 0,2; 2; 4 y 6 M, mientras que la concentración de AgNO_3 fue de 2×10^{-2} M.

Las mezclas fueron contenidas en envases de plástico, burbujeadas con N_2 e irradiadas a 25 kGy con una tasa de dosis de aproximadamente 8 kGy/h.

Por otro lado, para evaluar el efecto de la dosis de irradiación en la formación de nanopartículas, del mismo modo que en los casos anteriores, se prepararon soluciones

acuosas de AgNO_3 (2×10^{-2} M), isopropanol (0,2 M) y PVP (al 0,8%) y se irradiaron a distintas dosis (5, 15 y 25 kGy.),

3.2.2. Síntesis de nanopartículas de plata utilizando PVA como estabilizador del coloide

Del mismo modo que para los coloides obtenidos utilizando PVP, se prepararon mezclas en soluciones acuosas de AgNO_3 -PVA y AgNO_3 -isopropanol -PVA.

Para las mezclas ternarias, se hicieron tres series de mezclas a fin de evaluar el efecto de cada componente en la formación de nanopartículas. Para la evaluación del efecto de la concentración del AgNO_3 se prepararon mezclas con PVA al 0,5%, isopropanol 0,2 M y AgNO_3 en 2×10^{-4} y 2×10^{-2} M. Para la evaluación del efecto de la concentración de isopropanol en la mezcla se prepararon soluciones acuosas donde la concentración de AgNO_3 fue de 2×10^{-2} M, la concentración de PVA fue de 0,5% y las concentraciones de isopropanol fueron de 0,2 y 4 M. Finalmente, para la evaluación del efecto de la concentración del PVA se prepararon mezclas con AgNO_3 2×10^{-2} M, isopropanol 0,2 M y PVA al 0,5; 0,8 y 1%. Las muestras fueron irradiadas en las mismas condiciones que para las muestras preparadas con PVP.

3.3. Preparación de los nanocompuestos Hidrogel/Ag

Se ha propuesto tres métodos para incorporar las nanopartículas de plata en la matriz de hidrogel. La matriz de hidrogel de PVA-PVP consistió de mezclas de PVA al 8% y PVP al 10% en proporciones 60:40. Así mismo se ha utilizado una matriz de PVA solo.

3.3.1. Método I: Obtención del nanocompuesto hidrogel/Ag in situ

En este método se obtiene el nanocompuesto hidrogel-nanopartículas de plata en un solo paso (una sola irradiación). Consiste en la mezcla de los precursores en solución acuosa, ésta se burbujea con N_2 e irradia a 25 kGy. Se ensayaron dos series de mezclas

En la primera serie, los polímeros en solución acuosa se mezclaron con isopropanol y luego se le agregó AgNO_3 en solución acuosa. Los polímeros en solución acuosa consistieron de mezclas PVA-PVP. Las concentraciones de isopropanol en la mezcla fueron 0; 0,2 y 2 M y las de AgNO_3 se variaron entre 2×10^{-4} a 2×10^{-2} M.

Para la segunda serie se prepararon las mismas mezclas pero en ausencia de alcohol. Además, se prepararon nanocompuestos empleando PVA como matriz.

3.3.2. Método II: Obtención del nanocompuesto por irradiación de hidrogeles conteniendo AgNO_3

Este método es de dos irradiaciones, una para formar el hidrogel de PVA-PVP (25 kGy), y otra para reducir la plata (15 kGy), incorporada al hidrogel por hinchamiento de AgNO_3 en solución acuosa.

Para ello, primero se dejaron secar los hidrogeles, hasta equilibrio, a temperatura ambiente. Las películas de PVA-PVP así obtenidas fueron sumergidas, a temperatura ambiente durante 24 horas, en soluciones acuosas de AgNO_3 . Posteriormente las películas impregnadas con la sal precursora fueron enjuagadas con agua destilada, para remover los excesos del precursor en la superficie de las películas, y finalmente fueron envasados en bolsitas de polietileno e irradiadas a 15 kGy para inducir la reducción de los iones de plata.

Al igual que en el primer método, se hizo una primera prueba en la que el hinchamiento de las películas de PVA-PVP se hizo en soluciones acuosas de AgNO_3 sin y con isopropanol. En una segunda prueba, se prepararon nuevas muestras hinchando las películas de PVA-PVP en soluciones acuosas de AgNO_3 sin alcohol. Las concentraciones de AgNO_3 se variaron entre 2×10^{-2} y 2×10^{-4} M y la concentración del isopropanol fue de 2 M.

3.3.3. Método III: Obtención del nanocompuesto por hinchamiento de hidrogeles en coloides de nanopartículas de plata

Este método es también de dos irradiaciones, una para formar el hidrogel de PVA-PVP (25 kGy), y otra para obtener los coloides de nanopartículas de plata, los cuales son incorporados por hinchamiento al hidrogel.

Al igual que en el Método II, los hidrogeles PVA-PVP se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente fueron introducidos en soluciones coloidales conteniendo nanopartículas de plata a temperatura ambiente durante 24 horas, a fin de permitir la incorporación de las nanopartículas de plata al hidrogel por hinchamiento. Finalmente, los hidrogeles se enjuagan con agua destilada para eliminar restos de coloide en la superficie del hidrogel.

3.4. Evaluación de propiedades de hidrogeles y coloides

3.4.1. Determinación del grado de hinchamiento o absorción de agua de hidrogeles

Los hidrogeles obtenidos fueron dejados secar hasta lograr un peso constante, aproximadamente 72 hrs a temperatura ambiente. Trozos de la película formada de peso determinado, m_s , fueron sumergidos en un vaso de agua destilada a temperatura ambiente y pesadas cada cierto tiempo, m_h . El grado de hinchamiento (GH) o absorción de agua se determinó según la siguiente fórmula:

$$GH(\%) = \frac{(m_h - m_s)}{m_s} \times 100 \quad (3.1)$$

El hinchamiento se continúa hasta alcanzar un peso constante del hidrogel.

3.4.2. Evaluación de la actividad antibacteriana de coloides e hidrogeles

Se evaluó la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positiva, *Staphylococcus aureus*, y Gram negativas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*

El método se fundamenta en la inhibición de crecimiento microbiano, mediante la difusión del principio activo en un medio de cultivo sólido, que se evidencia en la formación de un halo de inhibición. Las pruebas se realizaron siguiendo los estándares de la National Commitee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS).

Para la preparación del inóculo se cultivó los respectivos microorganismos sobre agar casoy en plano inclinado. Se inoculó de 3 a 5 colonias sobre caldo casoy, se homogenizó y se diluyó el cultivo hasta obtener una concentración de 10^8 UFC/ml.

Para la preparación de las placas de cultivo, se incubó las placas con Agar Muller Hinton por 24 horas. Sobre las placas, se sembró el inóculo de un microorganismo.

En estas placas, sembradas con el inóculo de los microorganismos, se colocaron las películas de hidrogeles o nanocompuestos hidrogel/Ag las cuales previamente fueron enjuagadas con agua destilada y esterilizada y luego cortadas en forma de círculos de diámetros aproximados entre 6 y 14 mm. Para el caso de los coloides se hizo pozos de 8 mm de diámetro, para colocar aproximadamente 100 μ L de los coloides, el cual se

dejo difundir por 5 minutos. Finalmente se dejó incubar a 37 °C por 24 horas. Luego de la incubación se procedió a realizar las lecturas correspondientes, midiendo con la ayuda de un vernier o una regla milimetrada el tamaño de los halos de inhibición.

Los materiales biológicos empleados fueron: Cultivos microbianos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Como control positivo se utilizó el antibiótico imipenem.

3.5. Técnicas de caracterización

3.5.1. Espectroscopia Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica utilizada desde hace mucho tiempo para el análisis estructural de moléculas orgánicas, permite en forma relativamente simple identificar la presencia de grupos funcionales en una molécula. La diferencia principal entre la espectroscopia con transformada de Fourier con la espectroscopia convencional es que todos los elementos de resolución de un espectro se miden de manera simultánea [67], aumentándose la relación señal-ruido, siendo una gran ventaja para la obtención de espectros rápidos y de alta sensibilidad.

Al igual que para otras técnicas espectroscópicas, se basa en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Utiliza la radiación del espectro electromagnético cuya longitud de onda (λ) está comprendida entre los 800 y los 400000 nm (0.8 y 400 μm) y su efecto sobre la materia orgánica es producir deformaciones de los enlaces de la sustancia. Debido a su gran amplitud se suele dividir en tres zonas (Infrarrojo cercano, medio y lejano). Siendo el Infrarrojo (IR) medio el normalmente utilizado experimentalmente en determinación estructural (2.5 - 16 μm). Debido a consideraciones de tipo histórico la unidad más usada en la espectroscopia infrarroja no es la longitud de onda (λ) sino el número de onda ($\tilde{\nu} = 1/\lambda \text{ cm}^{-1}$).

Los espectros infrarrojos se observan generalmente desde los 400 o 500 cm^{-1} a los 4.000 cm^{-1} rango en el cual se producen las transiciones vibracionales asociadas a la mayoría de los grupos funcionales presentes en moléculas orgánicas y algunas moléculas inorgánicas. Hay diferentes modos normales de vibración en las moléculas, las cuales llevan asociado un movimiento característico de los átomos, los principales son: las deformaciones de enlace, ángulos de valencia, ángulos diedros, deformaciones fuera del plano, etc.

Al igual que en todos los espectros de absorción, un espectro IR se representa gráficamente como la intensidad relativa de la luz transmitida (eje de las ordenadas) en función de la longitud de onda, expresada en cm^{-1} . Cada absorción observable en el espectro corresponde a una vibración determinada de algún enlace dentro de la molécula. A la hora de identificar los grupos funcionales con la espectroscopia IR vamos a considerar el espectro de IR dividido en varias zonas. De acuerdo con dicha división se podrán identificar diversos grupos funcionales, tal y como se indica en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Rangos de absorción en el espectro IR de algunos grupos funcionales.

GRUPO FUNCIONAL	NUMERO DE ONDA (cm^{-1})	GRUPO FUNCIONAL	NUMERO DE ONDA (cm^{-1})
OH (enlace de hidrógeno)	3100-3200	-C≡C-	2300-2100
OH (sin enlace de hidrógeno)	3600	-C≡N	~ 2250
Cetonas	1725-1700	-N=C=O	~ 2270
Aldehídos	1740-1720	-N=C=S	~ 2150
Aldehídos y cetonas α,β -insaturados	1715-1660	C=C=C	~ 1950
Ciclopentanonas	1750-1740	NH	3500-3300
Ciclobutanonas	1780-1760	C=N-	1690-1480
Ácidos carboxílicos	1725-1700	NO ₂	1650-1500 1400-1250
Esteres	1750-1735	S=O	1070-1010
Esteres α,β -insaturados	1750-1715	sulfonas	1350-1300 1150-1100
δ -Lactonas	1750-1735	Sulfonamidas y sulfonatos	1370-1300 1180-1140
γ -lactonas	1780-1760	C-F	1400-1000
Amidas	1690-1630	C-Cl	780-580
-COCl	1815-1785	C-Br	800-560
Anhidridos	1850-1740(2)	C-I	600-500
C=C	1540-1670	C=O	1840-1680
C-O-	1050-1120		

Para la caracterización química de hidrogeles y películas de PVA, PVA-PVP (con y sin irradiación) y para investigar posibles interacciones entre las nanopartículas de plata y la matriz de PVA-PVP en el nanocompuesto Hidrogel/Ag, se prepararon las películas con una pequeñísima cantidad de muestra a fin de obtener películas delgadas de

espesor finísimo que pudieran ser leídos por transmisión. Se utilizó el equipo NICOLET modelo Impact 410.

3.5.2. Espectroscopia Ultravioleta y visible (UV-Vis)

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV/Vis) es una espectroscopia de fotones. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. Se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y además, para determinar el contenido de una sustancia. Así mismo, se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados.

El principio de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta – visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda (λ) comprende entre 190 y 800 nm. La luz visible o UV es absorbida por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que no ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). Por aspectos prácticos, se utilizará la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C \tag{3.2}$$

Donde:

ϵ = coeficiente de absortividad molar mol/g.cm.

b = Camino óptico, expresada en cm.

C = Concentración de la especie absorbente g/mol.

Un espectro UV-Vis es esencialmente un gráfico de la absorbancia contra la longitud de onda en una gama de las regiones ultravioletas o visibles. Para una sustancia dada ocurre una longitud de onda en la cual la absorción es máxima; se llama lambda máxima, $\lambda_{\text{máx}}$.

Las fuentes de radiación usadas son generalmente una lámpara de hidrógeno o deuterio para las medidas en la región ultravioleta (UV) y una lámpara de tungsteno para las medidas en la región visible (Vis). El esquema de un espectrofotómetro convencional se muestra en la Figura 3.1.

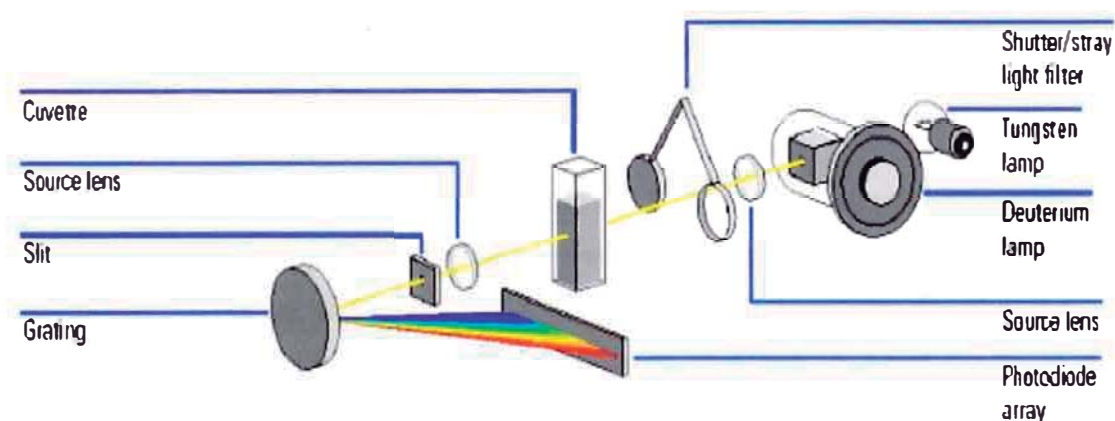


Figura. 3.1. Diagrama esquemático de un espectrofotómetro de UV/Vis

La espectroscopia UV-Vis es también una herramienta muy importante para la caracterización de sistemas nanoscópicos. En el presente trabajo los coloides y nanocompuestos de plata fueron caracterizados por espectroscopia UV-Vis ya que usualmente el tamaño nanométrico de los aglomerados metálicos presentan propiedades ópticas únicas con su absorción y dispersión específicas indicadas por la presencia de una banda de absorción intensa alrededor de 410 nm debida a la resonancia del plasmón superficial, los cuales son oscilaciones colectivas de los electrones de conducción en el metal. Por lo cual, para este caso son de especial interés las bandas de absorción del espectro UV-Vis generadas alrededor de esta longitud de onda. Así mismo, como las características del plasmón superficial dependen del tamaño y la forma de las nanopartículas así como de la constante

dieléctrica del medio, las bandas de absorción pueden proporcionar información acerca del tamaño, homogeneidad y formas de las nanopartículas estudiando la posición de los picos (corrimientos de las bandas hacia el rojo o el azul, estrechamientos o ensanchamientos de las bandas, etc.) [13, 23, 24, 25].

Los espectros ópticos fueron tomados con el espectrómetro UV-Vis Biochrom modelo Libra S22. Para su lectura, los coloides fueron diluidos en una proporción 1:40 con agua destilada. Mientras que los hidrogeles fueron leídos directamente ubicando la muestra sobre el haz.

3.5.3. Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es una técnica muy útil cuya aplicación fundamental es la identificación cualitativa de la composición mineralógica de una muestra cristalina.

Para los experimentos de difracción de rayos-X, éstos generalmente se producen bombardeando un blanco metálico, generalmente Mo o Cu con electrones que provienen de un filamento incandescente y son acelerados por un campo eléctrico muy fuerte 30-40 kV,

La longitud de onda de los rayos X (del orden de 1 Å o menor) es tan corta que pueden penetrar por entre los átomos de un sólido. Las disposiciones atómicas regulares de un cristal actúan entonces como una red de difracción de tal modo que los rayos emergentes forman ángulos definidos con el rayo incidente. A partir de éstos puede determinarse la estructura del cristal. Esta difracción se esquematiza en la Figura 3.2.

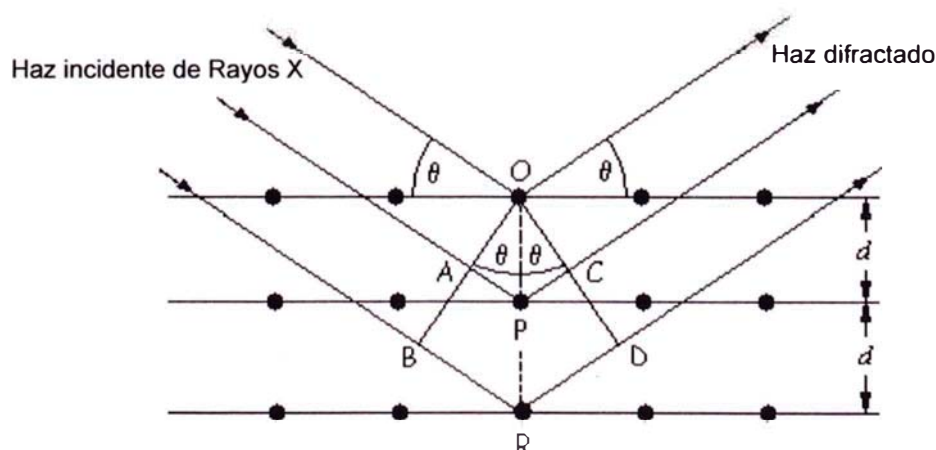


Figura 3.2. Reflexión de Bragg mediante planos reticulares d_{hkl} .

De este esquema se deduce la llamada ecuación de Bragg, ecuación (3.3), que es la ecuación fundamental de los métodos difractométricos que nos identifica cuando la

interferencia de las ondas difractadas es constructiva y por tanto origina un máximo de intensidad.

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \text{sen}\theta \quad (n=1,2,3,\dots) \quad (3.3)$$

Donde λ es la longitud de onda de la radiación incidente que es conocida en los experimentos normales de difracción de rayos-X, d_{hkl} es el valor de los espaciados reticulares que son las incógnitas a determinar y de los que se puede deducir los parámetros de la celda unidad; y $\text{sen}\theta$ es el seno del ángulo de difracción según la Figura 3.2. Una vez conocidos los valores (en Å) de los planos reticulares en un experimento de difracción se puede inferir la celda unidad.

Encontramos además que un cristal muy pequeño (menos de 0.1 μm) causa un ensanchamiento del rayo difractado. Esto permite determinar el tamaño promedio de grano, usando la ecuación de Debye y Scherrer, ecuación (3.4).

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (3.4)$$

Donde:

D: Tamaño promedio de grano

β : Ancho de la línea de difracción medida a la mitad de la intensidad máxima (radianes).

λ : Longitud de onda del rayo incidente,

θ : Ángulo entre el haz incidente y el plano del cristal.

El aparato requerido para investigaciones por difracción de rayos X se compone esencialmente de una fuente de rayos X monocromáticos, un sistema adecuado para el montaje de la muestra y una cámara para recibir y registrar los rayos difractados. El esquema de un aparato que mide difractogramas de polvo de rayos-X se da en la Figura 3.3.

El registro gráfico o difractograma consiste de picos distribuidos en función de los valores angulares, 2θ , y que corresponden a las de las reflexiones que representan. Las alturas de estos máximos y más concretamente sus áreas constituyen magnitudes muy representativas de las intensidades de las reflexiones correspondientes, las cuales pueden ser medidas con gran exactitud y reproducibilidad.

El difractograma de rayos-X es la huella digital del compuesto y se deben verificar tanto la posición de los picos como sus intensidades. Por esto, es una técnica muy poderosa para la identificación de compuestos e incluso de mezclas. Para ellos, se compara el difractograma con los almacenados en la base de datos PDF "Powder Diffraction File" donde hay más de 200.000 difractogramas diferentes.

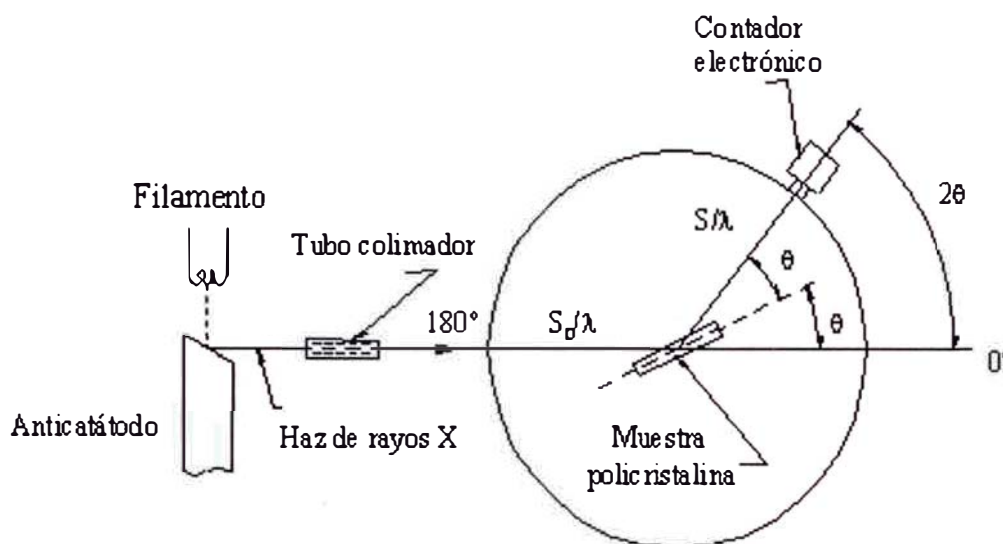


Figura 3.3. Esquema de un difractómetro de rayos X

En nuestro trabajo, se obtuvieron los patrones de difracción de rayos X de muestras de PVA y PVA-PVP con y sin irradiación. Las muestras fueron preparadas dejando secar las muestras a temperatura ambiente, para luego fijarlas sobre un sustrato de vidrio. Del mismo modo se prepararon las muestras hidrogel/Ag, para confirmar la presencia de nanopartículas de plata en los hidrogeles. El nanocompuesto fue obtenido siguiendo el procedimiento descrito en el método I.

La ecuación de Sherrer (ecuación 3.4), fue usada para calcular el tamaño promedio de grano. Donde k es igual a 0.9, la longitud de onda de los rayos X, λ , es igual a 1.541 Å y β y $\cos\theta$ fueron calculados a partir del difractograma correspondiente.

El equipo utilizado fue el difractómetro de rayos X Rigaku miniflex II operando con una fuente de radiación de $\text{CuK}\alpha$ (1,5405 Å), con un paso de $2\theta=0.002^\circ$ y un tiempo por paso de 10 segundos. Operando a temperatura ambiente. Los datos fueron colectados en un rango de 10 a $60^\circ 2\theta$.

3.5.4. Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

El Microscopio Electrónico de Transmisión es un instrumento que permite obtener una imagen aumentada de la muestra utilizando los electrones primarios que la atraviesan. Debido a la posibilidad de lograr grandes ampliaciones en las imágenes de la muestra, el microscopio electrónico de transmisión, es uno de los instrumentos más importantes de caracterización microestructural de los materiales sólidos. En él, un haz electrónico es generado termoiónicamente desde un cañón y es acelerado con energías alrededor de los 100 keV, el haz se colima y se concentra mediante lentes magnéticas (lentes condensadoras), haciéndolo pasar a través de la muestra. Los procesos dispersivos experimentados por los electrones durante su tránsito a través de la muestra determina la información del material. Las colisiones elásticas entre los electrones del haz con el campo potencial de los apantallamientos iónicos producen los patrones de difracción electrónicos, colisiones inelásticas entre los electrones del haz y la matriz de electrones y heterogeneidades, dan absorciones complejas y efectos dispersivos, produciendo variaciones espaciales en la intensidad del haz transmitido. Los electrones transmitidos y los electrones difractados se hacen pasar por un arreglo de lentes magnéticas, semejantes en principio a las de un microscopio de luz, tal como se ve en la Figura 3.4.

Existen dos modos de operación del microscopio electrónico de transmisión, que dependen de cómo son utilizados los planos focales de la lente objetiva luego de que los electrones pasen por la muestra.

Modo difracción, El plano focal de la lente objetiva actúa como el plano objeto de la lente difractora (intermedia en la Figura 3.4).

Modo Imagen. El plano imagen de la lente objetiva es el plano objeto de la lente intermedia.

La alta magnificación logrado en estos instrumentos es el resultado de que los electrones tengan una longitud de onda asociada pequeña, la misma que puede calcularse mediante la ecuación de Broglie, ecuación (3.5).

$$\lambda = \frac{h}{(2mqV)^{0.5}} \quad (3.5)$$

Donde m y q son la masa y la carga del electrón, h la constante de Planck y V es el potencial eléctrico usado para la aceleración de los electrones, por ejemplo para electrones acelerados con $V = 100$ kV (voltaje típico de operación) la longitud de onda asociada es de aproximadamente 0.04 Å la cual es mucho más pequeña que el diámetro de un átomo y adecuado para obtener un poder resolvente comparable con las distancias interatómicas. [68]

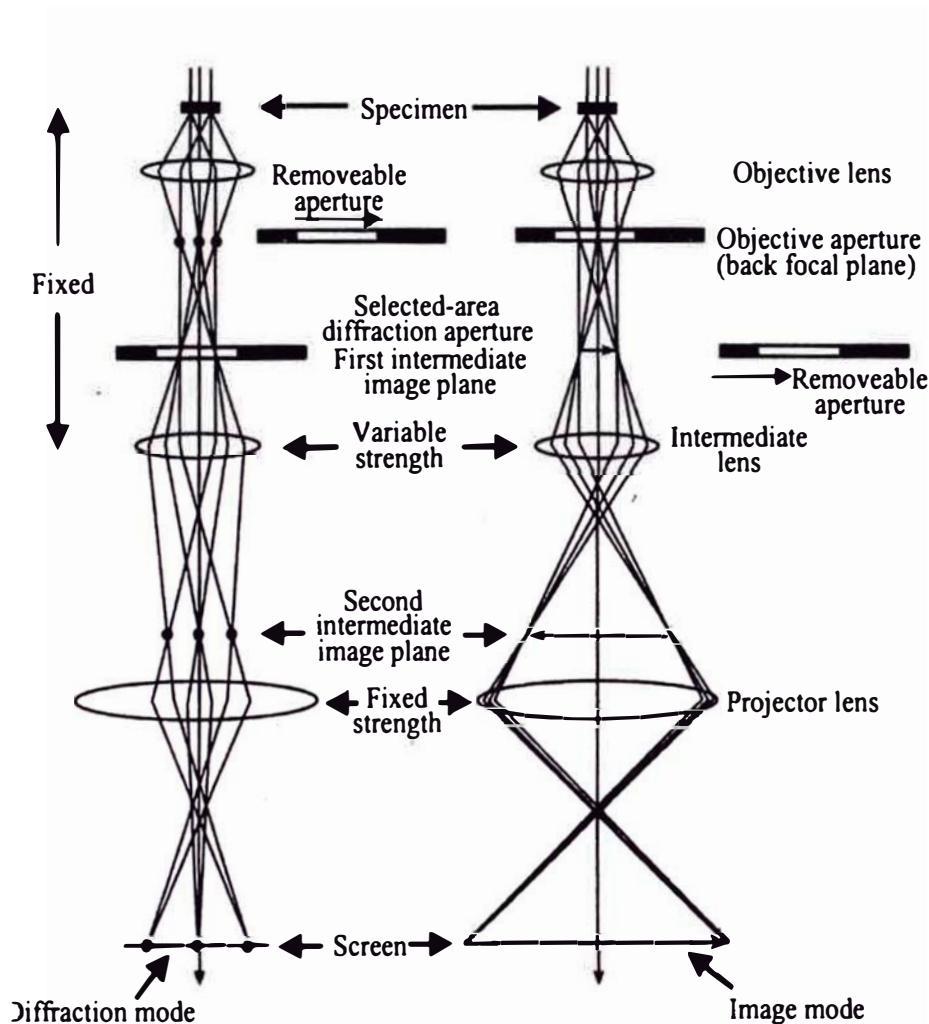


Figura 3.4. Representación esquemática de la óptica electrónica en las operaciones básicas de difracción e imagen del microscopio electrónico de transmisión.

Los tamaños, forma y fases de las nanopartículas fueron analizados usando un Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) Philips EM 400 operando a 80 kV en los modos de imagen y difracción de electrones. Para su análisis, los coloides fueron diluidos en agua destilada. Las distancias interplanares experimentales obtenidas fueron comparadas con la base de datos "JCPDF-internacional center for diffraction".

3.5.5. Microscopia de Fuerzas Atómicas (MFA).

El éxito de la MFA es debido a su capacidad para alcanzar resolución atómica y simultáneamente medir la topografía y otras propiedades de los materiales relacionados a las fuerzas. La MFA puede también ser usada en una enorme variedad de muestras las cuales no necesitan ser eléctricamente conductoras y además también puede usarse en diferentes ambientes como gas, vacío y líquidos.

El principio es muy simple. La imagen se obtiene a partir del registro de la deflexión de una punta metálica debido a la repulsión de la nube electrónica entre el átomo en la punta de la sonda y los átomos de la superficie en estudio. De esta manera, este método puede generar una imagen de la topografía de materiales no conductores y componentes biológicos (células, tejidos, proteínas, etc.) y brindar información acerca de la topografía, elasticidad, fricción, adhesión, densidad de cargas, estructura y heterogeneidad química superficial. La resolución a escala atómica puede lograrse en un medio líquido o gaseoso tanto como en vacío. Esto es muy importante para el análisis de sistemas biológicos en medios fisiológicos reproducibles y para el estudio de fenómenos de cristalización, disolución o corrosión de materiales en varios solventes en tiempo real. Las muestras no requieren de procesos previos de recubrimiento, teñido, etc. como en el caso de la microscopia electrónica de barrido (MEB) porque el contraste no depende del número atómico. Las imágenes por MFA no producen daño a las muestras por radiación tales como se observa en el caso de análisis MEB de polímeros, los cuales sufren entrecruzamiento o corte de cadenas. Además esta técnica permite manipular las superficies para crear estructuras moviendo átomo por átomo. La desventaja más importante es la baja velocidad de generación de la imagen (30 segundos a 1 hora).

Independientemente de la interacción entre la punta metálica y la muestra, un microscopio de fuerzas atómicas consta básicamente de cinco componentes esenciales (Figura 3.5):

- (1) Un sensor de fuerza el cual es básicamente una punta delgadísima (<10nm de radio) montada sobre una viga muy sensible.
- (2) Un sistema el cual está moviendo la muestra o el sensor para sondear la superficie de la muestra.
- (3) Un sensor el cual detecta la deflexión de la viga, por ejemplo un sistema láser de deflexión o un sistema piezoresistivo.

(4) Un sistema de retroalimentación el cual regula las fuerzas de interacción.

(5) Controladores electrónicos los cuales registran los movimientos, controlan los circuitos de retroalimentación y envían los datos de medidas al software de una computadora personal.

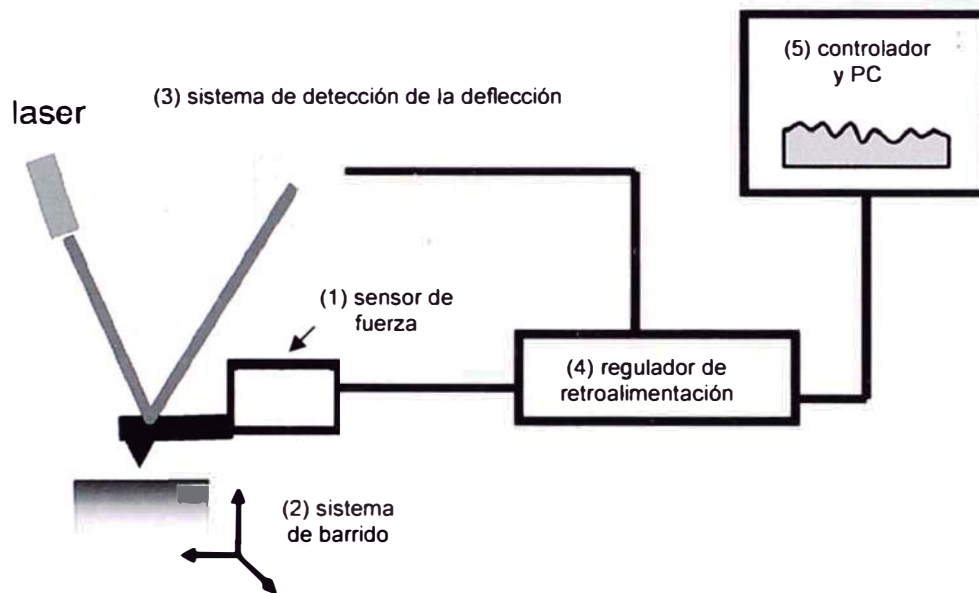


Figura 3.5. Esquema de un microscopio de fuerza atómica.

En la Figura 3.6 se muestra el detalle de la sonda empleada en MFA.

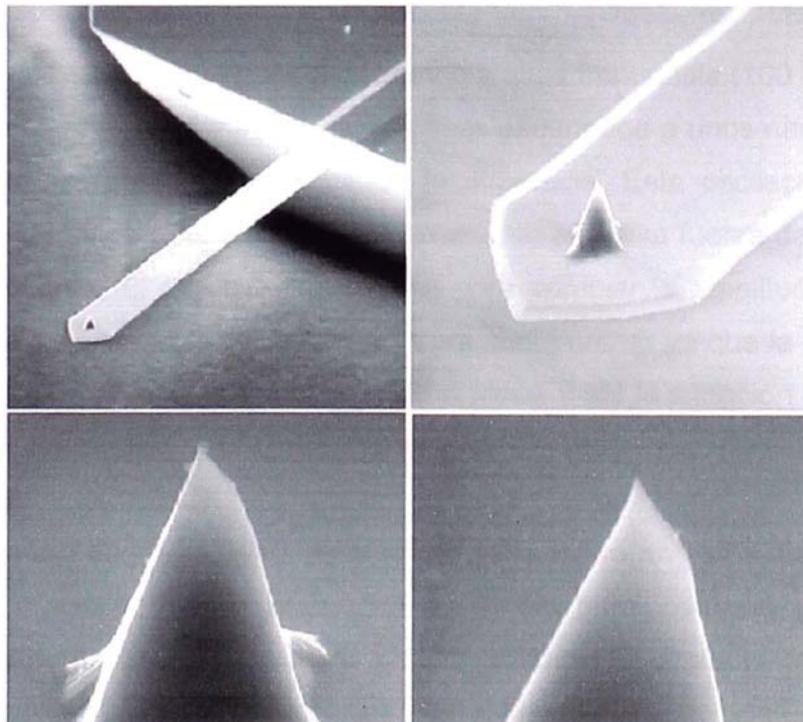


Figura 3.6. Punta y viga de una sonda MFA.

El microscopio de fuerzas atómicas puede operar en diferentes modos. Esto depende de la muestra y de la información que uno desea adquirir. La composición, geometría, química, elasticidad y topografía de la punta influenciará la medida en cada modo operacional. La magnitud de la fuerza depende de la geometría de la sonda, y es típicamente del orden de 100 nN, las cuales pueden producir daño en muestras blandas. Las fuerzas que se detectan tienen una sensibilidad del orden del piconewton ($1 \text{ pN} = 10^{-12} \text{ N}$). Los modos más comunes son: modo contacto, no contacto y modo dinámico.

El **modo contacto** es el modo más básico. La punta está siempre en contacto con la muestra mientras escanea la muestra. Por lo tanto la deflexión de la viga y así la fuerza de interacción es impuesta por el usuario (set point). El regulador de retroalimentación mantiene su "set point" moviendo el escáner en dirección vertical a la muestra. Este movimiento generado por la regulación es luego ploteada como topografía de la muestra. El mayor parámetro a establecer en este modo es la fuerza de interacción. Esta puede ser puesta para un mínimo valor, tal que la punta esté solo en contacto con la superficie. El inconveniente de este método es que la punta podría contaminarse o romperse fácilmente y que no pueda obtenerse correctamente la imagen de muestras húmedas, ya que la fricción puede generar una imagen distorsionada de la topografía y dañar la superficie de la muestra o afectar la estructura de las macromoléculas observadas

En el **modo no contacto**, la viga está oscilando a altas frecuencia (100 kHz-1 MHz) y a amplitud pequeña (<1 nm). La punta es entonces escaneada a unos nanómetros sobre la superficie e idealmente nunca tocando la superficie. Esta oscilación aumenta la sensibilidad de tal modo que aún la marginadamente atractiva fuerza de Van de Waals puede ser detectada. El regulador reacciona para cambiar la amplitud de oscilación, fase o frecuencia. Este modo es muy difícil para implementar ya que la medida es muy sensible a fuerzas atractivas de largo y corto alcance y así la situación de equilibrio es muy inestable y dependiente de corrientes de aire.

El **modo dinámico** es probablemente el modo más usado en estos días. Al igual que en el modo contacto la viga se encuentra oscilando, pero, con una amplitud mucho mayor. Aquí la punta toca la superficie periódicamente. El contacto con la superficie atenúa la amplitud de oscilación. La retroalimentación regula su atenuación comparándola con el "set point" deseado. Idealmente el amortiguamiento de la amplitud está relacionado a la fuerza de interacción muestra-punta la cual es por lo

tanto definida con el "set point". El "set point" de este modo está dado por el porcentaje de atenuación de la amplitud comparado con la amplitud sin atenuar. Por ejemplo, para un "set-point" de 100% no da interacción y para un "set point" de 60% significa que el 40% de la energía de vibración se perdió en la interacción entre la punta y la muestra. Como en el modo contacto, la meta es mantener la interacción tan pequeña como sea posible para evitar el daño o contaminación de la punta. En este caso esto significa que el "set point" necesita ser tan cercano a 100% como sea posible. La amplitud de oscilación es también un importante parámetro. Generalmente la amplitud de oscilación ha de estar en el orden de las características que han de ser observados. Por ejemplo, para medir rasgos grandes, se necesita amplitudes grandes y rasgos finos necesita pequeñas amplitudes. Para ello también es recomendable velocidades de barrido lentas. La resolución alcanzable en el modo dinámico es comparable con el modo contacto. Sin embargo, debido al hecho de que la punta está solo periódicamente en contacto con la muestra, la punta se daña menos.

El análisis morfológico superficial o topográfico de los nanocompuestos Hidrogel/Ag obtenidos en los distintos métodos, fue estudiado usando el equipo Nanosurf easyscan 2, a temperatura ambiente y atmósfera normal. La preparación de las muestras se hizo soportando uniformemente películas secas de los hidrogeles conteniendo nanopartículas de Ag, sobre un sustrato de vidrio.

4. Resultados y Discusión

4.1. Hidrogeles de PVA y PVA-PVP

La selección de los polímeros sintéticos PVA y PVP para desarrollar este trabajo, se hizo en base a experiencias reportadas en un trabajo anteriormente desarrollado [69] el cual nos sirvió como punto de partida. En éste se comprobó que, en general, un sólo polímero no proporciona al mismo tiempo buenas propiedades mecánicas y gran retención de agua. En tal sentido, la mezcla PVA y PVP resultó ser una buena matriz para formar hidrogeles por técnicas radiolíticas con buenas propiedades para ser utilizados como apósitos para heridas y además, como se verá mas adelante en el presente trabajo, esta sería también una buena matriz para incorporar nanopartículas.

En la Tabla 4.1 se presentan algunas observaciones cualitativas para la gelificación, adhesión a la piel y pegajosidad del primer grupo de muestras obtenidas.

Tabla 4.1. Observaciones cualitativas de los hidrogeles de PVA-PVP obtenidos a distintas dosis.

Dosis (kGy)	Proporción de la mezclas PVA:PVP*		
	40:60	50:50	60:40
10	No gelificó	No gelificó	No gelificó
20	Gelificación completa. Alta pegajosidad. Difícil desprender del recipiente	Gelificación completa Similar a 40:60	<i>Gelificación completa Desprende facilmente del recipiente</i>
30	Similar al de 20 kGy	<i>Gelificación completa Desprende facilmente del recipiente</i>	<i>Gelificación completa Desprende facilmente del recipiente</i>

* No gelificó hace referencia a que la muestra luego de irradiar sigue siendo completamente líquida, como era al inicio antes de su irradiación, a lo mucho se observa un aumento de viscosidad, dependiendo de la dosis. Mientras que la gelificación total que se describe hace referencia a la formación de un gel con ausencia de residuo líquido, puede o no dar un gel mecánicamente firme. La pegajosidad que se describe es respecto al recipiente, esta depende de la dosis y de las concentraciones totales de los polímeros en la mezcla, es también un indicativo de la gelificación y del comportamiento del polímero frente a la radiación.

De esta experiencia se observó que las mejores muestras (mostradas en cursiva en la Tabla 4.1) fueron las que se obtuvieron con dosis entre 20 y 30 kGy. Estas fueron geles bien constituidos, fácilmente manipulables y todos con ausencia significativa de burbujas (Figura 4.1).



Figura 4.1. Hidrogel PVA-PVP entrecruzado radiolíticamente.

En la Tabla 4.2 se muestran los resultados de las observaciones cualitativas de las muestras obtenidas al evaluar el efecto de la dosis en la gelificación de cada polímero y en la Tabla 4.3 se describen los resultados de las muestras obtenidas al evaluar el efecto de la concentración.

Tabla 4.2. Efecto de la dosis de irradiación en la gelificación de los polímeros.

Polímero	Dosis (kGy)		
	10	20	30
PVA al 8 %p/v	Gelificación completa. Pegajosidad máxima	Gelificación completa. Fácilmente desprende del recipiente	Gelificación completa Fácilmente desprende del recipiente
PVP al 20 %p/v	No hay gelificación	No hay gelificación	Gelificación completa Pegajosidad máxima

Tabla 4.3. Efecto de la concentración del polímero en la gelificación.

Dosis (kGy)	Polímero		
25	PVA		
	6%	8%	10%
	Gelificación completa Desprende fácilmente del recipiente	Similar al anterior	Similar al anterior
25	PVP		
	10%	15%	20%
	No hay gelificación	No hay gelificación	No hay gelificación

De estas experiencias se observó lo siguiente:

- Las mezclas de PVA-PVP gelifica a dosis mayores a 20 kGy, llegando algunas mezclas a formar geles firmes fácilmente manipulables.

- El PVP gelifica, sin llegar nunca a conformar un gel firme y fácil de manipular a 30 kGy, en dosis menores la gelificación es nula. Por su parte el PVA gelifica completamente desde 10 kGy resultando en geles firmes, fáciles de manipular a partir de 20 kGy.
- Finalmente, la gelificación parece ser dependiente principalmente de la dosis de irradiación antes que de la concentración del polímero.

La dificultad del PVP empleado en este trabajo, para formar hidrogeles podríamos atribuirlo a su bajo peso molecular (40 kDa) ya que, se tiene experiencias de obtención de hidrogeles de PVP incluso a bajas dosis (15 kGy) utilizando un PVP cuyo peso molecular fue de aproximadamente 30 veces mayor que el empleado en este trabajo. Así mismo, contrario a lo encontrado para el PVP de bajo peso molecular se vio que un PVP de alto peso molecular es recomendable trabajarlo a bajas dosis ya que por encima de una dosis óptima el hidrogel se torna frágil rompiéndose con facilidad, probablemente a causa de escisiones de cadena principal inducida por la dosis [69]. Para el PVP de bajo peso molecular sin embargo, parece requerirse de grandes dosis y aún así sólo se llega a obtener un gel difícil de manipular, debido probablemente a que el reducido tamaño de las cadenas poliméricas no permite un óptimo entrecruzamiento. Por otro lado, se ha visto que el PVA gelifica desde 10 kGy, pero a medida que se incrementa la dosis de irradiación el hidrogel se torna rígido. Sin embargo, cuando el PVP es irradiado en presencia del PVA, ambas deficiencias se compensan permitiendo la obtención de geles con buenas características.

En base a estas observaciones, se procedió a preparar un segundo grupo de muestras viendo por conveniente utilizar 25 kGy como dosis para la obtención de hidrogeles. Por un lado, como se dijo anteriormente, debido a los resultados observados; pero también, porque ésta es la dosis generalmente empleada en la esterilización de productos médicos ya que es suficiente para asegurar la esterilidad del producto [70]. Por lo tanto, esta dosis no sólo nos permitiría la obtención de hidrogeles de buenas características sino también garantizaría la obtención de un producto estéril. Así mismo, se vio conveniente trabajar con mezclas que tuvieran concentraciones totales de PVA iguales o mayores que las de PVP en la mezcla, debido a que este último no entrecruza fácilmente. Sin embargo, como lo demostraremos más adelante, el PVP es igualmente importante en la mezcla ya que, aportaría al hidrogel otras propiedades de las cuales carecería el PVA.

En este segundo grupo de muestras se obtuvieron geles firmes, fáciles de manipular y desprender del recipiente, transparentes y sin burbujas. La gelificación fue completa para todos los casos, ya que ninguna presentó residuos líquidos.

Al respecto de esta observación, es importante resaltar la etapa de eliminación del O_2 ya que como refieren algunos trabajos [37], el aire u O_2 presente durante la irradiación, reacciona con macro-radicales, los cuales pueden desencadenar algunas reacciones que conducen a la escisión de la cadena principal, inhibiendo así el entrecruzamiento. Aunque no se registró en la tablas, para comprobar tal efecto se hizo una prueba enviando una muestra sin aire y otra con aire, en esta última se observó que la gelificación disminuyó notablemente y que hubo gran cantidad de residuo líquido, sin embargo para las muestras que se trabajaron llenando completamente el envase, a fin de evitar el aire, no presentaron residuo líquido al gelificar. Por tanto, quedó comprobada la importancia de trabajar en ausencia de O_2 a fin de favorecer el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas antes que la escisión de la cadena principal.

A fin de culminar el proceso de selección para encontrar el hidrogel con óptimas propiedades en los hidrogeles obtenidos en el segundo grupo, se evaluaron las muestras en base a su capacidad de absorción de agua (determinación del grado de hinchamiento). Se debe señalar que, como se vio en las experiencias reportadas en las Tablas 4.2 y 4.3 no fue posible obtener hidrogeles de PVP solo, por lo que su evaluación se hará en función de la mezcla PVA-PVP.

4.1.1. Determinación del Grado de Hinchamiento

Puesto que nuestros hidrogeles están orientados a ser empleados como matrices para contener nanopartículas de plata a fin de potenciar la actividad antimicrobiana de los hidrogeles y que puedan ser aplicados con fines biomédicos, resulta importante evaluar el grado de hinchamiento o absorción de agua ya que este parámetro nos dará una idea de la capacidad de los hidrogeles para incorporar las sal acuosa precursora de las nanopartículas. Como se ha reportado en anteriores trabajos [69], el grado de hinchamiento, para determinados polímeros, depende principalmente del grado de entrecruzamiento y la composición del hidrogel, parámetros que se controlan con la dosis de irradiación y la concentración de los polímeros en la mezcla, respectivamente. Así mismo, es ya bien sabido que, el grado de entrecruzamiento disminuye al incrementarse la dosis de irradiación, esto se debe a que el entrecruzamiento a altas

dosis es mayor, reduciendo el espacio disponible para el agua. Como se describió anteriormente, en este segundo grupo de muestras todos los hidrogeles fueron obtenidos a 25 kGy. Por lo cual el grado de hinchamiento se evaluó en base a la concentración de los polímeros en la mezcla a fin de seleccionar un hidrogel que combinara sus buenas propiedades mecánicas (evaluación hecha cualitativamente) con un grado de hinchamiento razonable.

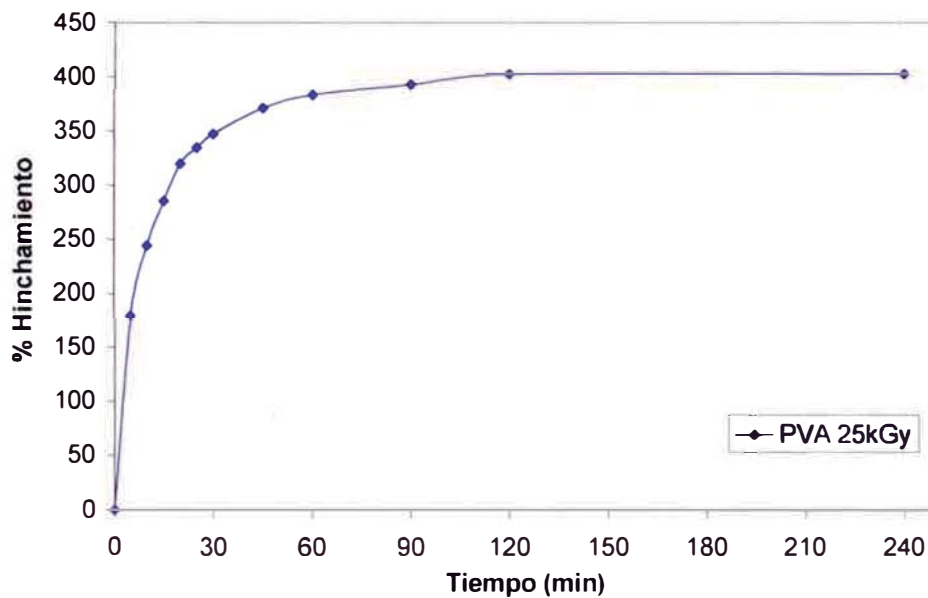


Figura 4.2. Curva de absorción de agua del hidrogel de PVA al 8% obtenido a 25 kGy.

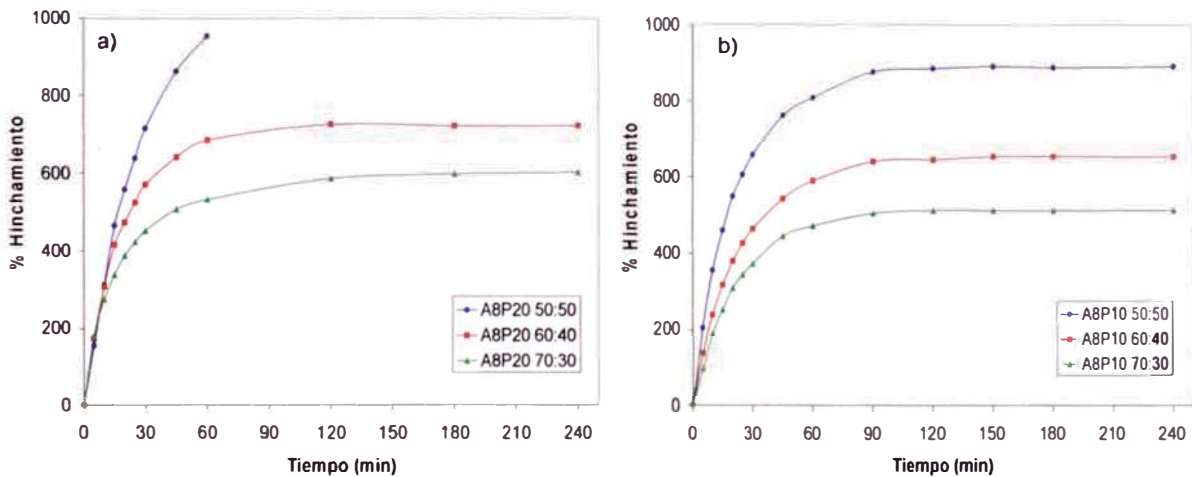


Figura 4.3. Curvas de absorción de agua de los hidrogeles obtenidos mezclando PVA al 8% con PVP al 20% (a) y PVA al 8% con PVP al 10% (b) en distintas proporciones.

En la Figura 4.2 está representada la curva de absorción de agua del hidrogel de PVA, donde se observa un grado de hinchamiento de aproximadamente 400%, el cual se alcanza luego de 2 horas.

Así mismo, en la Figura 4.3 se muestran las curvas de absorción de agua de los hidrogeles de PVA-PVP obtenidos a partir de las mezclas de PVA al 8% (A8) con PVP al 10 y 20% (P10 y P20, respectivamente) en distintas proporciones (50:50, 60:40 y 70:30). En ellas se puede apreciar una disminución del grado de hinchamiento a medida que se incrementa la concentración de PVA en la mezcla.

Para los hidrogeles obtenidos a partir de las mezclas de PVA al 8% y PVP al 20% se alcanzaron porcentajes de absorción de agua entre 1000 y 600% (Figura 4.3a) siendo la mezcla con mayor concentración de PVP la que alcanzó el máximo valor, pero también la que presentó propiedades mecánicas pobres (medidas cualitativas), ya que la película se tornó muy débil a medida que iba incorporando mas agua, hasta que al cumplir una hora en el ensayo se rompió, lo cual está representado en la Figura 4.3a con el corte de la curva a penas a la primera hora de ensayo. Esto se debería a que, como vimos anteriormente, el PVP no logra, incluso a altas dosis, un buen entrecruzamiento y este comportamiento se mantiene en esta mezcla ya que la concentración total de PVP en la mezcla es mayor que la del PVA, por lo tanto es de esperarse que predominen la características de entrecruzamiento del PVP.

Para las mezclas PVA al 8% y PVP al 10% se observaron menores porcentajes de absorción de agua con respecto a sus similares con concentración de PVP al 20%, observándose porcentajes entre 880 y 500% (Figura 4.3b). Pero los hidrogeles parecen tener mejores propiedades mecánicas ya que no se rompieron fácilmente durante su manipulación a largo de todo el ensayo. Esto podemos atribuirlo a que contrario a las muestras obtenidas con PVP al 20%, éstas muestras presentan, en su mayoría, concentraciones totales de PVA en la mezcla aproximadamente iguales o mayores que la del PVP, por lo tanto es de esperarse que se hagan notorias la características de entrecruzamiento del PVA.

Comparando las curvas de absorción de agua de los hidrogeles PVA-PVP con la del hidrogel de PVA vemos que, los hidrogeles obtenidos a partir de la mezcla PVA-PVP presentan mayores grados de hinchamiento que el obtenido a partir de PVA puro, con lo cual vemos que, en la mezcla, el PVA aporta al hidrogel estabilidad mecánica mientras que el PVP permite obtener un hidrogel con mayor grado de hinchamiento.

En base a estos resultados y teniendo en cuenta nuestra aplicación, se ha elegido un hidrogel que presentó un grado de hinchamiento medio y que a la vez permitió su fácil manipulación. Este fue aquel formado a partir de la mezcla de PVA al 8% y PVP al 10% en proporciones 60:40. El cual presentó un grado de hinchamiento alrededor de 600%.

4.1.2. Caracterización de películas de PVA y PVA-PVP por FTIR

Las interacciones específicas inter o intramoleculares juegan un papel muy importante en el comportamiento y propiedades de las macromoléculas. En el caso de las mezclas formadas por el PVA y el PVP en los que uno de los componentes contiene grupos donadores de protones (OH) y el otro aceptores (CO), se tienen modos espectrales correspondientes a estos grupos los cuales suelen verse notablemente afectados, tanto en su intensidad como en su posición, cuando forman parte de un enlace de hidrógeno, lo cual podría detectarse por medio de la espectroscopia infrarroja.

Por tanto, las bandas a las que les prestaremos mas atención serán las bandas del OH, presente en el PVA, y la del carbonilo, presente en el PVP. La banda de tensión de grupos O–H es una banda interesante en la detección de enlaces de hidrógeno, la localización de este modo espectral en forma no asociada suele encontrarse entorno a los 3630 cm^{-1} para grupos hidroxilo. El comportamiento de este modo espectral cuando forma parte de un enlace de hidrógeno es el de desplazarse hacia frecuencias más bajas, junto con un incremento de la intensidad y anchura de la banda. La banda de tensión de carbonilo, es un típico aceptor de protones para enlaces de hidrógeno. Su modo espectral de tensión es particularmente sensible a la formación de enlaces de hidrógeno, lo cual conduce a un debilitamiento del enlace C=O que produce un desplazamiento de la banda hacia frecuencias menores [71].

En la Figura 4.4 se muestran los espectros FTIR de las películas de PVA sin irradiar (Fig. 4.4.a) y PVA entrecruzado a 25 kGy (Fig. 4.4.b). Se resalta la banda de tensión del grupo OH alrededor de 3350 cm^{-1} , característico del PVA. Así mismo, en el espectro obtenido para el PVA a 25 kGy podemos observar, principalmente, la modificación en la intensidad de los picos alrededor de 1660 y 1580 cm^{-1} , correspondientes a la tensión del C=C probablemente de residuos de monómeros, esto se correspondería con resultados obtenidos en otros trabajos [69] que sugieren que, el proceso de entrecruzamiento va acompañado de la polimerización de lo que podrían ser residuos monoméricos y esto estaría representado por la reducción de la intensidad

del pico correspondiente. Para apreciar mejor los cambios en la intensidad se ha cuantificado las razones de las transmitancias de estos picos, resultando en 2 la razón de los picos en el espectro sin irradiar y en 1.5 la razón de los picos en el espectro irradiado.

En la Figura 4.5 se muestran los espectros FTIR de películas de PVA-PVP sin irradiar y PVA-PVA entrecruzado a 25 kGy. Se observan bandas de tensión correspondientes a cada polímero, la banda de tensión de los grupos OH característicos del PVA así como la banda de tensión del grupo carbonilo (CO), característico del PVP, la cual está ubicada alrededor de 1670 cm^{-1} . La diferencia más notoria entre la mezcla sin entrecruzar y la entrecruzada es la presencia de un pequeñísimo pico alrededor de 1500 cm^{-1} , probablemente resultado de interacciones entre el PVA y el PVP producto de la irradiación. Así mismo, se puede apreciar un ensanchamiento de la banda ubicada entre 3250 y 3500 cm^{-1} correspondiente a las tensiones del grupo OH y las tensiones del grupo carbonilo, este ensanchamiento podría deberse a la formación de puentes de hidrógeno entre el PVA y el PVP, sin embargo, diferencias en el espesor de las películas empleadas podrían haber también influido, aunque podemos asegurar que esta contribución al ensanchamiento de las bandas es mínimo ya que para ambas muestras, con y sin irradiación, las intensidades de los picos no son muy diferentes. Así mismo, la otra banda de tensión del grupo carbonilo ubicada alrededor de 1670 cm^{-1} por su intensidad, solapa algunos picos correspondientes al PVA.

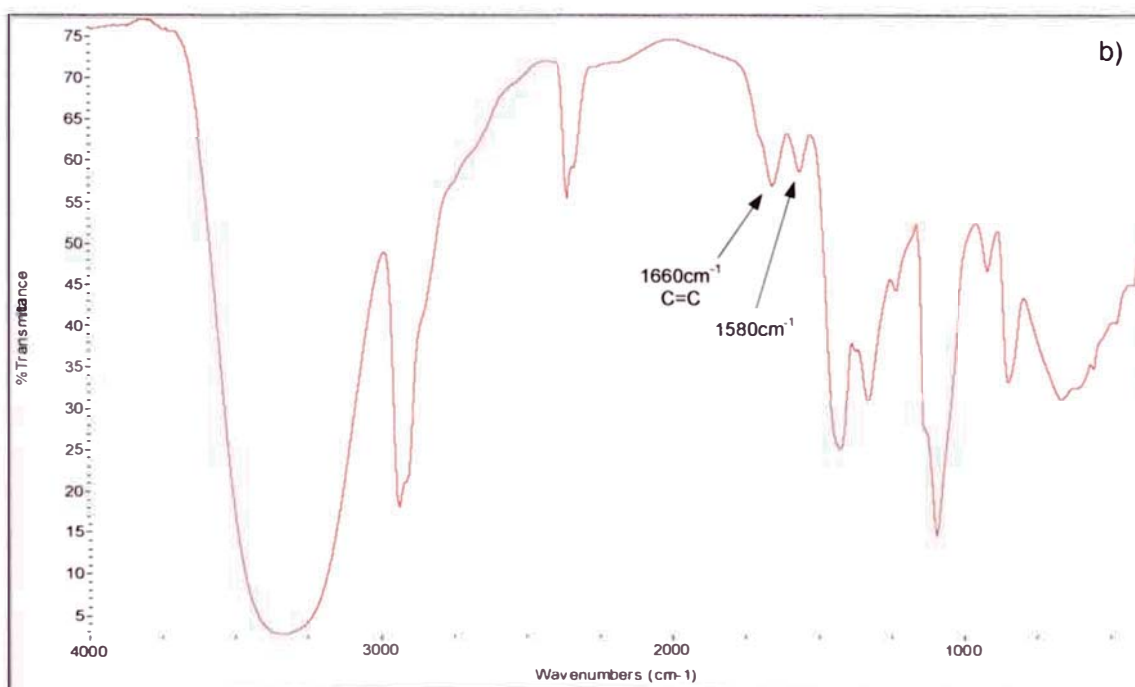
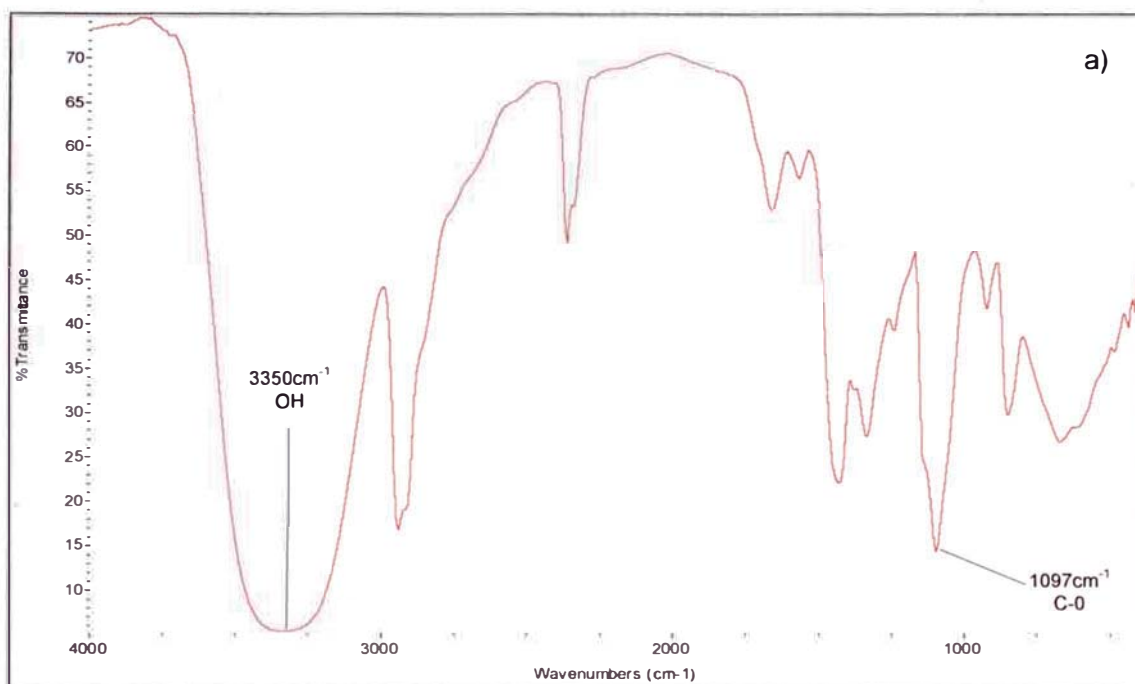


Figura 4.4. Espectros por FTIR de PVA sin irradiar (a) y PVA irradiado a 25 kGy (b)

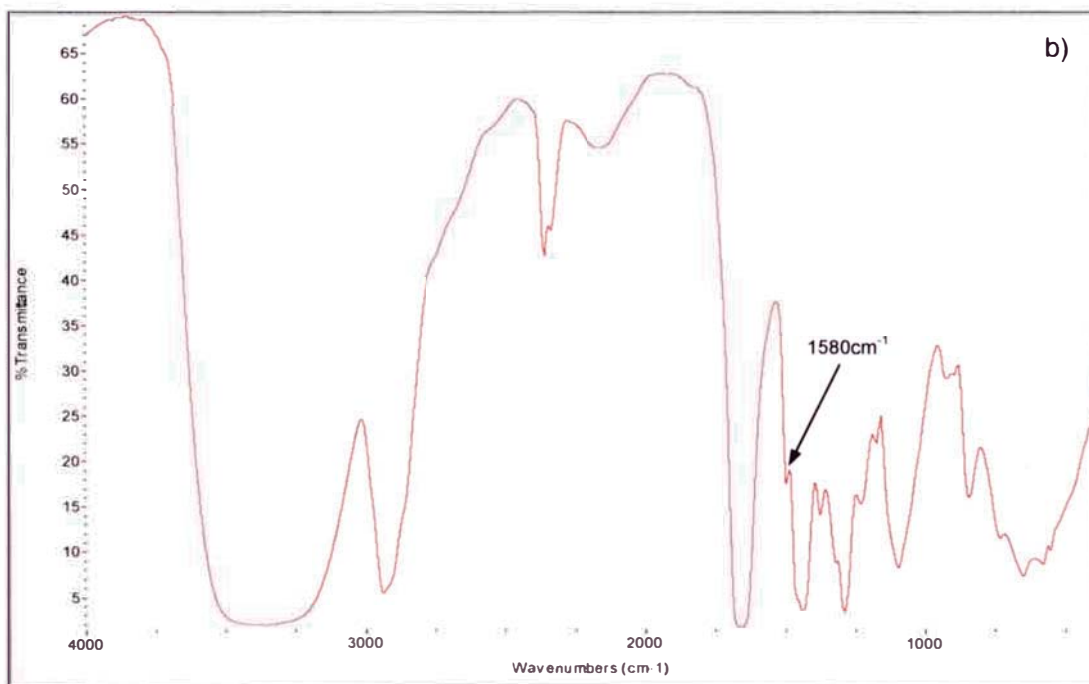
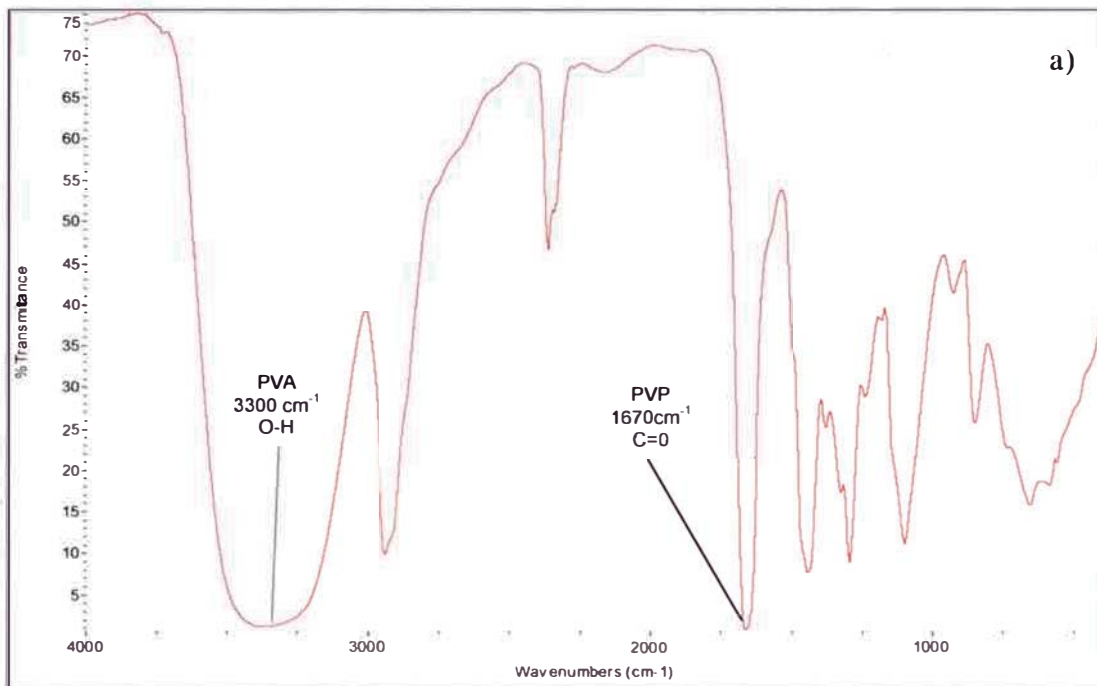


Figura 4.5. Espectros FTIR de PVA-PVP sin irradiar (a) y PVA-PVP irradiado a 25 kGy (b)

4.1.3. Caracterización de películas de PVA y PVA-PVP por espectroscopia UV-Visible

En la Figura 4.6 se observan los espectros obtenidos por espectroscopia UV-Vis de los hidrogel de PVA y PVA-PVP. Se aprecian picos de absorción correspondientes al polímero en 200 nm para el PVA y en 228 nm para el hidrogel PVA-PVP. Debe señalarse que los espectro obtenido para los hidrogel luego de secarlos para formar una película es el mismo que los aquí presentados para los hidrogel frescos.

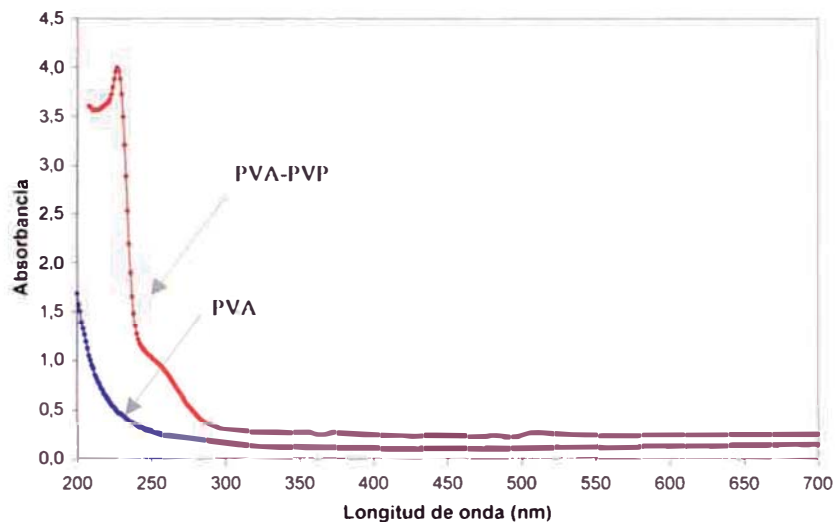


Figura 4.6. Espectros UV-vis de los hidrogel de PVA y PVA-PVP.

4.1.4. Caracterización de películas de PVA y PVA-PVP por DRX

En la Figura 4.7 se muestran los patrones de difracción obtenidos por DRX para las películas de PVA sin irradiar e irradiada. Como puede observarse, el PVA presenta un pico estrecho e intenso aproximadamente en 19° , lo cual representaría la porción cristalina de este polímero. Así también se observa un pico débil en 41° .

Del mismo modo en la Figura 4.8 se observan los patrones de difracción correspondientes a las películas de PVA y PVP. Pueden observarse los picos a 19° y 41° originados por el PVA, pero a diferencia del PVA puro, en la mezcla PVA-PVP se observan los picos mucho más ensanchados. El ensanchamiento de la señal podríamos atribuirlo a una disminución de la cristalinidad de las cadenas de PVA al incorporar el PVP el cual contribuiría a la formación de regiones amorfas en la blenda PVA-PVP. En ambos casos no se aprecian diferencias significativas por efecto de la irradiación.

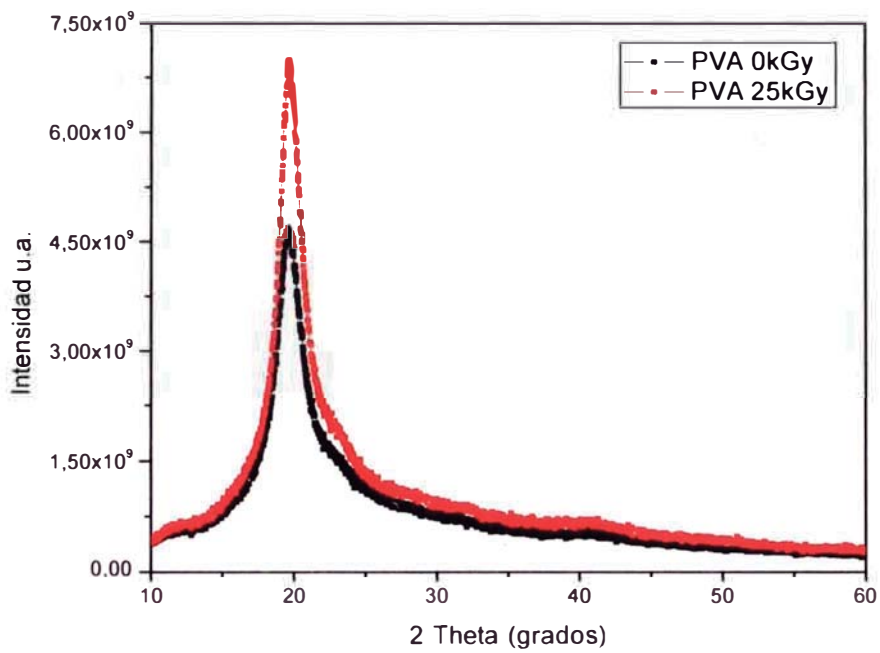


Figura 4.7. Patrón de difracción de películas de PVA sin irradiar (0 kGy) e irradiado (25 kGy).

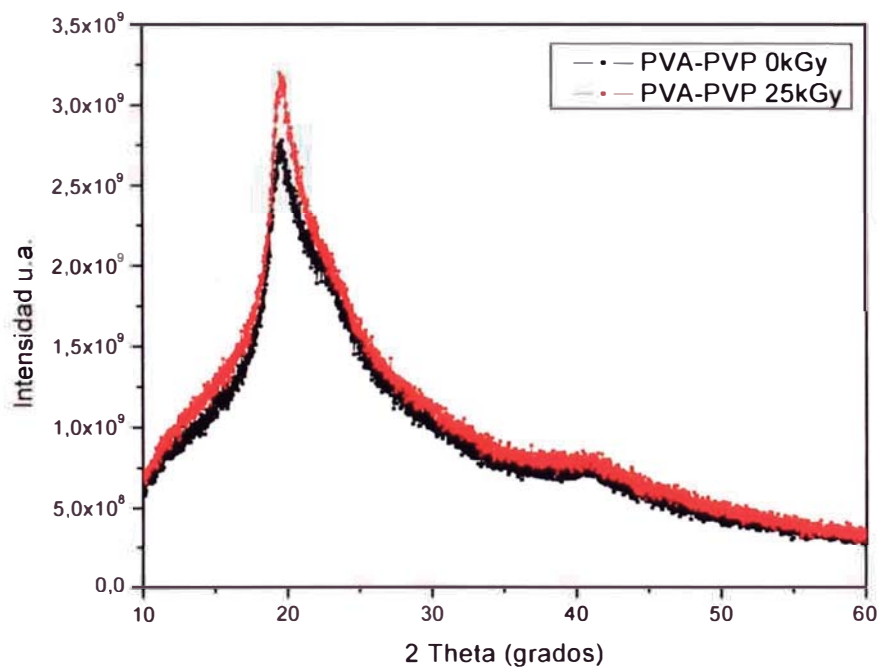


Figura 4.8. Patrón de difracción de películas de PVA-PVP sin irradiar (0 kGy) e irradiado (25 kGy).

4.2. Nanopartículas de plata empleando PVP como estabilizador del coloide

4.2.1. Coloides obtenidos a partir de mezclas AgNO₃-PVP

Se prepararon soluciones acuosas de AgNO₃-PVP y AgNO₃-PVP-isopropanol. El PVP es un polímero lineal y estabiliza la nanopartículas de plata vía formación de enlaces con el anillo de pirrolidona. Estudios por espectroscopia de fotoelectrón por Rayos X (XPS) e infrarrojo (IR) han revelado que los átomos de oxígeno y nitrógeno del anillo de pirrolidona pueden promover la absorción de las cadenas de PVP sobre la superficie de la plata [14, 72, 73].

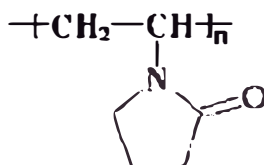


Figura 4.9. Estructura química del PVP.

Se utilizó AgNO₃ 2×10^{-2} M y PVP en diferentes concentraciones (0,5; 0,8 y 1%). Luego de su irradiación se obtuvieron soluciones coloidales de color anaranjado amarillento, excepto para el caso de la muestra con PVP al 0,8% que presentó una tonalidad mas oscura (Figura 4.10). Los espectros UV-Visible de estos coloides, presentan sus máximos de la banda de absorción del plasmón superficial en 414 nm. Observándose un pico más ancho y con un ligero corrimiento de λ_{max} a 420 nm para la solución coloidal obtenida con PVP al 0,8%, Figura 4.11. Así mismo, teniendo en cuenta que los coloides fueron diluidos a igual concentración y a partir de las intensidades de los picos, que esta relacionado con la concentración de las nanopartículas de plata, podemos observar que el rendimiento en la formación de las nanopartículas es mayor a medida que se incrementa la concentración de polímero en la mezcla.

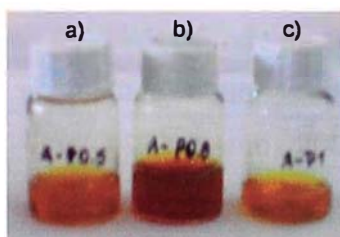


Figura 4.10. Coloides obtenidos a partir de las mezclas de AgNO₃ 2×10^{-2} M y PVP al 0,5 (a), 0,8 (b) y 1% (c).

En las imágenes MET de los coloides obtenidos a partir de las mezclas con PVP al 0,5 y 1% se observaron nanopartículas mayoritariamente esféricas de tamaños entre 10 y 50 nm. Por otro lado, el análisis por difracción de electrones revela la presencia de Ag acompañada de algunos óxidos. Mientras que, en las imágenes obtenidas para el coloide con PVP al 0,8% se observaron nanopartículas de formas hexagonales y poliedras que se formarían al juntarse algunas nanopartículas [18,25], Figura 4.12.

Por lo tanto, la forma y tamaño de las nanopartículas estarían estrechamente relacionados con el corrimiento de las longitudes de onda para absorbancia máxima observados en la Figura 4.11, así como también de la coloración del coloide.

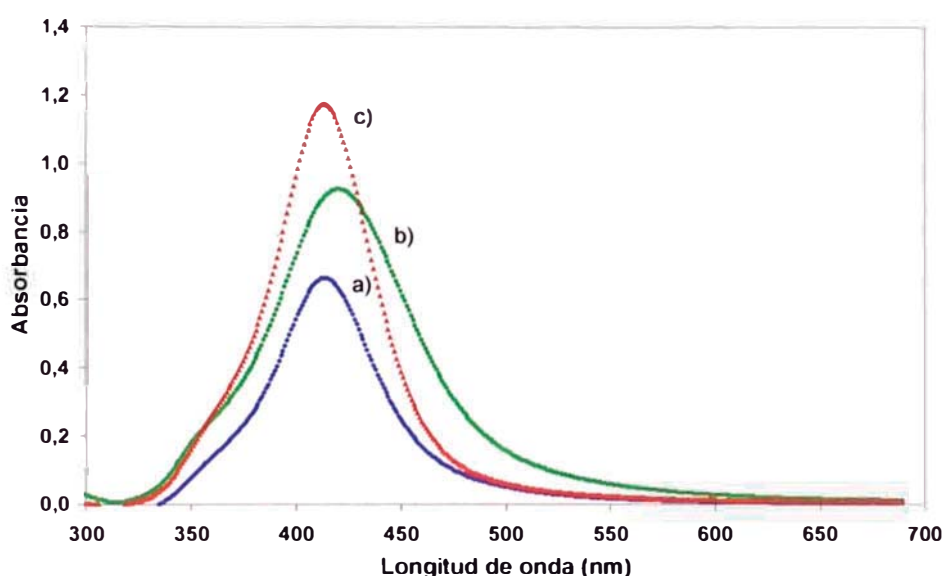


Figura 4.11. Espectros UV-Visible de los coloides obtenidos a partir de las mezclas de AgNO_3 $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ y PVP al 0,5 (a), 0,8 (b) y 1% (c).

En contraste, se ha observado que la irradiación de las soluciones acuosas de AgNO_3 en ausencia de polímero estabilizador del coloide no produce nanopartículas de plata, observándose por MET, formaciones tipos dendritas probablemente correspondientes a la cristalización del AgNO_3 , además de estructuras más o menos esféricas que podrían ser algunos óxidos de plata, como lo revelan las distancias interplanares obtenidas a partir de los patrones de difracción de electrones correspondientes. (Anexo I). Por otro lado, al irradiar soluciones acuosas de AgNO_3 con isopropanol se observaron aglomerados de aproximadamente 200 nm unidos por otros más pequeños, los cuales corresponderían a la coalescencia de partículas. Estos aglomerados, de acuerdo a los patrones de difracción de electrones también corresponderían a óxidos de plata principalmente (Anexo II).

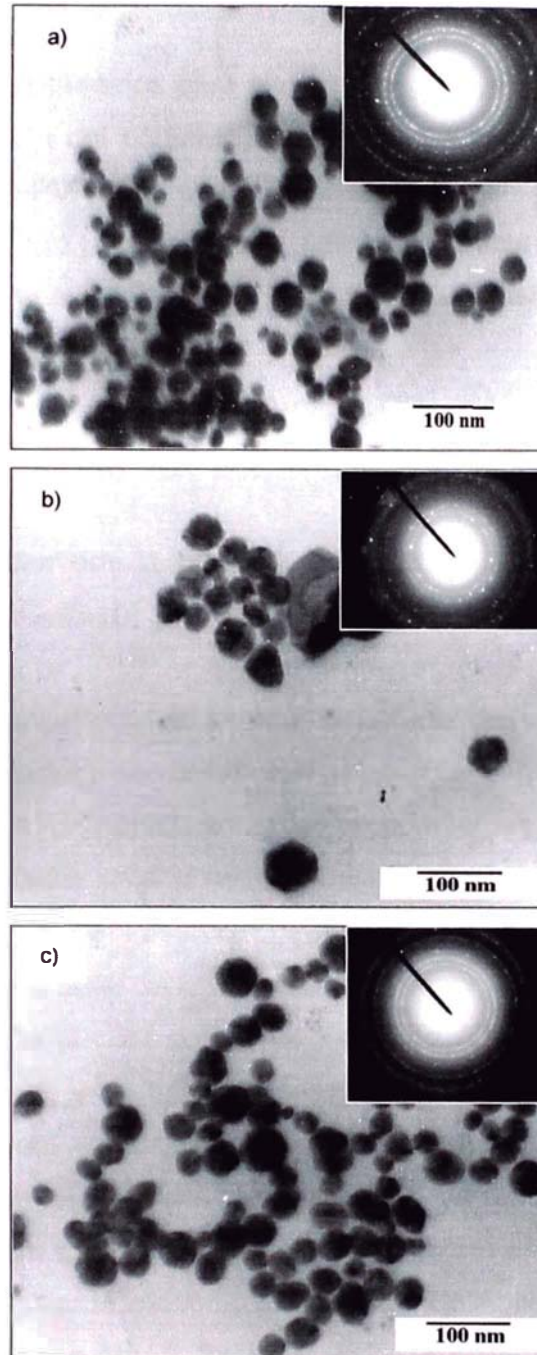


Figura 4.12. Imágenes MET de las nanopartículas obtenidas a partir de las mezclas AgNO_3 $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ y PVP al 0,5 (a), 0,8 (b) y 1% (c)

4.2.2. Coloides obtenidos a partir de mezclas AgNO₃-PVP-isopropanol

En base a los resultados obtenidos para la mezcla AgNO₃-PVP en la que se evaluó el efecto de la concentración del polímero, se decidió utilizar el PVP al 0,5% para las experiencias con AgNO₃-PVP-isopropanol.

A fin de evaluar el efecto de la concentración de la sal precursora y del removedor de radicales en la mezcla ternaria, se irradiaron soluciones acuosas variando la concentración de estos dos componentes.

a) Efecto de la concentración de AgNO₃

Los coloides fueron obtenidos a partir de soluciones acuosas de PVP al 0,5%, isopropanol 0,2 M y AgNO₃ 2×10^{-4} y 2×10^{-2} M.

En la Figura 4.13 se observan los espectros UV-Vis de estos coloides donde se aprecia que ambos coloides, obtenidos con diferentes concentraciones de AgNO₃, presentan sus máximos de absorbanza correspondientes a las resonancias del plasmón superficial alrededor de 412 nm. Así mismo, podemos observar, en base a la intensidad de las bandas de absorción, que el rendimiento en la producción de partículas es pobre para el caso de la muestra con menor concentración de AgNO₃, en contraste con lo obtenido al usar concentraciones de AgNO₃ de 2×10^{-2} M donde se tiene una banda de absorbanza bastante intensa. Las imágenes obtenidas por MET, (Figura 4.14) muestra, para ambos casos, partículas de formas más o menos esféricas y con una amplia distribución de tamaños que van desde los 20 nm hasta aproximadamente 100 nm aunque la distribución se centra alrededor de 25 nm para la muestra obtenida al emplear la menor concentración de AgNO₃ y alrededor de 50 nm para la muestra obtenida con AgNO₃ 2×10^{-2} M.

Por lo tanto, teniendo en cuenta el efecto de la concentración de AgNO₃ en el rendimiento en la producción de las nanopartículas, para las siguientes experiencias en las cuales se evaluará el efecto del isopropanol en la mezcla, se decidió emplear AgNO₃ de 2×10^{-2} M.

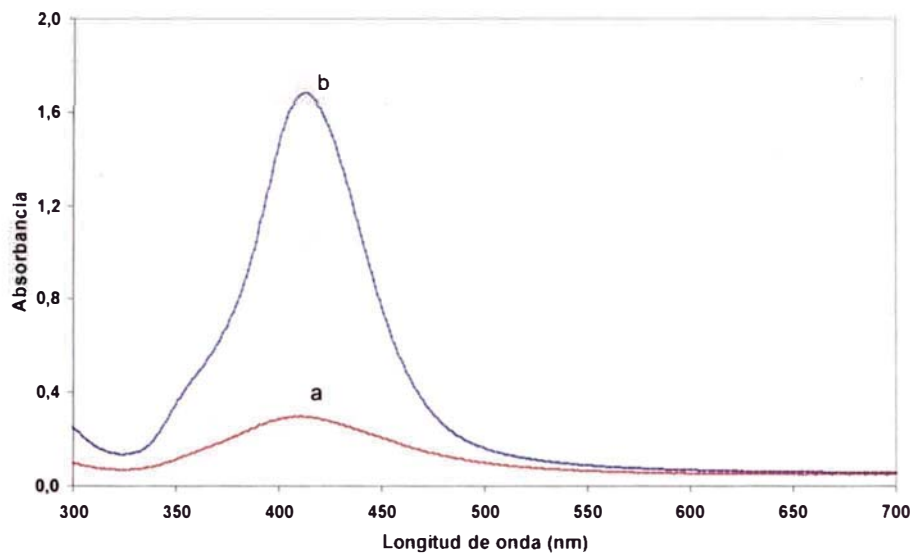


Figura 4.13. Espectros UV-Visible de los coloides obtenidos a partir de las mezclas PVP 0,5%, isopropanol 0,2 M y AgNO_3 2×10^{-4} (a) y 2×10^{-2} M (b).

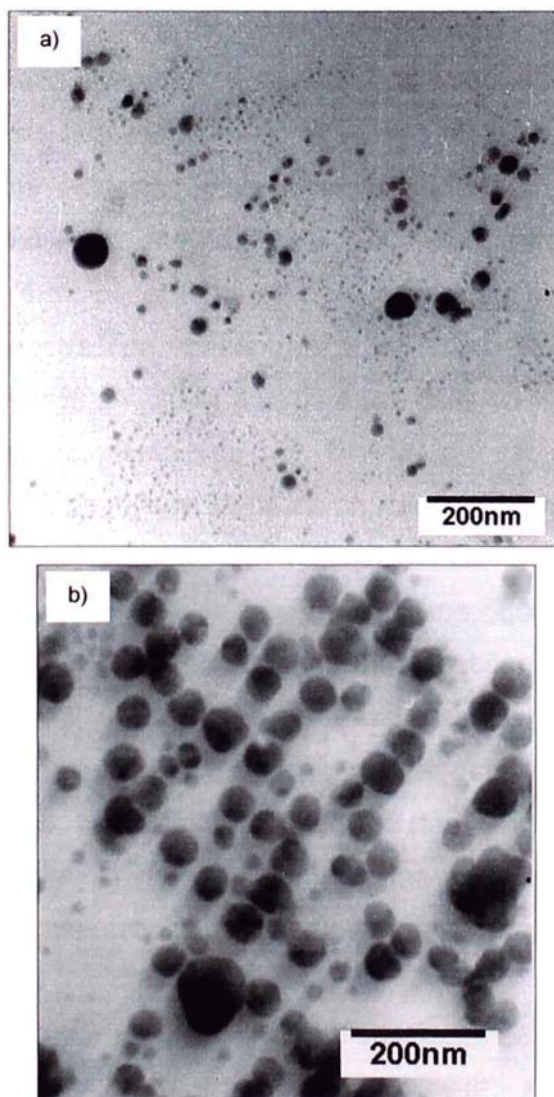


Figura 4.14. Imágenes MET de las nanopartículas obtenidas a partir de las mezclas PVP 0,5%, isopropanol 0,2 M y AgNO_3 2×10^{-4} (a) y 2×10^{-2} M (b).

b) Efecto de la concentración de isopropanol

Para evaluar el efecto del isopropanol se decidió utilizar cantidades de alcohol en exceso además de la inicialmente empleada (0,2 M) la cual era la concentración usualmente empleada en la mayoría de trabajos reportados para la obtención de nanopartículas de plata. Se evaluaron así mezclas utilizando concentraciones de isopropanol de 0,2; 2, 4 y 6 M y además se compararon con el coloide obtenido sin isopropanol.

Los coloides obtenidos con isopropanol en concentraciones de 2, 4 y 6 M. fueron soluciones coloidales de coloración anaranjado y amarillo verdoso. Los máximos de absorción observados por UV-vis están en 405 y 408 nm para 6 y 4 M, respectivamente, mientras que en la muestra con 2 M de alcohol es notorio el desplazamiento de la banda de absorción hacia 415 nm acompañado de un ensanchamiento de la banda de absorción, Figura 4.15. Cuando se utilizó 0,2 M de isopropanol se observó una banda alrededor de 412 nm. En contraste, cuando no se utilizó isopropanol la banda observada está centrada alrededor de 414 nm, similar a lo observado con 2 M. Por otro lado, las imágenes obtenidas por MET, Figura 4.16, muestran nanopartículas esféricas cuya homogeneidad, en cuanto a tamaños de partículas, parece mejorar a medida que se incrementa la concentración de isopropanol a partir de 4 M, observándose una distribución estrecha alrededor de 25 nm. Mientras que la muestra con concentración de isopropanol de 2 M presenta una distribución de tamaños más amplia que varía entre 15 y 40 nm, lo cual se ve también reflejado en el ensanchamiento de la banda de absorción observado por espectroscopia UV-vis. En contraste, para los casos con 0,2 M y sin alcohol, como ya se describió anteriormente, se observan nanopartículas en su mayoría esféricas y también algunas que pueden referirse a decahedros, que se forman al juntarse algunas nanopartículas [18,25], cuyos tamaños oscilan entre 10 y 100 nm. Comparando estos valores, vemos que el tamaño así como la distribución de las nanopartículas se ve notablemente mejorado en presencia de alcohol isopropílico con concentraciones superiores a 2 M, Por otro lado, a partir de los análisis por difracción de electrones se determinó la presencia de Ag mayoritariamente para los coloides obtenidos empleando las mayores concentraciones de isopropanol.

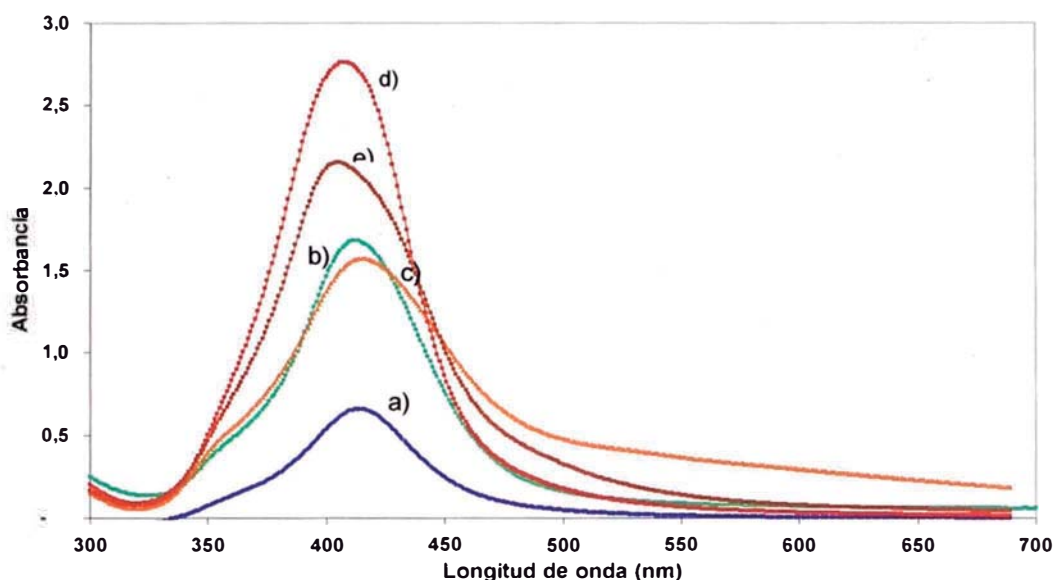


Figura 4.15. Espectros UV-Visible de los coloides obtenidos a partir de las mezclas AgNO_3 $2 \times 10^{-2} \text{ M}$, PVP al 0.5% e isopropanol 0 (a), 0,2 (b), 2 (c), 4 (d) y 6 M (e).

De estas experiencias se vio que la concentración de isopropanol más óptima estaría alrededor de 4 M por cuanto permite obtener nanopartículas de tamaños alrededor de 25 nm y con una distribución de tamaños estrecha, por lo cual, en adelante se trabajará con esta concentración pero también se seguirá empleando la concentración de 0,2 M como comparación y referencia de otros trabajos reportados.

En la Tabla 4.4 se resumen algunas propiedades físicas obtenidas a partir de los datos obtenidos por espectroscopia UV-Vis y MET para los distintos coloides ensayados.

Tabla 4.4. Propiedades físicas de nanopartículas de plata preparadas a partir de mezclas AgNO_3 -PVP y AgNO_3 , PVP e isopropanol.

AgNO ₃ 2x10 ⁻² M				
PVP (%p/v)	λ (nm)	Absorbancia	Ancho medio de pico (nm)	Tamaño de partícula (nm)
0,5	414	0,66	58	10-50
0,8	420	0,92	77	30-70
1	414	1,16	56	10-50
PVP 0,5 %p/v– isopropanol 0,2 M				
AgNO ₃ (M)				
2x10 ⁻⁴	412	0,30	110	25-65
2x10 ⁻²	412	1,68	65	20-100
PVP 0,5 % p/v – AgNO ₃ 2x10 ⁻² M				
Isopropanol (M)				
2	415	1,56	87	15-40
4	408	2,70	65	~25
6	405	2,14	68	~21

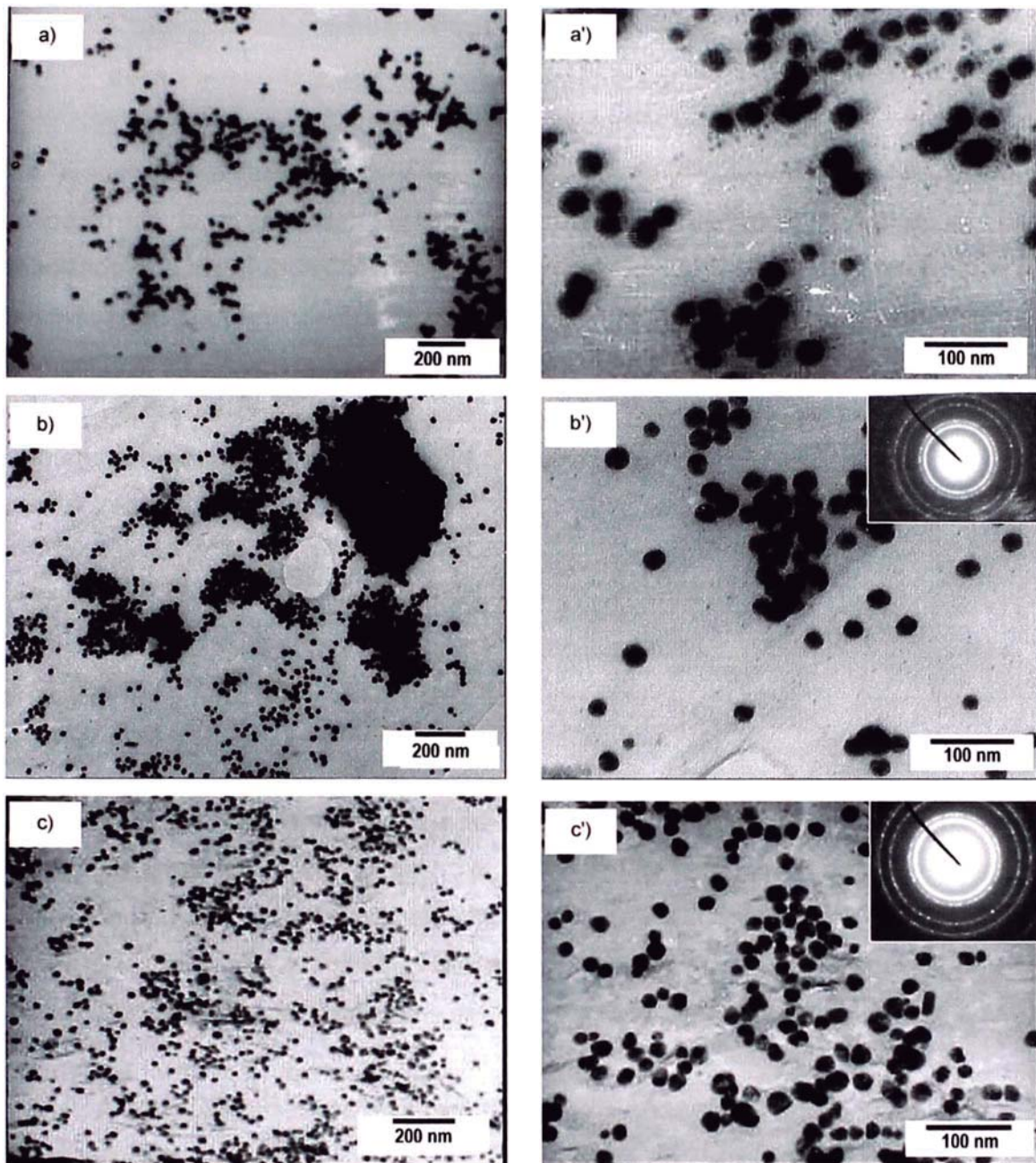


Figura 4.16. Imágenes MET de las nanopartículas obtenidas a partir de las mezclas AgNO_3 2×10^{-2} M, PVP al 0,5% e isopropanol 2 (a), 4 (b) y 6 M (c).

Tabla 4.5
Distancias interplanares de las partículas mostradas en la imagen 4.16b'.

d_{hkl} experimental	d_{hkl} referencia	(hkl)	
2,4104	2,3200	(111)	Ag
2,0826	2,0500	(200)	Ag
1,4629	1,4400	(220)	Ag
1,2575	1,2200	(311)	Ag
1,2017	1,1800		Ag

4.3. Coloides de nanopartículas de plata obtenidos utilizando PVA como estabilizador del coloide

Se prepararon soluciones acuosas de AgNO_3 -PVA y AgNO_3 -PVA-isopropanol. Al respecto de la acción del PVA como polímero estabilizador del coloide, se ha reportado que los grupos OH de las cadenas del PVA interactúan con los átomos de la superficie de las partículas de plata formadas, mientras que las cadenas poliméricas que las rodean inhiben su unión con otros átomos o partículas de plata. El tamaño final de las partículas de plata estabilizadas por el polímero es de pocas decenas de nanómetros y el sol presenta las clásicas bandas de absorción superficial [24].

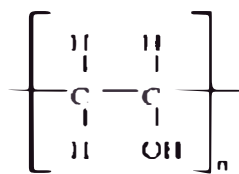


Figura 4.17. Estructura química del PVA.

Se han obtenido coloides de nanopartículas y nanovarillas (nanorods) de plata y sus óxidos. Al igual que para los coloides obtenidos anteriormente con PVP, para este caso también se hizo una primera evaluación empleando mezclas AgNO_3 y PVA y posteriormente mezclas AgNO_3 , PVA e isopropanol, en esta última mezcla se evaluó los efectos de cada componente en la formación de las nanopartículas y nanovarillas.

4.3.1. Coloides obtenidos a partir de mezclas AgNO_3 -PVA

Se prepararon mezclas de AgNO_3 $2 \times 10^{-2} \text{M}$ y PVA al 0,5; 0,8 y 1 %p/v, las cuales después de su irradiación presentaron una coloración marrón rojiza (Figura 4.18), cuyos máximos de absorción del plasmón superficial obtenidos por espectroscopia UV-vis están entre 426 y 448 nm, Figura 4.19.

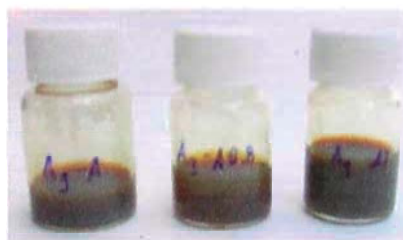


Figura 4.18. Coloides obtenidos luego de la irradiación de soluciones acuosas de AgNO_3 y PVA

Las formas de las partículas obtenidas fueron mayormente esféricas y con una amplia distribución de tamaños entre 17 y 100 nm (Figura 4.20). Sin embargo para las muestras con PVA al 0,8 y 1 %p/v se observan partículas mas uniformes y cuya distribución parece centrarse alrededor de 50 nm. Esto se ve reflejado en una banda de absorción del plasmón superficial en menor longitud de onda y además de una banda más estrecha para la muestra con PVA al 0,8%, sin embargo para la muestra con PVA al 1% no se observa el corrimiento hacia menor longitud de onda ya que, a diferencia de las anteriores muestras, en esta se observó la formación de estructuras tipo varillas de 100 y 270 nm de ancho y aproximadamente 2,5 μm de largo, las cuales ensancharían el espectro. Además, como se observa en la Figura 4.19, el espectro óptico de esta muestra no es simétrico alrededor de una sola longitud de onda de absorción máxima. Este espectro podría deconvolucionarse en dos picos, uno de muy baja intensidad centrado alrededor de 353 nm y otro de mayor intensidad centrado alrededor de 448 nm. El pico centrado alrededor de 353 nm puede asignarse a las resonancias del plasmón superficial de nanopartículas de tamaños pequeñísimos (menores a 50 nm), mientras que el otro pico podría asignarse a la suma de las absorciones de las nanopartículas esféricas y de las nanovarillas [63, 74]. El análisis por difracción de electrones muestra que las partículas formadas corresponderían a plata metálica acompañada de óxidos, principalmente Ag_2O y Ag_2O_3 .

Al igual que para el caso de las nanopartículas obtenidas con PVP, las formas de los espectros ópticos puede ser mejor entendida en términos de la distribución de tamaños y formas observados por MET. Los desplazamientos hacia mayor longitud de onda así como los ensanchamientos de las bandas de absorción del plasmón superficial, estarían relacionados con los tamaños y distribución de partículas, y en este caso, a la presencia de estructuras de mayor tamaño como son las nanovarillas.

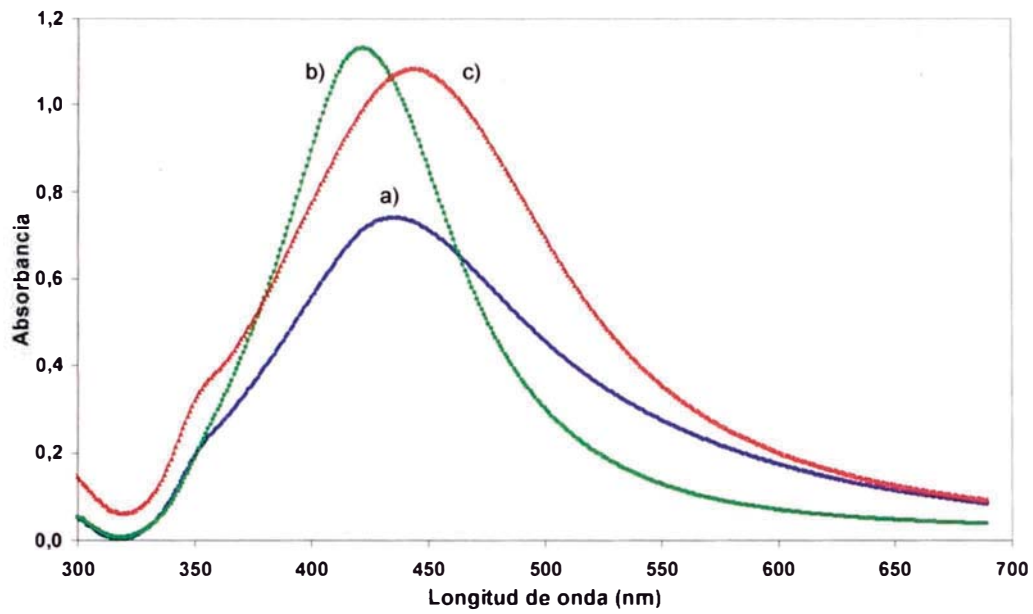


Figura 4.19. Espectros UV-Visible de los coloides obtenidos a partir de las mezclas AgNO_3 2×10^{-2} M y PVA al 0,5 (a), 0,8 (b) y 1% (c)

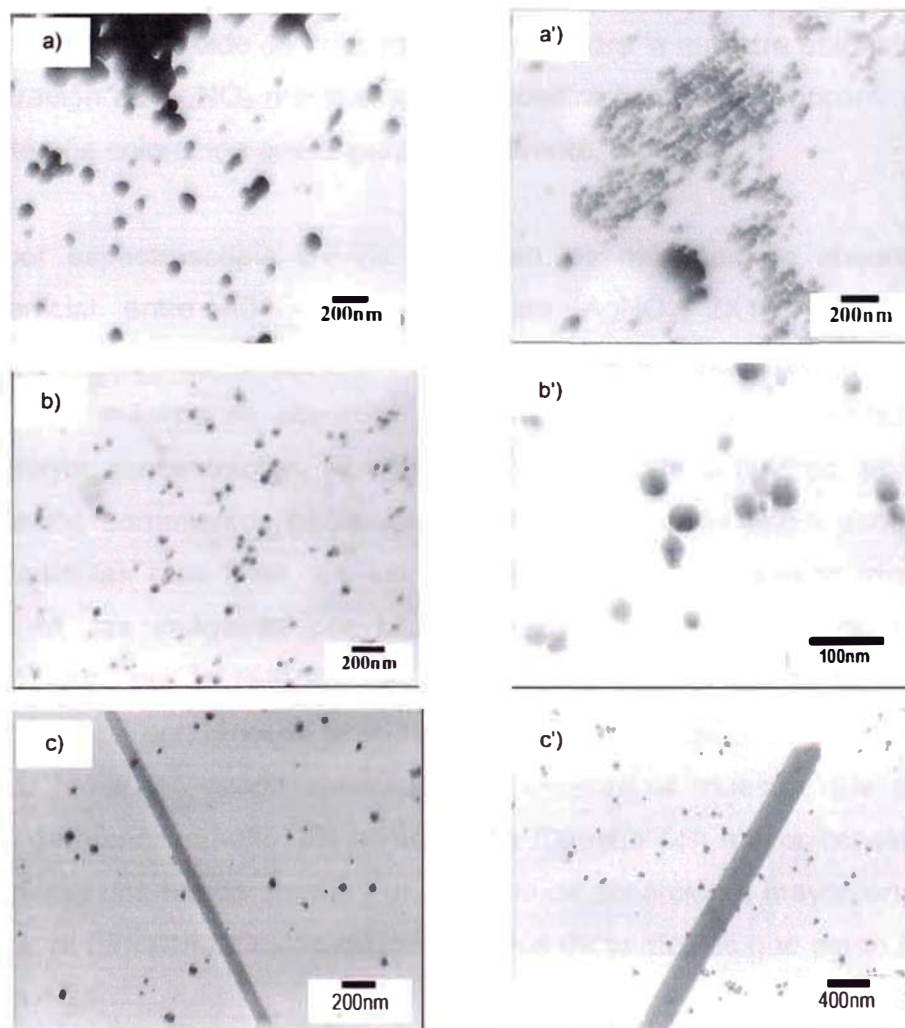


Figura 4.20. Imágenes MET de las nanopartículas y nanovarillas obtenidas a partir de las mezclas AgNO_3 2×10^{-2} M y PVA al 0,5 (a), 0,8 (b) y 1% (c).

4.3.2. Coloides obtenidos a partir de las mezclas AgNO₃-PVA-isopropanol

Se prepararon mezclas en soluciones acuosas de AgNO₃-isopropanol-PVA variando cada uno de los componentes. La concentración de AgNO₃ en las mezclas fue de 2×10^{-4} y 2×10^{-2} M, las concentraciones del isopropanol empleadas fueron 0,2 y 4 M y las del PVA 0,5; 0,8 y 1% (se hizo el estudio de la concentración del polímero ya que como se vió en las muestras AgNO₃-PVA, para el caso de PVA al 1% se ha observado estructuras con formas de nanovarillas, lo cual no se observó cuando se trabajó con PVP).

a) Efecto de la concentración de AgNO₃

Para la evaluación de concentración de AgNO₃ se utilizó PVA al 0,5% e isopropanol 0,2 M y se varió la concentración de AgNO₃ en 2×10^{-4} y 2×10^{-2} M. Luego de su irradiación se obtuvo un coloide de color marrón rojizo para la muestra obtenida con la mayor concentración de AgNO₃ mientras que la muestra con menor concentración de AgNO₃ presentó una coloración anaranjada transparente, Figura 4.21.

Los análisis por espectroscopía UV-Vis muestran los máximos de absorción del plasmón superficial entre 404 y 438 nm para AgNO₃ 2×10^{-4} y 2×10^{-2} M, respectivamente, Figura 4.22. Siendo la muestra con menor concentración de AgNO₃ la que presenta su máximo de absorción desplazado hacia el azul, respecto de la muestra con mayor concentración. Al igual que en los caso anteriores, se puede comprobar que los corrimientos hacia menor longitud de onda están asociados a tamaños de partículas mas finas. Es así que para el coloide obtenido empleando AgNO₃ 2×10^{-4} M, las imágenes por MET muestran nanopartículas de tamaños alrededor de 18 nm, por lo cual era de esperarse el corrimiento de la banda de absorción hacia el azul centrándose alrededor de 404 nm siendo el mayor corrimiento observado para todos los casos analizados así también la muestra que presentó nanopartículas de menor tamaño. En contraste, la muestra con mayor concentración de AgNO₃ presenta una banda amplia y un máximo de absorción a mayor longitud de onda, lo cual se ve también reflejado en los tamaños de partículas que están entre 36 y 72 nm, Figura 4.23.

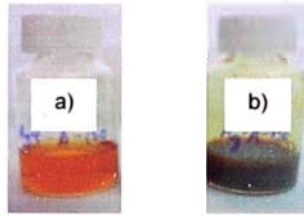


Figura 4.21. Coloides obtenidos a partir de las mezclas de PVA al 0,5%, isopropanol 0,2 M y AgNO_3 2×10^{-4} (a) y 2×10^{-2} M (b)

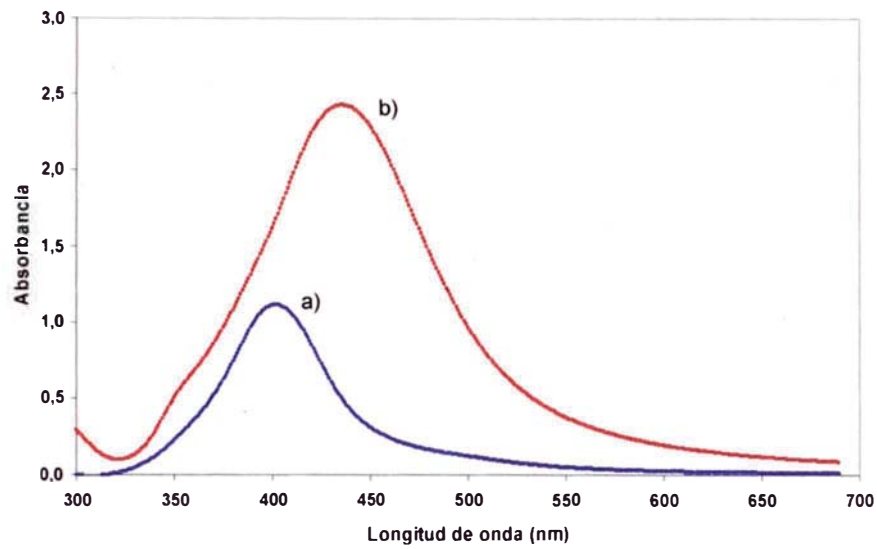


Figura 4.22. Espectros UV-Visible de los coloides obtenidos a partir de las mezclas de PVA al 0,5%, isopropanol 0,2 M y AgNO_3 2×10^{-4} (a) y 2×10^{-2} M (b).

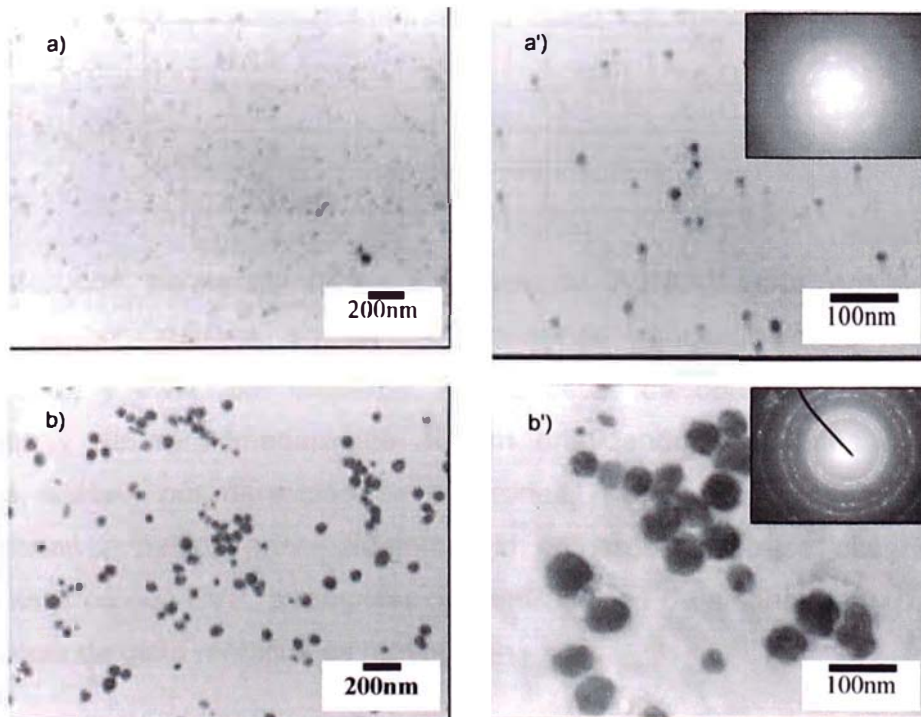


Figura 4.23. Imágenes MET de las nanopartículas obtenidas a partir de las mezclas de PVA 0,5%, isopropanol 0,2 M y AgNO_3 2×10^{-4} (a) y 2×10^{-2} M (b).

Tabla 4.6
Distancias interplanares de las partículas mostradas en las imágenes 4.23a' y 4.23b'

Distancias interplanares de las partículas mostradas en la imagen 4.23a'			
d_{hkl} experimental	d_{hkl} referencia	(hkl)	
4,58	4,60	(020)	Ag ₃ O ₄
3,56	3,51	(021)	Ag ₃ O ₄
2,86	2,72	(111)	AgO
	2,75	(120)	Ag ₃ O ₄
2,64	2,62	(002)	AgO
	2,67	(031)	Ag ₃ O ₄
	2,69	(311)	Ag ₂ O ₃
2,29	2,29	(202)	AgO
	2,32	(111)	Ag
1,93	1,91		AgO
	1,93	(211)	Ag ₂ O
	1,99	(620)	Ag ₂ O ₃
1,77	1,76	(202)	Ag ₂ O ₃
1,54	1,49	(310)	Ag ₂ O
	1,54		Ag ₂ O ₃
1,35	1,36	(222)	Ag ₂ O
Distancias interplanares de las partículas mostradas en la imagen 4.23b'			
d_{hkl} experimental	d_{hkl} referencia	(hkl)	
2,29	2,32	(111)	Ag
	2,36	(200)	Ag ₂ O
2,03	2,03	(440)	Ag ₂ O ₃
	2,05	(200)	Ag
1,98	1,93	(211)	Ag ₂ O
	1,99	(620)	Ag ₂ O ₃
1,40	1,44	(220)	Ag
	1,42	(311)	Ag ₂ O
1,19	1,18		Ag
	1,18	(400)	Ag ₂ O
1,13	1,08		Ag ₂ O
0,99	0,96		Ag ₂ O
0,91	0,91		Ag ₂ O

Por lo tanto, con pequeñas concentraciones de AgNO₃, sería posible obtener nanopartículas homogéneas en tamaño, utilizando concentraciones mínimas de alcohol (0,2 M) y PVA. Sin embargo, aún a pesar de obtenerse nanopartículas homogéneas y de aproximadamente 18 nm empleando cantidades mínimas de AgNO₃, los análisis por difracción de electrones, Tabla 4.6, muestran que éstas corresponderían a óxidos principalmente. Sin embargo, como se observó en los coloides obtenidos con PVP, al emplear concentraciones de alcohol en exceso (2 – 6 M) la presencia de plata metálica es mayoritaria.

b) Efecto de la concentración del Isopropanol

Se evaluaron los coloides obtenidos utilizando AgNO_3 2×10^{-2} M, PVA 0,5% e isopropanol 0,2 y 4 M. Las soluciones obtenidas mostraron coloraciones marrones rojizos. Los análisis por espectroscopía UV-vis mostraron máximos de absorción del plasmón superficial entre 438 y 415 nm, respectivamente como se muestra en la Figura 4.24, en esta también se ha graficado la banda de absorción del coloide obtenido anteriormente en ausencia de alcohol. Las bandas anchas observadas para todos los casos, están relacionadas a la presencia de nanopartículas con una amplia distribución de tamaños (entre 30 y 150 nm). En la Figura 4.25, sólo se muestra la micrografía correspondiente al coloide obtenido con isopropanol 4 M ya que las micrografías de los coloides obtenidos con 0 y 0,2 M de isopropanol ya se mostraron anteriormente. Como se observa en la micrografía por MET de la muestra obtenida con la mayor concentración de alcohol, hay una amplia distribución de tamaños de partículas. El espectro de absorción de las resonancias del plasmón superficial de ésta muestra, presenta dos picos, uno de gran intensidad alrededor de 415 nm y otro de menor intensidad aproximadamente alrededor de 550 nm. Estos, como se confirma en las imágenes obtenidas por MET, se deben a la presencia de nanopartículas con amplia distribución de tamaños, donde se encontrarían partículas de menor tamaño que los encontrados para los casos con 0 y 0,2 M de alcohol pero acompañadas con otras partículas de gran tamaño que alcanzan tamaños de hasta 150 nm, las cuales corresponderían a aglomerados.

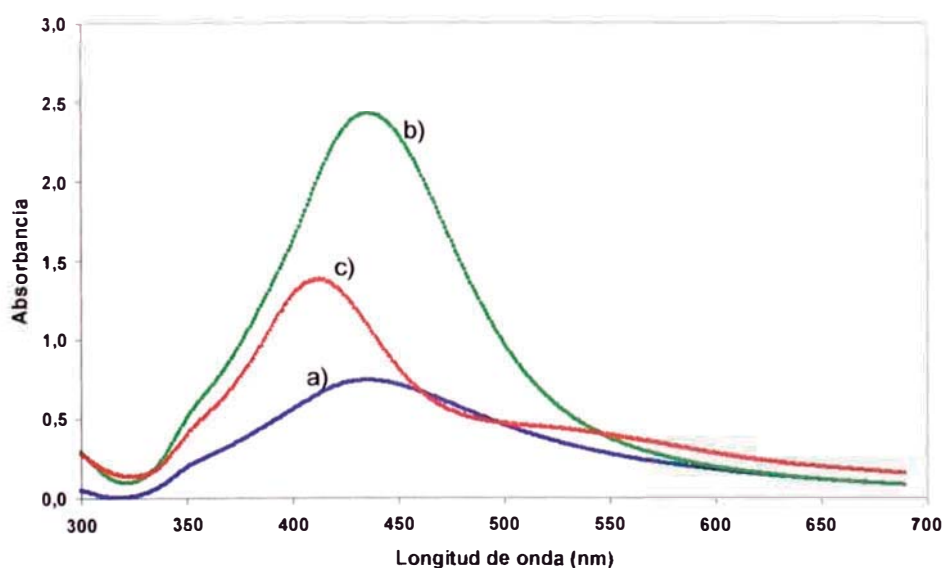


Figura 4.24. Espectros UV-Visible de los coloides obtenidos a partir de las mezclas AgNO_3 2×10^{-2} M, PVA 0,5% e isopropanol 0 (a), 0,2 (b) y 4 M (c).

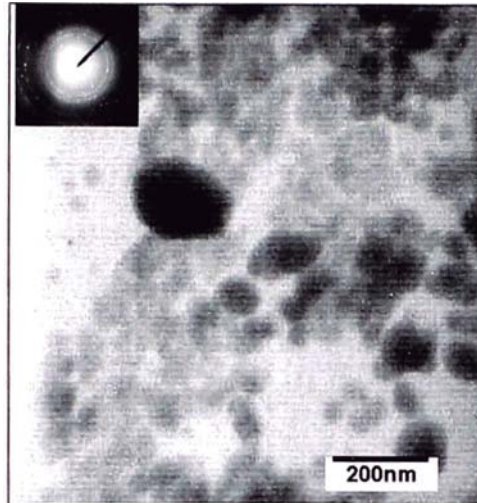


Figura 4.25. Imagen MET de las nanopartículas obtenidas a partir de la mezcla AgNO_3 2×10^{-2} M, PVA 0,5% e isopropanol 4 M.

c) Efecto de la concentración del PVA

Los efectos del polímero en las mezclas con alcohol fueron evaluados al observarse formaciones tipo nanovarillas durante la evaluación de la concentración del PVA en las mezclas AgNO_3 y PVA.

Se prepararon soluciones ternarias donde se varió las concentraciones del polímero, confirmándose lo observado en las mezclas PVA- AgNO_3 . Las formaciones de tipo nanovarillas se ven favorecidos para concentraciones de polímero al 1%, por lo cual presumimos que la formación de nanovarillas está mayormente influenciada por el tipo de polímero y su concentración, por otro lado el isopropanol parece contribuir mayormente a la homogeneidad de las partículas y reducir las presencia de aglomerados. Para las mezclas con 0,5 y 0,8% de PVA se obtuvieron soluciones de coloración similar a las anteriores, mientras que la muestra con PVA al 1% presentó una coloración rojiza mucho más intensa, Figura 4.26.

Los análisis por espectroscopia UV-Vis muestran los máximos de absorción del plasmón superficial entre 438 y 433 nm para las muestras con PVA al 0,5 y 0,8%, respectivamente. La muestra con PVA al 1% presenta su máximo alrededor de 453 nm así mismo, una banda más ancha comparada con las otras, Figura 4.27. El corrimiento hacia mayor longitud de onda puede estar asociado a los tamaños y formas de partículas ya que, como lo muestran los análisis por MET, Figura 4.28, en esta muestra se observan formaciones tipos nanovarillas de diversos tamaños, además de nanopartículas de formas poliédricas con tendencia a estructuras cuasi hexagonales y tamaños entre 36 y 72 nm presentes en los tres casos.

Se debe anotar que, las formaciones tipo varillas aparecen cuando el PVA se encuentra en una concentración de 1%, al igual que para el caso de la mezcla sin alcohol, AgNO_3 -PVA, siendo también este el que presentó la coloración rojiza mas intensa en su grupo.

En la Tabla 4.7 se resumen algunas propiedades físicas obtenidas a partir de los datos obtenidos por espectroscopia UV-Vis y MET para los distintos coloides ensayados. Las absorbancias que no se registran en la tabla 4.9 se debe a que esos coloides no fueron diluidos en la misma proporción que los demás.

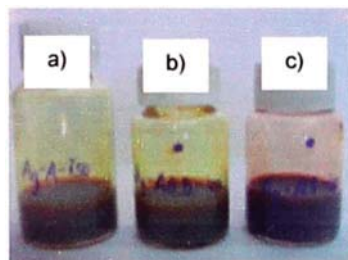


Figura 4.26. Coloides obtenidos a partir de las mezclas $\text{AgNO}_3 2 \times 10^{-2} \text{ M}$, isopropanol 0,2 M y PVA al 0,5 (a), 0,8 (b) y 1% (c).

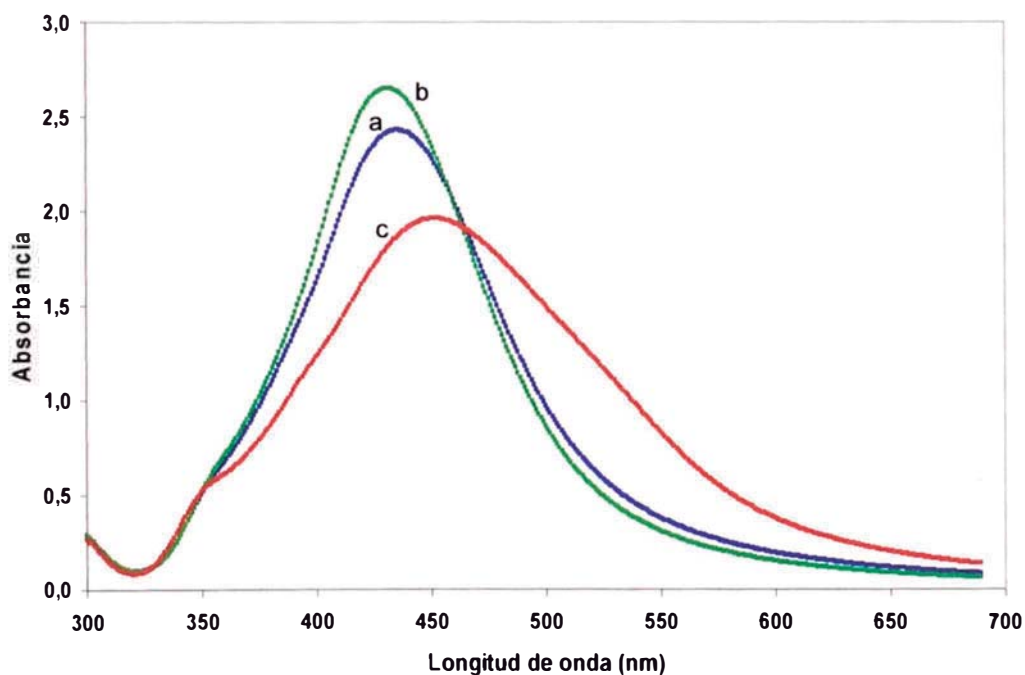


Figura 4.27. Espectros UV-Visible de los coloides obtenidos a partir de las mezclas $\text{AgNO}_3 2 \times 10^{-2} \text{ M}$, isopropanol 0.2 M y PVA al 0,5 (a), 0,8 (b) y 1% (c).

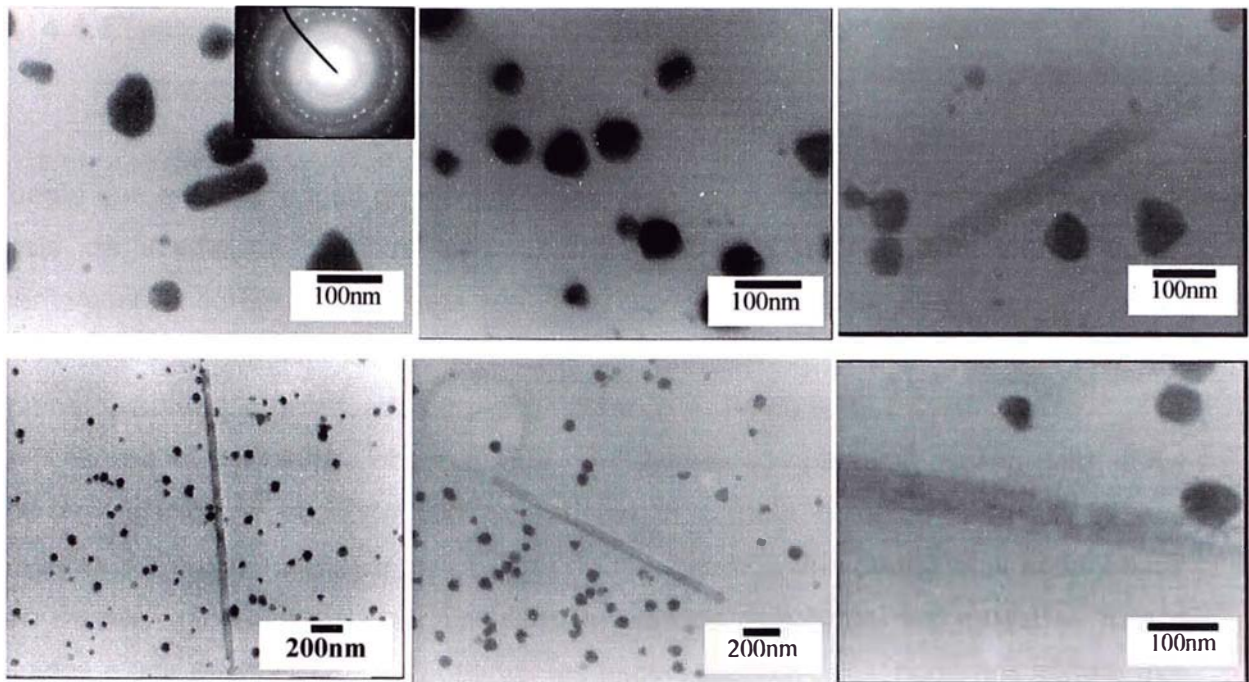


Figura 4.28. Imágenes MET de las nanopartículas obtenidas a partir de las mezclas AgNO_3 2×10^{-2} M, isopropanol 0.2 M y PVA al 1%.

Tabla 4.7. Propiedades físicas de nanopartículas de plata preparadas a partir de mezclas AgNO_3 -PVA y AgNO_3 , PVA e isopropanol.

AgNO_3 2×10^{-2} M					
PVA (%p/v)	λ (nm)	Absorbancia	Ancho medio de pico (nm)	Tamaño de partícula (nm)	Presencia de nanovarillas
0,5	353 y 436	0,74	140	40-100	No
0,8	426	1,13	90	17-50	No
1	353 y 448	1,08	140	~50	Sí
AgNO_3 2×10^{-2} M - Isopropanol 0,2 M					
PVA (%p/v)					
0,5	438	2,42	105	36-72	No
0,8	433	2,64	100	36-72	No
1	453	1,96	150	36-72	SÍ
PVA 0,5 %p/v – AgNO_3 2×10^{-2} (M)					
Isopropanol (M)					
0	353 y 436	0,74	140	40-100	No
0,2	438	2,42	105	36-72	No
4	415 y 550	-	89	30-150	No
PVA 0,5 %p/v– isopropanol 0,2 M					
AgNO_3 (M)					
2×10^{-4}	404	-	62	15-20	No
2×10^{-2}	438	2,42	105	36-72	No

4.4. Efecto de la dosis de irradiación en la formación de las nanopartículas

Puesto que el tamaño final de las partículas de plata dependería también de la tasa y dosis de irradiación se hizo una prueba para evaluar el efecto de la dosis, manteniendo constante la tasa de irradiación. Se utilizó PVP como agente estabilizador del coloide. Las dosis empleadas fueron de 5, 15 y 25 kGy. Los coloides obtenidos fueron caracterizados por espectroscopia UV-vis y MET.

En la Figura 4.29 podemos observar que los máximos de absorción oscilan entre 404 y 408 nm, siendo el espectro correspondiente al coloide obtenido a 5 kGy el que presenta su máximo a mayor longitud de onda y además una banda más ensanchada con respecto a las otras dos. Teniendo en cuenta que todas las muestras fueron diluidas a una misma razón, al observar los espectros obtenidos, podemos afirmar que la concentración de las nanopartículas aumenta con la dosis de irradiación. Los datos de los máximos de absorbancia, ancho medio de pico y otros se resumen en la Tabla 4.10.

Las imágenes por MET (Figura 4.30) de las nanopartículas obtenidas muestran partículas de tamaños muy dispersos para el caso del coloide obtenido a 5 kGy, lo cual confirma una vez más la relación del ensanchamiento de la banda de absorbancia observada por la espectroscopia UV-vis, mientras que para los coloides obtenidos con 15 y 25 kGy se observan nanopartículas con tamaños más uniformes que oscilan alrededor de 25 nm. En su mayoría las nanopartículas son de formas esféricas.

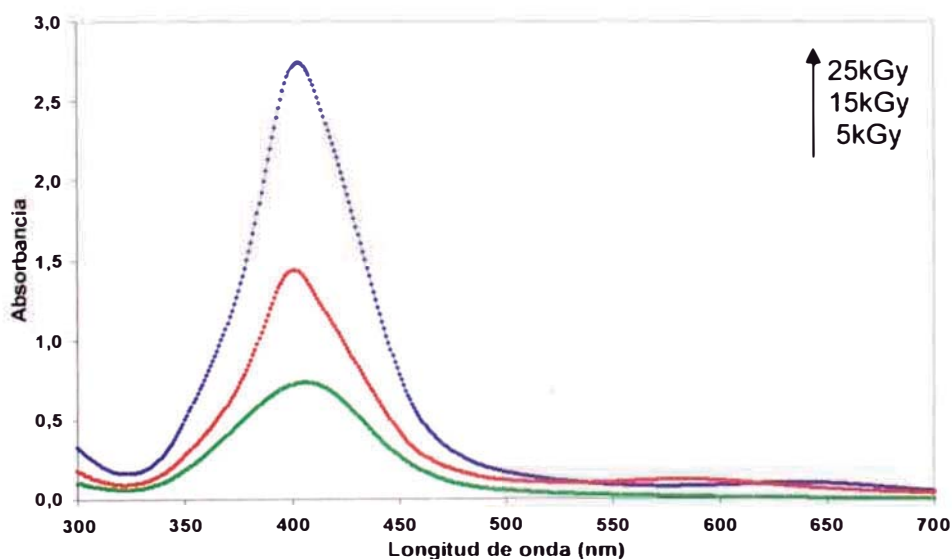


Figura 4.29. Espectros UV-vis de los coloides obtenidos a distintas dosis usando PVP como agente estabilizador del coloide.

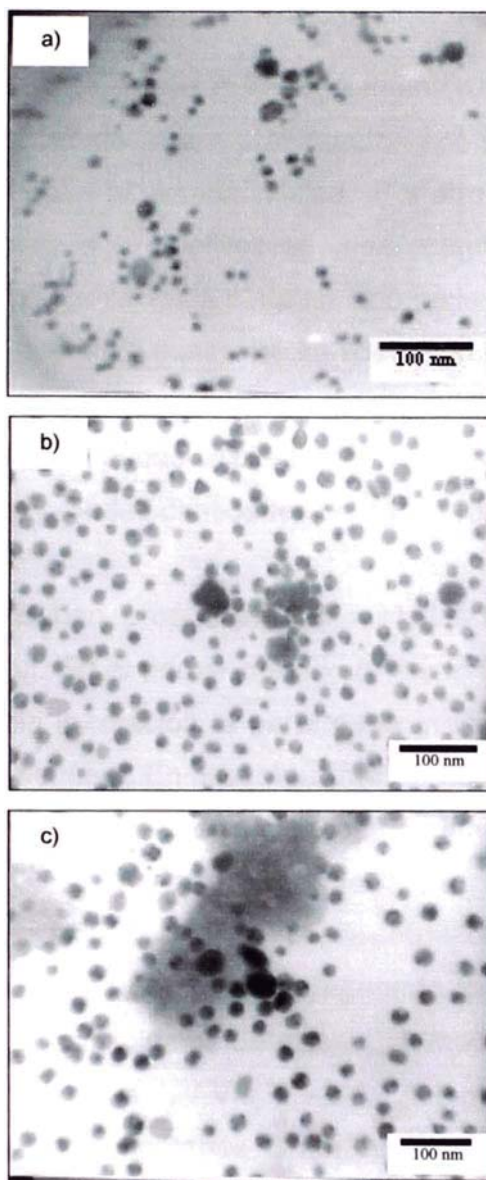


Figura. 4.30. Imágenes MET de nanopartículas de plata obtenidas a 5 (a), 15 (b) y 25 kGy (c)

Tabla 4.8. Propiedades físicas obtenidas a partir de la espectroscopia UV-vis y MET de los coloides sintetizados a distintas dosis.

Dosis (kGy)	λ (nm)	Absorbancia	Ancho medio de pico (nm)	Tamaño de partícula (nm)
5	408	0,73	76	10-30
15	404	1,42	61	~25
25	404	2,73	61	~25

4.5. Nanocompuestos hidrogel/Ag

El PVA y PVP son dos de los polímeros más ampliamente usados como matrices para preparar nanocompuestos debido a sus propiedades como solubilidad en agua, no citotoxicidad, alta claridad óptica y biocompatibilidad. Por otro lado, se sabe que la plata metálica y los iones de plata son efectivos agentes antimicrobianos. Por lo cual, la aplicación de membranas que enlacen la plata ha sido recientemente sugerida a fin de retardar el movimiento de la plata y minimizar su absorción, por ejemplo, a heridas en proceso de curación. En tal sentido, los hidrogeles constituyen una excelente opción aprovechando principalmente el espacio libre disponible entre las redes entrecruzadas y su capacidad de absorber grandes cantidades de agua [13, 23, 43].

En el presente trabajo se han propuesto tres métodos distintos para obtener el nanocompuesto hidrogel/Ag. En el primer método (método I), los nanocompuestos se obtienen in situ en una sola irradiación, a partir de la irradiación de la mezcla de los precursores en solución acuosa. En los siguientes métodos (método II y III) los nanocompuestos se obtienen luego de dos procesos de irradiación. En el método II el nanocompuesto fue obtenido por impregnación de la sal precursora en las matrices poliméricas en estado de película seca y la posterior reducción de los iones Ag^+ . En el método III el nanocompuesto fue obtenido impregnando los hidrogeles en estado de películas secas en soluciones coloidales de plata. Los materiales obtenidos han sido caracterizados por espectroscopia UV-Vis y MFA. Así mismo, se ha evaluado la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positiva, *Staphylococcus aureus*, y Gram negativa, *Pseudomonas aeruginosa*. Los nanocompuestos obtenidos por el primer método fueron también caracterizados por DR-X, MET y FTIR. Y los nanocompuestos obtenidos por el último método fueron evaluados, además de las otras dos bacterias antes mencionadas, frente a la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*.

Para todos los métodos la formulación empleada para la formación del hidrogel es aquel donde los polímeros en solución acuosa consistieron de mezclas PVA-PVP con concentraciones totales de polímero sólido de 4,8% de PVA y 4% de PVP, ya que el hidrogel así obtenido fue el que presentó mejores propiedades y un grado de hinchamiento de 600%. Los hidrogeles de PVA se obtuvieron utilizando una concentración de PVA al 8%.

4.5.1. Método I: Obtención del nanocompuesto in situ

Se ensayaron dos tipos de mezclas. En una primera serie, se prepararon mezclas ternarias de polímero, isopropanol y la sal precursora de las nanopartículas de plata (AgNO_3). Luego de algunas observaciones se prepararon otras mezclas pero en ausencia del alcohol. Para la primera serie de mezclas, las concentraciones de isopropanol empleadas fueron 0; 0,2 y 2 M y las de AgNO_3 se variaron entre 2×10^{-4} a 2×10^{-2} M. En la Tabla 4.9 se muestran los resultados de la irradiación de tales mezclas donde se marcan con un aspa las concentraciones con las cuales fue posible la formación in situ del hidrogel, posiblemente con nanopartículas de plata, y con una cruz las condiciones en las cuales no fue posible el entrecruzamiento y por tanto no hubo formación del hidrogel. En la Figura 4.31 se muestran los hidrogeles obtenidos luego de la irradiación y en la Figura 4.32 los hidrogeles luego de secarlos a temperatura ambiente hasta formar una película.

Tabla 4.9. Gelificación de mezclas PVA, PVP, AgNO_3 e isopropanol irradiadas a 25 kGy.

PVA-PVP			
AgNO_3 (M)	Isopropanol (M)		
	0	0,2	2
2×10^{-4}	✓	x	x
2×10^{-3}	✓	x	x
2×10^{-2}	x	x	x

x no hubo gelificación

✓ Gelificación completa

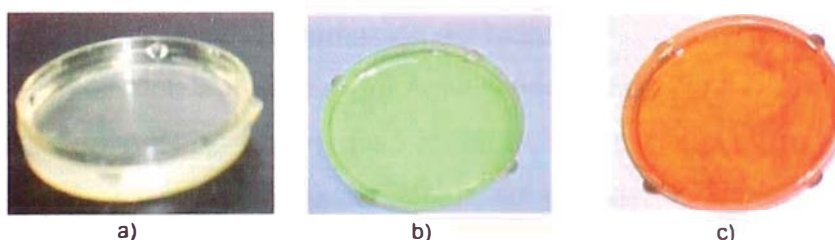


Figura 4.31. Hidrogel PVA-PVP (a) y nanocompuestos obtenidos a partir de la mezcla PVA-PVP y AgNO_3 2×10^{-4} (b) y 2×10^{-3} M (c)

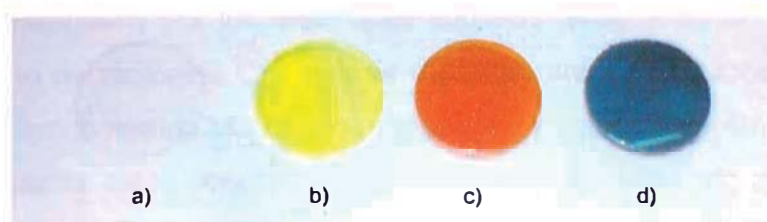


Figura. 4.32. Películas de hidrogel PVA-PVP (a) y nanocompuestos obtenidos a partir de la mezcla PVA-PVP y AgNO_3 2×10^{-4} (b) 2×10^{-3} (c) y 2×10^{-2} M (d)

De esta experiencia se obtuvieron las siguientes observaciones importantes:

- La formación de nanocompuestos PVA-PVP/Ag es posible sólo en ausencia de alcohol.
- La gelificación del hidrogel depende de la concentración de AgNO_3 , ésta disminuye a medida que se incrementa la concentración de la sal. Así por ejemplo para concentraciones de AgNO_3 de 2×10^{-4} M se obtiene un gel firme, fácil de manipular; para concentraciones de 2×10^{-3} M se forma un gel pegajoso difícil de manipular; mientras que con concentraciones de 2×10^{-2} M no hay gelificación, al igual que lo observado para las mezclas irradiadas en presencia de alcohol. Por lo cual, al igual que el alcohol, el AgNO_3 por encima de una determinada concentración, también inhibiría el entrecruzamiento y por tanto la formación del hidrogel.

Al respecto de lo observado, podemos atribuir la inhibición del entrecruzamiento de los polímeros PVA y PVP en presencia del alcohol a su capacidad de remover radicales hidroxilos. Ya que como se sabe, en los procesos de entrecruzamiento de polímeros en solución acuosa los radicales hidroxilos, formados durante la irradiación, son las principales especies responsables de transferir reactividad desde el agua hacia la cadena polimérica. Estos extraen átomos de hidrogeno de las macromoléculas, formando así radicales poliméricos, que se recombinan para formar las redes tridimensionales del hidrogel. [45]. Por lo tanto, al incorporar un removedor de radicales a los polímeros en solución acuosa, se reduciría la formación de radicales poliméricos y por consiguiente la formación del hidrogel.

Respecto a lo observado por efecto del AgNO_3 podríamos pensar que, en pequeñas concentraciones de AgNO_3 , en un caso ideal en una primera etapa, los electrones acuosos formados durante la irradiación, actuarían reduciendo la plata iónica, mientras que los radicales OH^\bullet generados se encargarían de generar los radicales poliméricos. A medida que se incrementa la concentración de AgNO_3 lógicamente, se incrementa también la presencia de iones plata, los cuales por su cantidad no serían eficientemente reducidos por los electrones acuosos disponibles en el medio, por lo tanto el consumo de radicales OH^\bullet estaría repartido entre estos iones y las cadenas poliméricas, haciendo menos efectiva la producción de radicales poliméricos.

Teniendo en cuenta estos resultados se prepararon mezclas sin alcohol utilizando mezclas acuosas de PVA y PVP como polímeros formadores del hidrogel, pero también se utilizó PVA puro a fin de evaluar si en esta matriz era posible la obtención de hidrogeles con mejor gelificación y además evaluar posibles diferencias en la

formación de las nanopartículas debido a la matriz. Las concentraciones de AgNO_3 empleadas fueron las mismas. Las muestras se prepararon por lo menos tres veces para asegurar la reproducibilidad de los productos obtenidos. En la tabla 4.10 se describen algunas observaciones visuales de estos. Como allí se describe, los nanocompuestos con plata obtenidos con matriz PVA-PVP son muy similares, en cuanto a características de color, textura, etc., a los obtenidos utilizando PVA solo. Por otro lado, al igual que lo reportado anteriormente, las únicas muestras que permiten manipularse fácilmente fueron las que presentan la menor concentración de AgNO_3 , por lo que solo estas fueron caracterizadas por espectroscopia UV-Vis.

Tabla 4.10. Observaciones cualitativas de los nanocompuestos obtenidos PVA-PVP/Ag y PVA/Ag.

	AgNO_3 (M)		
	2×10^{-4}	2×10^{-3}	2×10^{-2}
PVA-PVP	Amarillo tenue Fácil de manipular	Anaranjado Difícil de manipular o no gelifica	Marrón verdoso No gelifica
PVA	Amarillo tenue Fácil de manipular	Anaranjado Difícil de manipular	Plomizo No gelifica

4.5.1.1 Caracterización de los nanocompuestos

Para confirmar la formación de nanopartículas de plata en los hidrogeles, se llevó a cabo mediciones por espectroscopia UV-Vis. A modo de blancos se hicieron lecturas de hidrogeles PVA-PVP y PVA. En las Figuras 4.33 y 4.34 se muestran los espectros UV-Vis de los nanocompuestos obtenidos confirmándose la formación de nanopartículas de plata ya que se observa la banda de absorción característica debido al efecto de la resonancia del plasmón superficial alrededor de 403 nm. Así mismo se aprecian los picos de absorción correspondientes al polímero en 200 nm para el hidrogel de PVA y en 228 nm para el hidrogel de PVA-PVP. Puesto que en ambas matrices la banda correspondiente a las resonancias del plasmón superficial se encuentra alrededor de 403 nm, podemos pensar que no hay mayor diferencia entre usar la matriz de PVA ó PVA-PVP para la formación del nanocompuesto, sin embargo, como se describe en la Tabla 4.10 los nanocompuestos obtenidos con matriz de PVA presentan, en alguno casos, mejor gelificación. Por otro lado, la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción de los nanocompuestos podría sugerir la presencia de nanopartículas de tamaños menores a los obtenidos en los sistemas coloidales antes reportados, ya que se observa un corrimiento hacia el azul.

Así mismo, para asegurar la presencia de nanopartículas de plata en la matriz polimérica, se tomaron lecturas por DRX para los nanocompuestos obtenidos en matriz de PVA con diferentes concentraciones de plata. Los picos de difracción, correspondientes a la plata, se hacen notorios en la muestra con la mayor concentración de plata Figuras 4.35 y 4.36. En el difractograma del nanocompuesto con la mayor concentración de plata se pueden observar los picos en $38,0^\circ$ y $44,3^\circ$ los cuales se asignan a las reflexiones de los planos cristalinos (111) y (200), respectivamente, de las nanopartículas de plata con estructura cúbica centrada en las caras (fcc). Así mismo, al observar el espectro del hidrogel sin y con nanopartículas de plata, vemos en este último, que el pico alrededor de 19° correspondiente a la cristalinidad del PVA está notoriamente ensanchado, lo cual sugiere que la cristalinidad del PVA se ve afectado por la presencia de las nanopartículas de plata en la matriz.

La fórmula de Sherrer (ecuación 3.4) fue usada para calcular el tamaño promedio de partícula. Donde k es igual a 0,9; la longitud de onda de los rayos X, λ , es igual a 1,541 Å, el β calculado fue de 0.0109 rads y θ fue 19 grados. El tamaño de partícula calculado fue de 9.6 nm. Este resultado concuerda con los tamaños observados por MET (Figura 4.38), donde se observan nanopartículas uniformemente dispersas en la matriz con tamaños entre 10 y 15 nm.

Para investigar posibles interacciones entre las nanopartículas de plata y la matriz de PVA-PVP y entender la influencia de las nanopartículas de plata sobre la estructura y formación de los hidrogeles se evaluaron las películas de PVA-PVP conteniendo nanopartículas de plata por FTIR. En la Figura 4.37 se muestran los espectros correspondientes al hidrogel PVA-PVP y al nanocompuesto PVA-PVP/Ag observándose cambios en el espectro del hidrogel PVA-PVP al incorporar las nanopartículas de plata. La banda en 1460 cm^{-1} estaría relacionada con las vibraciones del O-H, mientras que la banda en 1320 cm^{-1} sería el resultado de los acoplamientos del O-H con vibraciones del C-H. Por lo tanto, los cambios observados en dichas bandas por efecto de la incorporación de las nanopartículas indicarían el desacoplamiento entre las correspondientes vibraciones debido a la interacción entre las nanopartículas de plata y los grupos OH del PVA, algunos investigadores [75, 76] han atribuido a esta banda a enlaces Ag-PVA. Así mismo, la banda en 1145 cm^{-1} asignada a las vibraciones del C-O del PVA y que nos da una medida de la interacción entre el PVA y PVP indicaría implicancias de la plata en la interacción entre el PVA y el PVP. La aparición de estas bandas han sido también reportadas en otros trabajos [13, 23].

La topografía de los nanocompuestos PVA/Ag fue evaluada por MFA. En la Figura 4.39 se observan las imágenes, así como una vista en 3D, de los nanocompuestos obtenidos con diferentes concentraciones de AgNO_3 donde se aprecia principalmente cambios en la rugosidad por efecto de la incorporación de la plata cuyas alturas oscilan entre 4 y 17 nm.

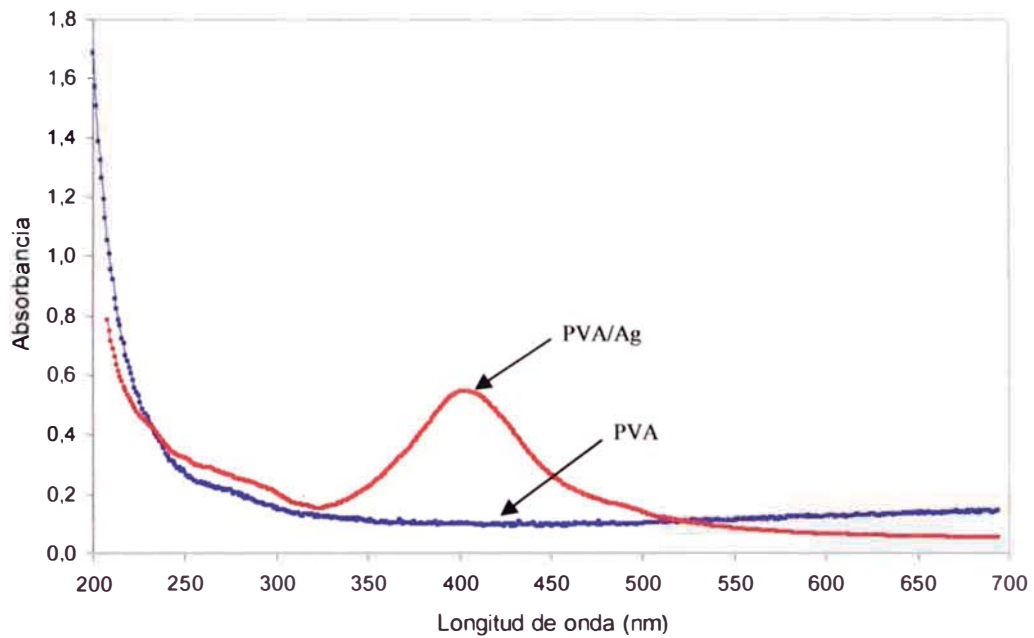


Fig. 4.33. Espectros UV-vis del hidrogel de PVA y el nanocompuesto PVA/Ag.

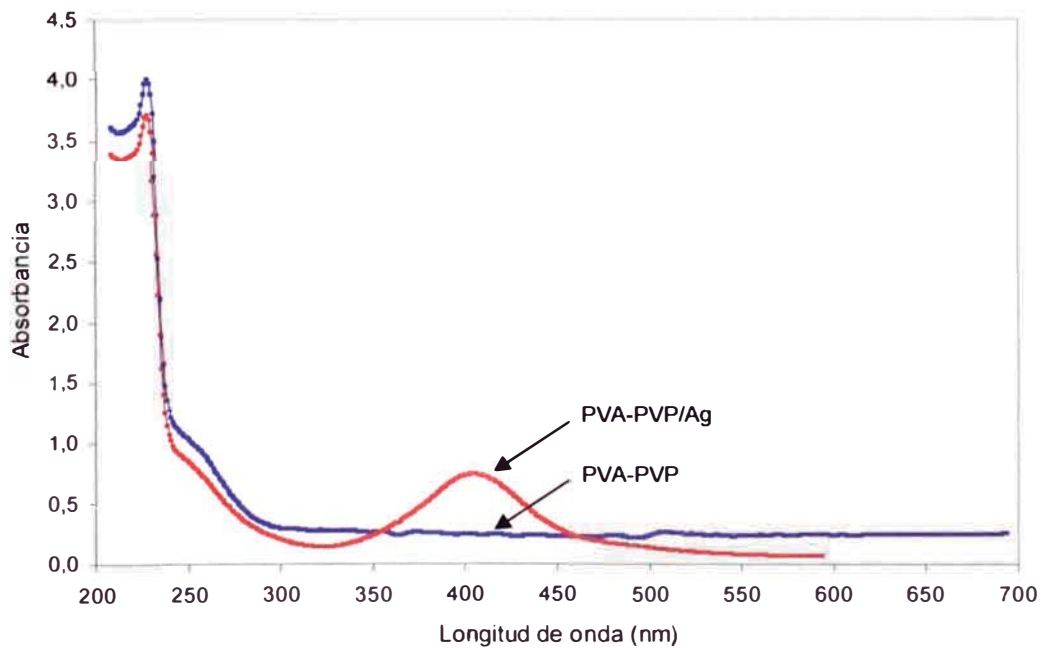


Fig. 4.34. Espectros UV-vis del hidrogel de PVA-PVP y el nanocompuesto PVA-PVP/Ag.

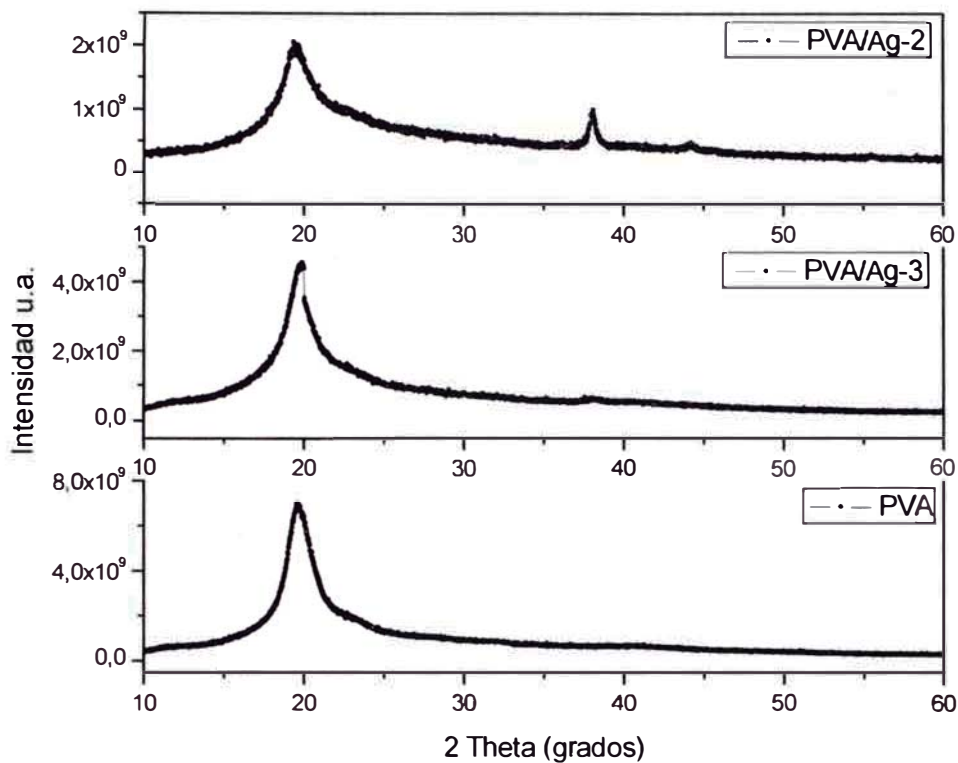


Figura 4.35. Patrones de difracción del hidrogel PVA y de los nanocompuestos PVA/Ag obtenidos utilizando AgNO_3 con concentraciones de 2×10^{-3} y 2×10^{-2} M

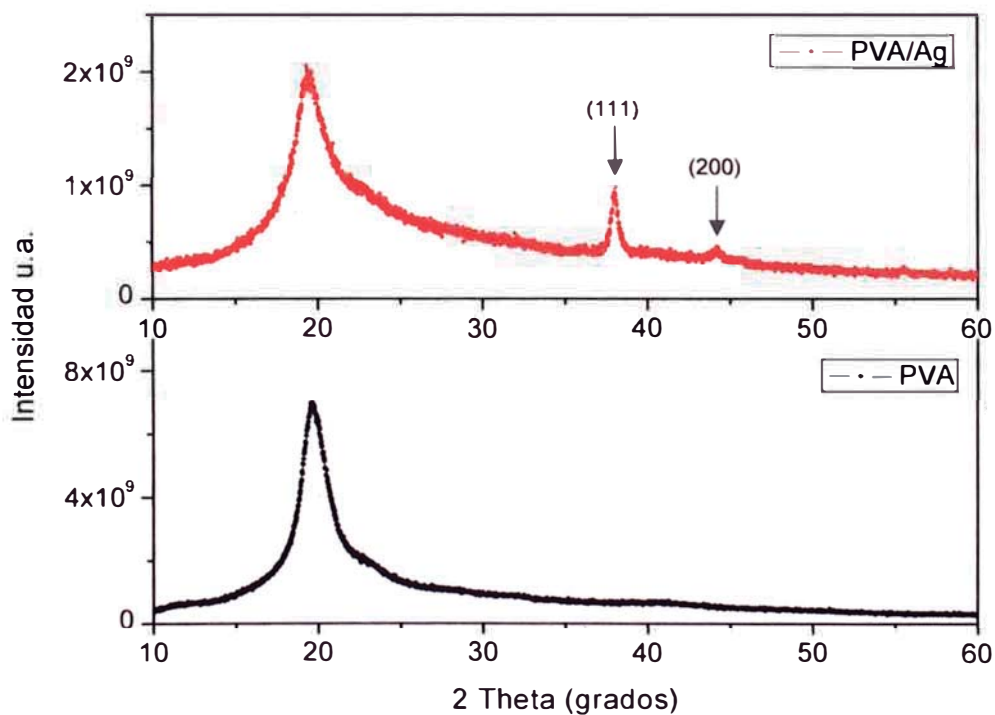


Figura 4.36. Patrones de difracción del hidrogel PVA y del nanocompuesto PVA/Ag obtenido utilizando 2×10^{-2} M de AgNO_3 .

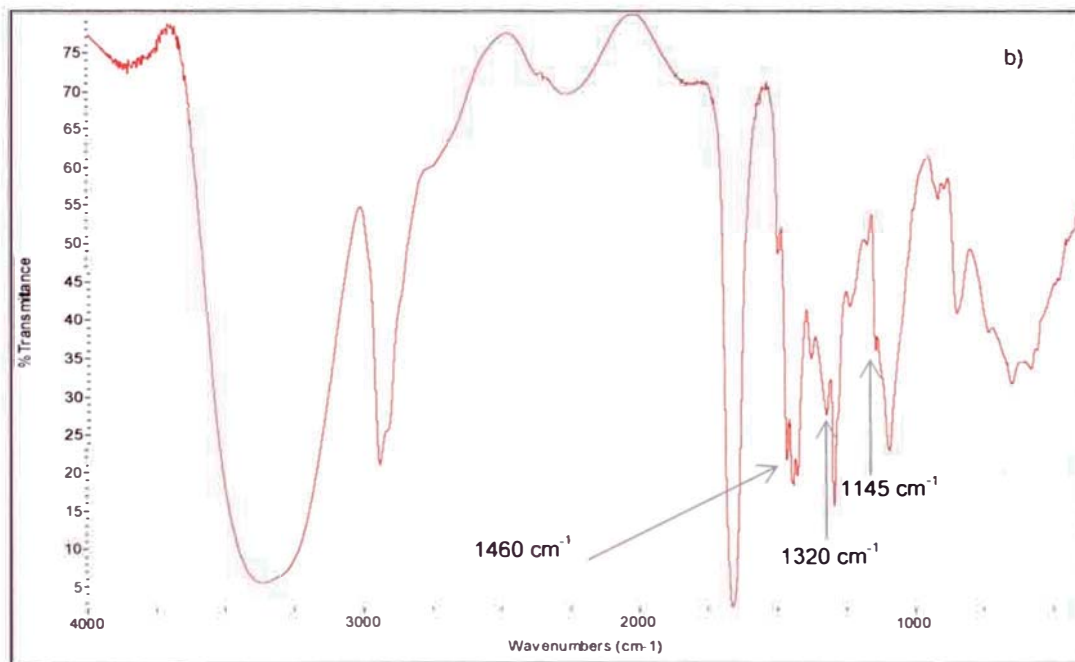
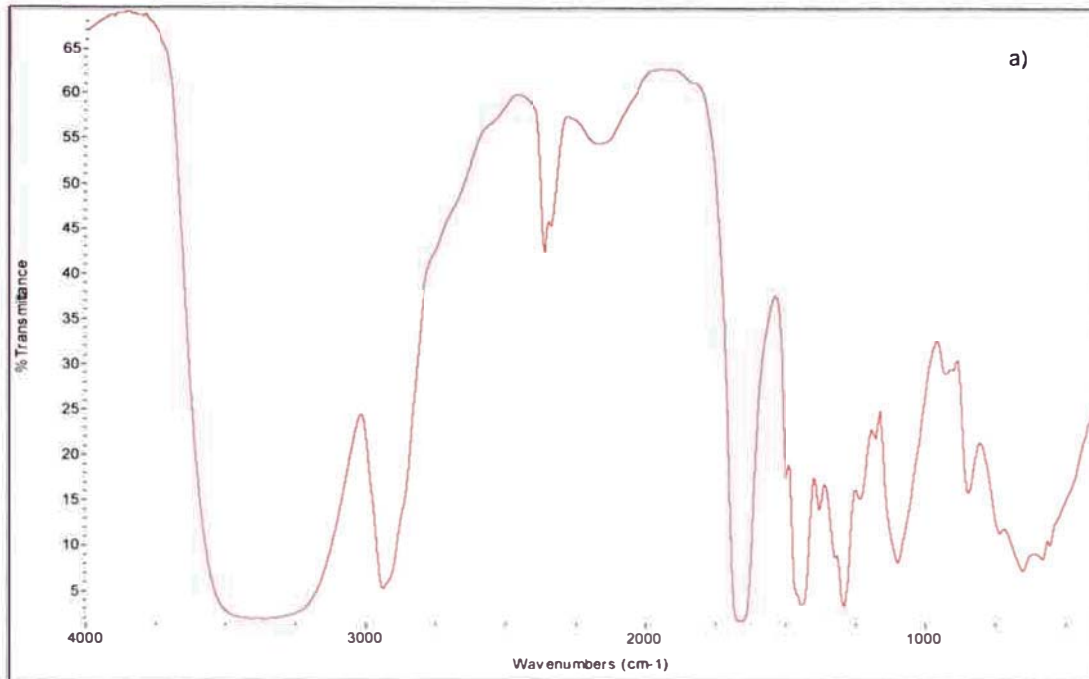


Figura 4.37. Espectros FTIR del hidrogel PVA-PVP (a) y el nanocompuesto PVA-PVP/Ag (b).

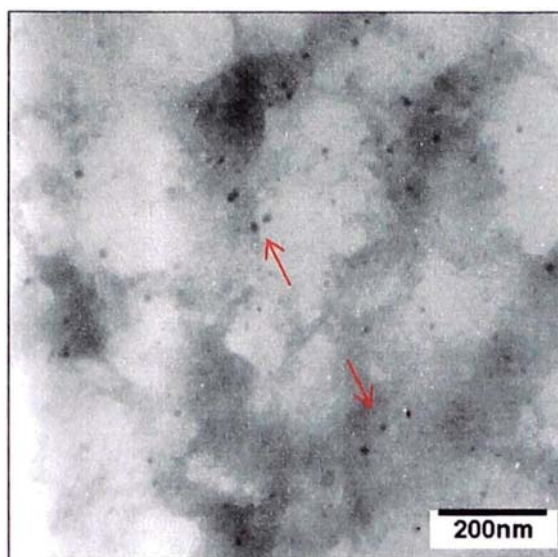


Figura 4.38. Imagen MET del nanocompuesto PVA/Ag.

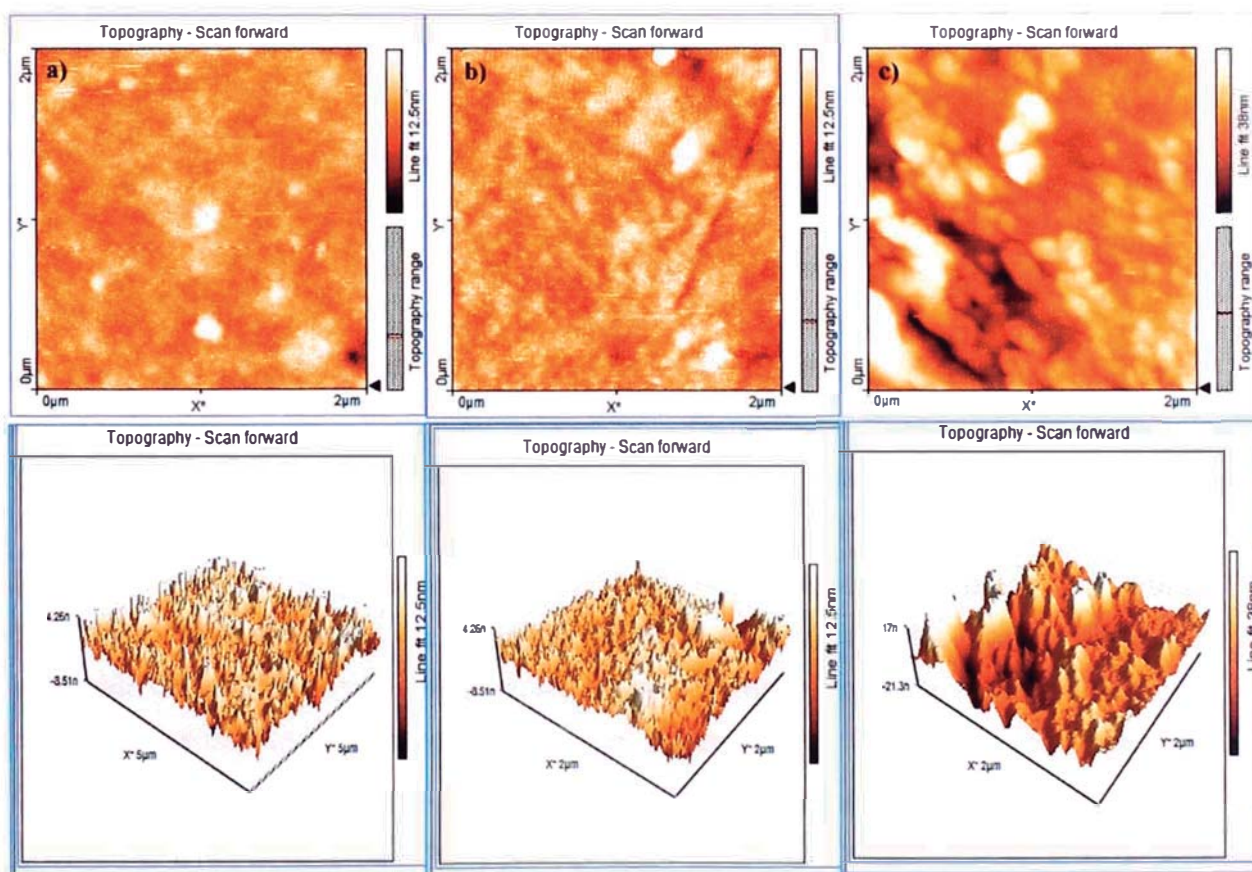


Figura 4.39. Imágenes por MFA y sus vistas en 3D de la topografía de los nanocompuestos PVA/Ag obtenidos con concentraciones de AgNO_3 de 2×10^{-4} (a), 2×10^{-3} (b) y 2×10^{-2} M (c).

4.5.1.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los nanocompuestos

Finalmente, se realizaron pruebas para evaluar la actividad antibacteriana frente a la bacteria Gram positiva *S. aureas* y frente a la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa*.

La evaluación de la actividad antibacteriana fue llevada a cabo utilizando los nanocompuestos hidrogel/Ag, tal y como se obtiene después de la irradiación de sus componentes, al cual denominaremos hidrogel fresco, así como utilizando las películas que resultaron de secar el nanocompuesto y posteriormente hincharlas en agua, al cual denominaremos hidrogel seco. Las muestras denominadas hidrogel seco se hicieron para evaluar los nanocompuestos con concentraciones de 2×10^{-3} y 2×10^{-2} M, ya que por su facilidad de manipulación, solamente la muestra con menor concentración de plata permitía evaluarla tal y cual se obtuvo luego de la irradiación. Así que a fin de poder manipular estas muestras y poder evaluar su actividad antibacteriana, se dejaron secar los hidrogeles y se utilizaron en forma de hidrogel seco. El diámetro de las películas así obtenidas fue de 13 mm en promedio. Mientras que el diámetro de las muestras ensayadas con geles frescos fue de 7 mm. La actividad antibacteriana fue evaluada principalmente en función de la concentración del precursor de plata. Como blancos para estas muestras se utilizó hidrogeles de PVA-PVP y PVA solo. Los resultados se muestran en la Figura 4.40 y 4.41 para los hidrogeles frescos y secos, respectivamente. Las medidas de los halos de inhibición (en mm) se presentan en las Tablas 4.11 y 4.12. En estas puede observarse que los nanocompuestos de PVA y PVA-PVP presentan similar comportamiento antibacteriano. Por otro lado, los hidrogeles sin plata presentan crecimiento en la zona de contacto del hidrogel con el medio de cultivo frente a *S. aureas*. En contraste, la totalidad de los hidrogeles con plata o nanocompuestos presentan zonas transparentes en la zona de contacto frente a ambas bacterias, lo cual indica la inhibición del crecimiento bacteriano. Así mismo, se han observado halos de inhibición para los nanocompuestos secos con mayor concentración de AgNO_3 . Para los otros casos los halos fueron mínimos, lo cual demuestra la dependencia de la actividad antibacteriana con la concentración de plata.

Por otro lado, al igual que lo observado en la evaluación de la actividad antibacteriana, se pudo observar que después de varios meses de sintetizadas los hidrogeles frescos hubo crecimiento de hongos en las muestra cuyas concentraciones de plata eran las mínimas, no así en las muestras que habían sido sintetizadas utilizando AgNO_3 de 2×10^{-3} M. Esto confirma que la ausencia de actividad antimicrobiana se debe a que la concentración de plata es mínima para ejercer dicha actividad. Estos datos no se han registrado cuantitativamente.

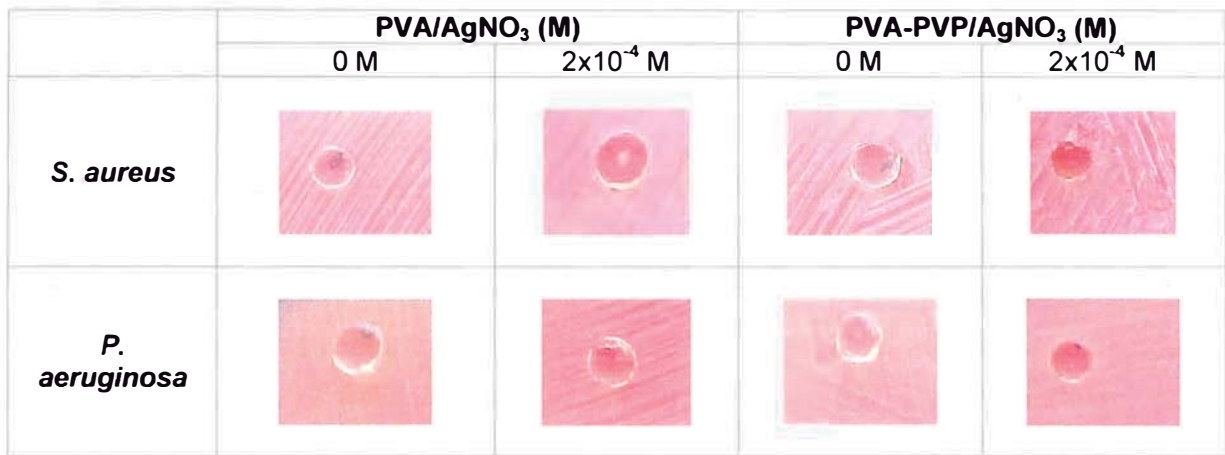


Figura 4.40. Actividad antibacteriana de hidrogeles y nanocompuestos frescos de PVA y PVA-PVP frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*

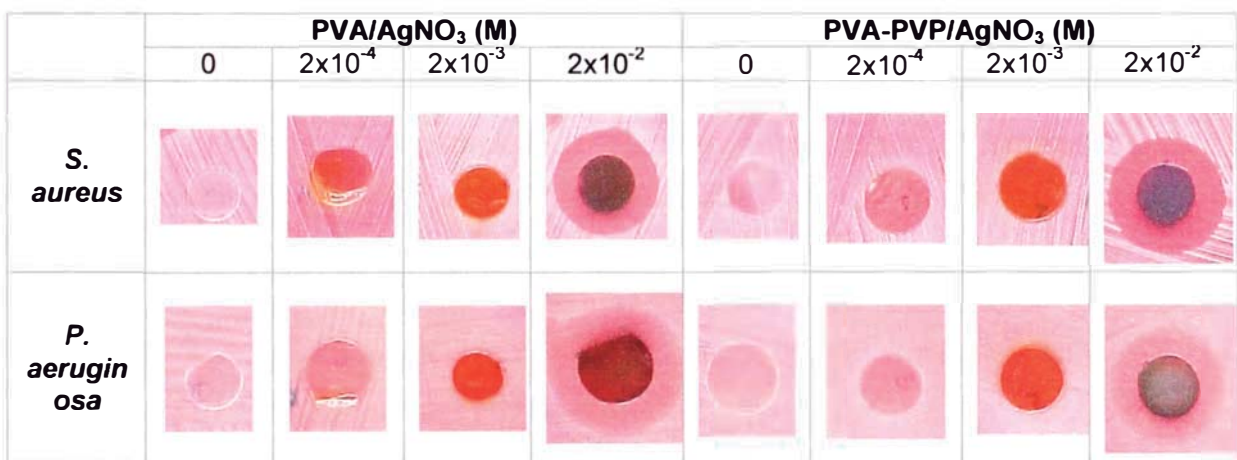


Figura 4.41. Actividad antibacteriana de hidrogeles y nanocompuestos secos de PVA y PVA-PVP obtenidos con diferentes concentraciones de AgNO₃ frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Tabla 4.11. Medidas de los halos de inhibición de hidrogeles y nanocompuestos frescos.

	PVA/AgNO ₃ (M)				PVA-PVP/AgNO ₃ (M)			
	0	2x10 ⁻⁴	2x10 ⁻³	2x10 ⁻²	0	2x10 ⁻⁴	2x10 ⁻³	2x10 ⁻²
<i>S. aureus</i>	NH*	NH	-	-	NH*	NH	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	NH	NH	-	-	NH	NH	-	-

Tabla 4.12. Medidas de los halos de inhibición (en mm) de hidrogeles y nanocompuestos secos.

	PVA/AgNO ₃ (M)				PVA-PVP/AgNO ₃ (M)			
	0	2x10 ⁻⁴	2x10 ⁻³	2x10 ⁻²	0	2x10 ⁻⁴	2x10 ⁻³	2x10 ⁻²
<i>S. aureus</i>	NH*	NH	14	26	NH*	NH	15	24
<i>P. aeruginosa</i>	NH	14	14	26	NH	14	14	23

NH: No hay halo de inhibición

*: Crecimiento de bacterias en la zona de contacto.

D_i=Diámetro de la película (mm)

4.5.2. Método II: Obtención del nanocompuesto por irradiación de hidrogeles conteniendo AgNO_3

En este método se propuso la formación de las nanopartículas de plata a partir del hinchamiento de su sal precursora en el hidrogel y su posterior reducción radiolítica. Este método es de dos irradiaciones, una para formar el hidrogel y otra para reducir la plata. Acerca de las redes tridimensionales de los hidrogeles, algunos investigadores han sugerido que el espacio libre disponible entre las redes entrecruzadas, en la representación de un hidrogel hinchado, funcionan como nanoreactores para generar nanopartículas y que estos nanoreactores ofrecen una plataforma para la nucleación y crecimiento de nanocristales, los cuales eventualmente conducen a la formación de las nanopartículas [43].

Puesto que para este método si es importante la propiedad del grado de hinchamiento, se utilizará el hidrogel de PVA-PVP que como se vio en puntos anteriores, presenta mejores propiedades de absorción de agua en comparación al hidrogel de PVA. Además, como se verá mas adelante, se pudo comprobar por espectroscopia UV-Vis que, la matriz de PVA-PVP permitiría obtener nanopartículas de menor tamaño al presentar su banda de absorbancia correspondiente a las resonancias del plasmón superficial ligeramente desplazada hacia el azul, respecto al espectro obtenido con PVA.

En una primera prueba, los nanocompuestos fueron obtenidos hinchando películas de PVA-PVP en soluciones acuosas de AgNO_3 con y sin isopropanol (Figura 4.42). Así mismo, para evaluar el efecto de la matriz en la formación de las nanopartículas se prepararon nanocompuestos usando PVA y PVA-PVP impregnados en solución acuosa de AgNO_3 2×10^{-2} M.

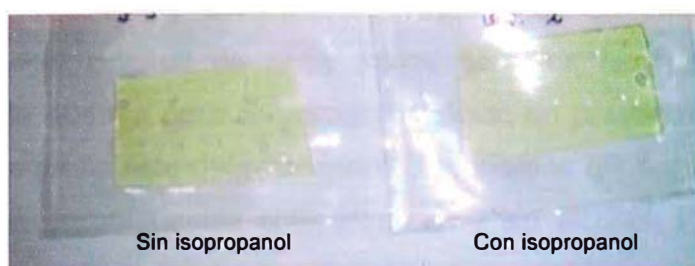


Figura 4.42. Nanocompuestos PVA-PVP/Ag obtenidos a partir del hinchamiento de sus películas en soluciones acuosas de AgNO_3 2×10^{-4} M, con y sin isopropanol.

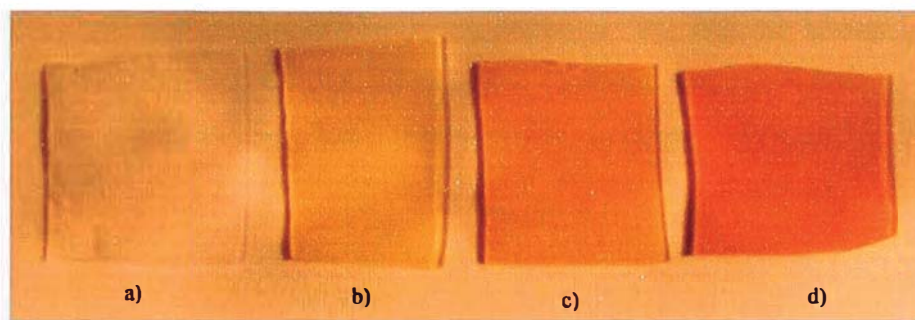


Figura 4.43. Hidrogel de PVA-PVP (a) y nanocompuestos PVA-PVP/Ag obtenidos a partir del hinchamiento de películas de PVA-PVP en soluciones acuosas de AgNO_3 2×10^{-4} (b), 2×10^{-3} (c) y 2×10^{-2} M (d)

Finalmente en una segunda etapa, luego de evaluar los resultados obtenidos en la primera prueba, se continuó trabajando con hidrogeles PVA-PVP y soluciones acuosas de AgNO_3 con concentraciones entre 2×10^{-4} y 2×10^{-2} M. Los nanocompuestos fueron caracterizados por espectroscopia UV-Vis y MFA. Finalmente, se evaluaron sus propiedades antibacterianas.

En todos los casos, antes de su irradiación los hidrogeles hinchados en soluciones acuosas de AgNO_3 son transparentes, posteriormente producto de la irradiación se obtienen hidrogeles de coloraciones amarillentas, indicando la reducción de la plata, cuya intensidad varía en función de la concentración de AgNO_3 empleada. En la Figura 4.43 se muestran los hidrogeles PVA-PVP/Ag obtenidos con distintas concentraciones de AgNO_3 .

4.5.2.1 Caracterización de los nanocompuestos

En la Figura 4.44 se muestran los espectros UV-vis de los nanocompuestos PVA-PVP/Ag obtenidos en presencia y ausencia de isopropanol. Se observa un ligerísimo desplazamiento hacia longitud de onda mayor para los hidrogeles obtenidos sin alcohol, al pasar de 404 nm para el hidrogel irradiado en presencia de alcohol a 406 nm. Siendo casi pequeño este desplazamiento, podríamos afirmar que no hay mucha diferencia en los nanocompuestos obtenidos con y sin alcohol. Por el contrario, se observó que los nanocompuestos con alcohol no son estables en el tiempo ya que se pudo apreciar que aproximadamente a las 2 semanas de obtenidos estos cambiaron de color tornándose negruscos. Al respecto, podríamos pensar que el alcohol al estar solo superficialmente en el hidrogel, no tiene una participación significativa en la reducción radiolítica de la plata, por el contrario, producto de su irradiación se generarían especies que tienden a oxidarse con el tiempo, lo cual provocaría los

cambios observados en la coloración de las películas. Por ello, en adelante se decidió prescindir del uso de isopropanol ya que por lo antes expuesto parece no aportar mayor beneficio a la síntesis de las nanopartículas de plata en la matriz PVA-PVP.

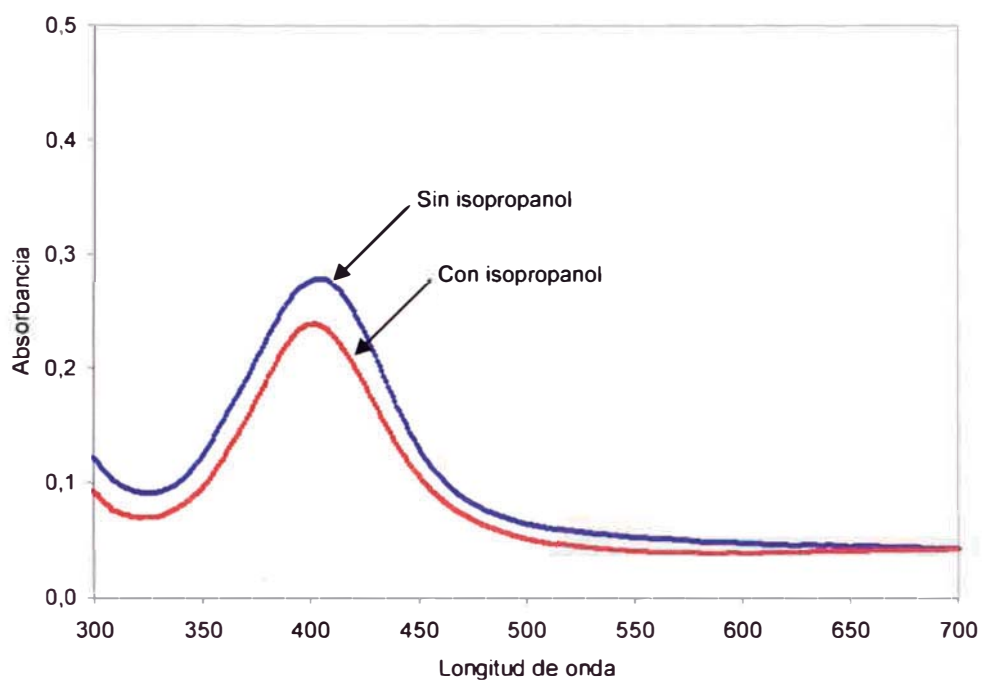


Figura 4.44. Espectros UV-vis de los nanocompuestos PVA-PVP/Ag obtenidos radiolíticamente a partir del hinchamiento de películas de PVA-PVP en soluciones acuosas de AgNO_3 2×10^{-4} M, con y sin isopropanol.

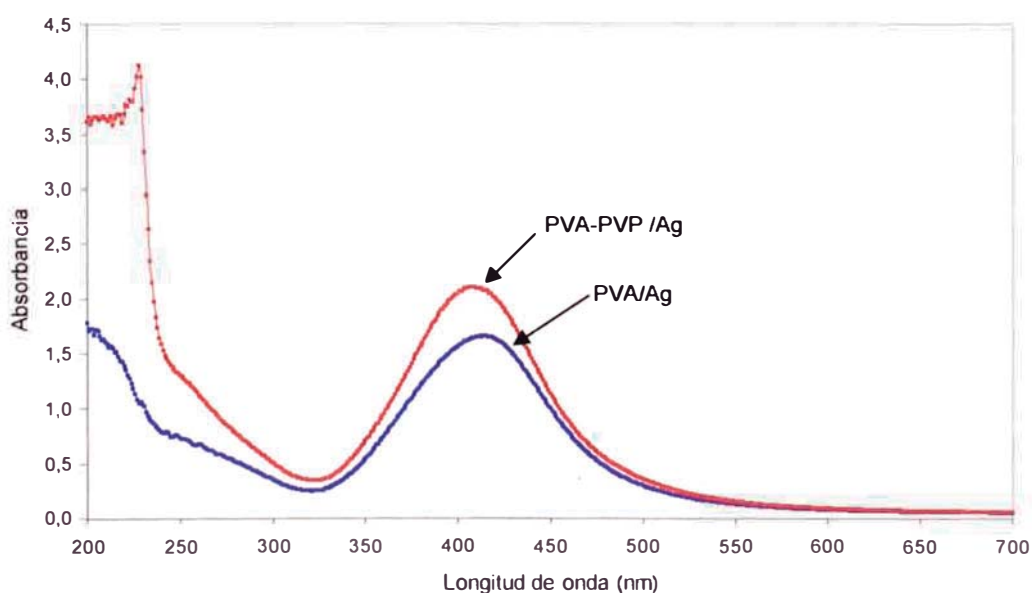


Figura 4.45. Espectros UV-vis de los nanocompuestos PVA/Ag y PVA-PVP/Ag.

Los espectros UV-Vis de los nanocompuestos obtenidos en matriz de PVA y PVA-PVP se muestran en la Figura 4.45. Los máximos de absorción, debido al efecto de la resonancia del plasmón superficial, característicos de las nanopartículas de plata están alrededor de 414 nm y 408 nm, para las matrices de PVA y PVA-PVP, respectivamente. De esto podríamos esperar que las nanopartículas presentes en la matriz de PVA-PVP sean de menor tamaño que las presentes en la matriz de PVA.

En la Figura 4.46 se observan los espectros UV-Vis de los nanocompuestos, PVA-PVP/Ag, obtenidos empleando distintas concentraciones de AgNO_3 . Como era de esperarse, la absorbancia, que esta directamente relacionada con la concentración de las nanopartículas de plata formadas, se incrementa con la concentración de AgNO_3 . Los máximos de absorción de las bandas correspondientes a las resonancias del plasmón superficial se encuentran entre 408 y 410 nm, lo cual indica que el efecto de la concentración del precursor de plata no modifica notablemente la posición de la longitud de onda máxima del nanocompuesto.

Las imágenes de la topografía de las muestras, así como una vista 3D de estas, obtenidas por MFA se muestran en la Figura 4.47, donde se aprecian superficies mas o menos uniformes, en comparación con las obtenidas con el método I.

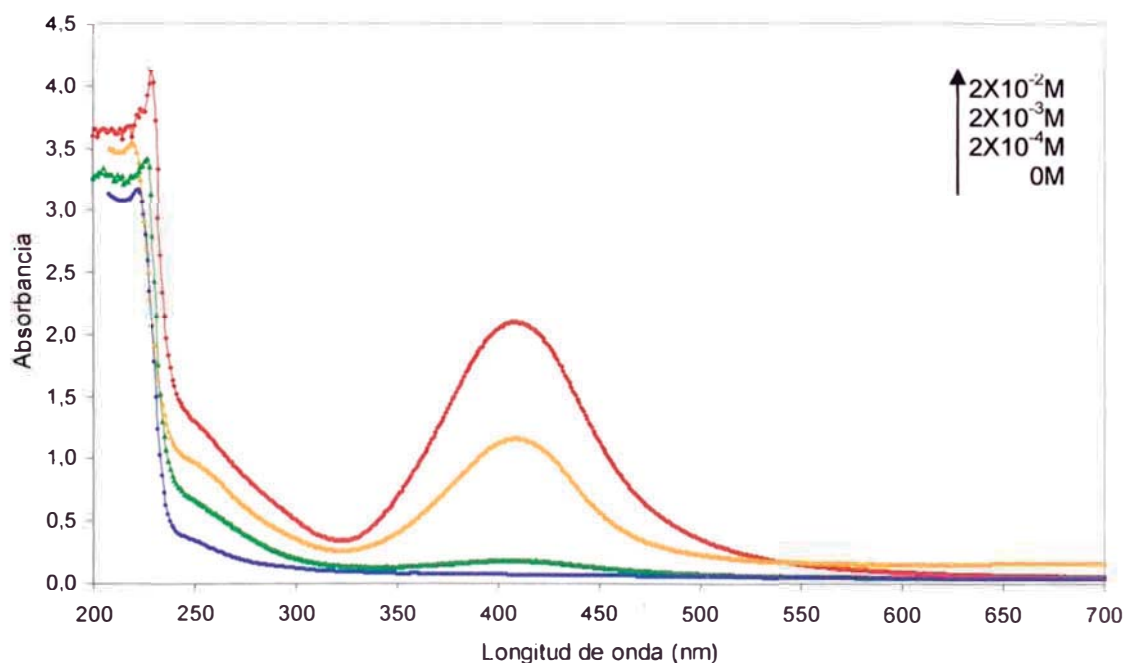


Figura 4.46. Espectros UV-Vis de los nanocompuestos PVA-PVP/Ag obtenidos a partir del hinchamiento de sus películas en soluciones acuosas de AgNO_3 0, 2×10^{-4} , 2×10^{-3} y 2×10^{-2} M.

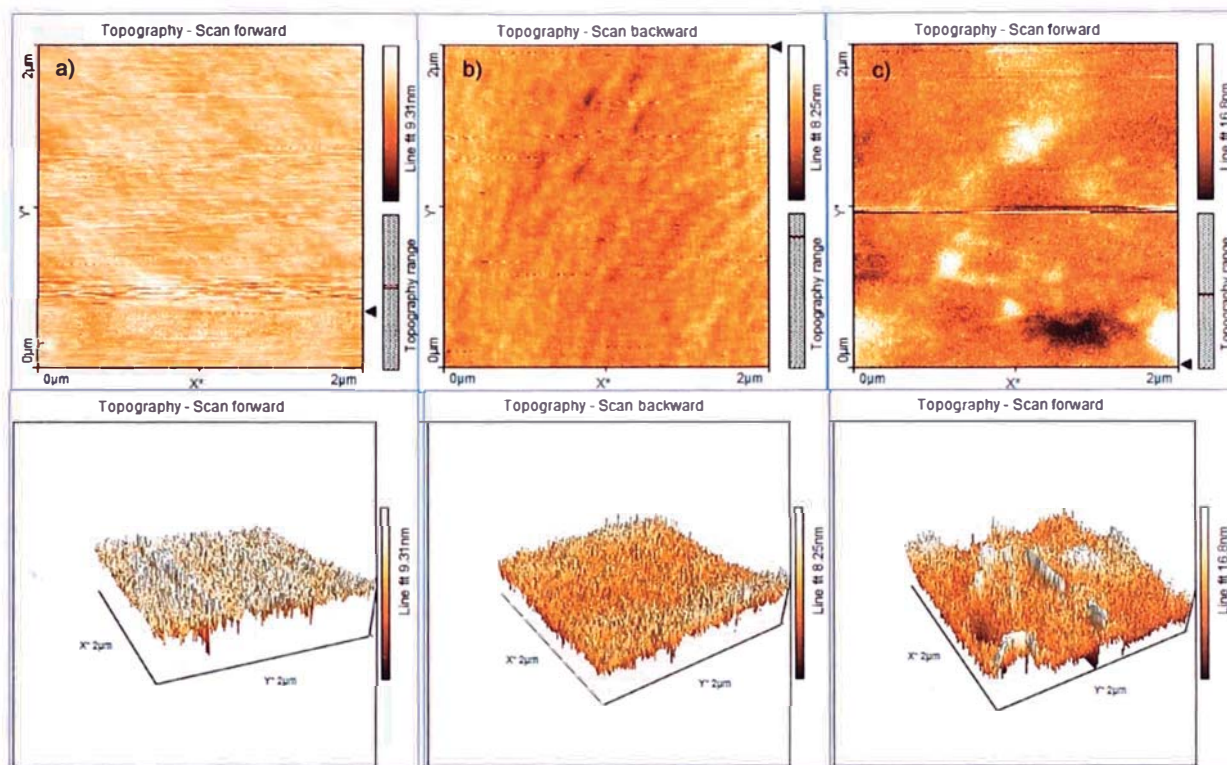


Figura 4.47. Imágenes por MFA de la topografía y vista en 3D, de los nanocompuestos PVA-PVP/Ag obtenidos con concentraciones de AgNO_3 de 2×10^{-4} (a), 2×10^{-3} (b) y 2×10^{-2} M (c).

4.5.2.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los nanocompuestos

Finalmente, se realizaron pruebas para evaluar la actividad antibacteriana frente a la bacteria Gram positiva *S. aureus* y frente a la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa*. Las películas se cortaron en círculos de 6 mm diámetro aproximadamente. Como blancos se utilizó películas de PVA-PVP hinchadas en agua. Las imágenes de la actividad antibacteriana se muestran en la Figura 4.48 y las medidas de los halos de inhibición se resumen en la Tabla 4.13.

Se ha observado que, los hidrogeles de PVA-PVP presentan crecimiento en la zona de contacto frente a *S. aureus*, mientras que presenta zonas transparente frente a *P. aeruginosa*. Por su parte, todos los nanocompuestos de PVA-PVP/Ag presentan actividad antibacteriana frente a las dos bacterias observándose mayor actividad frente a la bacteria *S. aureus*. Así mismo, la inhibición del crecimiento bacteriano está en relación con las concentraciones de plata, mayor concentración mayor inhibición del crecimiento bacteriano. Estos resultados son similares a los obtenidos con los nanocompuestos preparados por el método I y ensayados en forma de película seca.

Tabla 4.13. Medidas de los halos de inhibición (en mm) de los nanocompuestos obtenidos con diferentes concentraciones plata, frente a las 2 cepas bacterianas.

	PVA-PVP/AgNO ₃ (M)			
	0	2x10 ⁻⁴	2x10 ⁻³	2x10 ⁻²
<i>S. aureus</i>	NH*	8 D _i =6	13 D _i =6	16 D _i =6
<i>P. aeruginosa</i>	NH	8	10	11

NH: No hay halo de inhibición

* Crecimiento de bacterias en la zona de contacto

D_i: Diámetro de la película (mm)

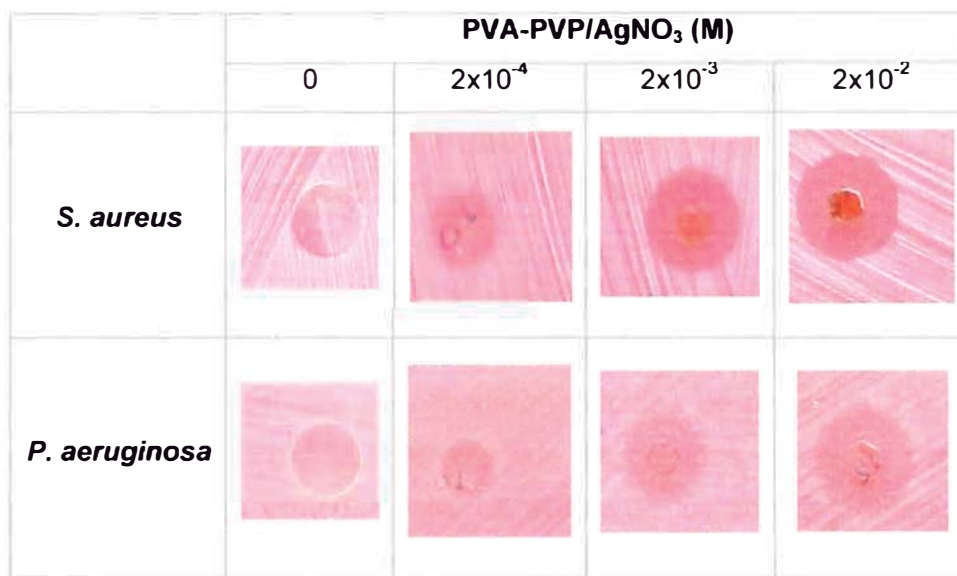


Figura 4.48. Actividad antibacteriana de los nanocompuestos PVA-PVP/Ag obtenidos con diferentes concentraciones de AgNO₃ frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*

4.5.3. Método III: Obtención del nanocompuesto por hinchamiento de hidrogeles PVA–PVP en coloides de nanopartículas de plata

En este método se impregnaron los hidrogeles en coloides conteniendo nanopartículas de plata, los cuales fueron anteriormente obtenidos. La selección de los coloides para embeber los hidrogeles se hizo en base a su estabilidad en el tiempo (observaciones de cambio de color, pH, etc), concentración de plata (expresada en función de la concentración del precursor de plata) y principalmente tamaños de partículas observados por MET. Por lo tanto, se eligieron los coloides obtenidos con PVP como estabilizador del coloide ya que con este se obtuvieron nanopartículas con tamaños más homogéneos.

Se empezó probando la actividad antibacteriana de los coloides obtenidos sin alcohol (mezclas AgNO_3 -PVP) con distintas concentraciones de polímero estabilizador del coloide. Como se observó que no hay mayores diferencias en la actividad antibacteriana de los coloides obtenidos con distintas concentraciones de polímero, se eligió al coloide obtenido con PVP al 0,5 %p/v. A continuación se evaluó la actividad de los coloides obtenidos en presencia de alcohol (0,2 y 4 M), utilizando concentraciones de AgNO_3 de 2×10^{-2} y 2×10^{-4} M.

Teniendo en cuenta las formas de las partículas observadas en los coloides obtenidos con PVA, se evaluó también la actividad antibacteriana de aquellos donde se obtuvieron nanovarillas, así como aquel coloide con el que se obtuvieron las nanopartículas de menor tamaño (18 nm) ya que algunos investigadores refieren que la interacción de las nanopartículas y los microorganismos depende no solo del tamaño de las nanopartículas sino también de la forma [63].

Por otro lado, mediciones del pH de los coloides mostraron que estos presentaban pHs ácidos y que éste dependía de las concentraciones de AgNO_3 empleadas en la síntesis del coloide. Es así que se obtuvieron coloides de pH entre 3 y 4 para los obtenidos con AgNO_3 2×10^{-2} M, mientras que los coloides obtenidos con 2×10^{-4} M presentaron un pH 6 aproximadamente. La acidez de los coloides obtenidos podría atribuirse a los H^+ que se generan en el proceso de reducción de la plata por los radicales isopropanol, como se muestran en las ecuaciones 2.19 y 2.20. Por lo cual, a fin de descartar la inhibición del crecimiento bacteriano debido al pH se hicieron pruebas utilizando HNO_3 con pH alrededor de 3.

En la Figura 4.49 Se muestran los hidrogeles obtenidos luego de ser impregnados en los coloides de plata y en la Figura 4.50 se observan como quedan las muestras al secarse, en estas últimas podemos ver la formación de una especie de recubrimiento dorado producto del secado. Lo cual es totalmente distinto a lo observado en los nanocompuestos obtenidos por los anteriores métodos. Al respecto, podemos pensar que este recubrimiento dorado se debería a la presencia de gran cantidad de nanopartículas en la superficie del hidrogel, las cuales, por la naturaleza del método, han quedado mayormente concentradas en la superficie.

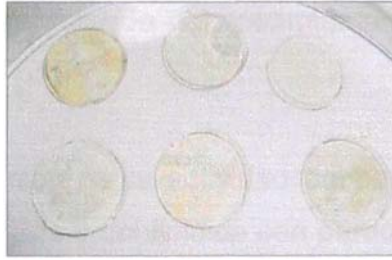


Figura 4.49. Hidrogeles PVA-PVP impregnados en coloides conteniendo nanoparticulas de plata

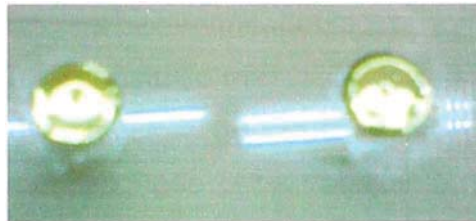


Figura 4.50. Muestras secas de los hidrogeles PVA-PVP impregnados en coloides conteniendo nanoparticulas de plata.

Al igual que para los anteriores casos, las muestras fueron caracterizadas por espectroscopia UV-Vis y MFA. La valuación de la actividad antibacteriana se realizó frente a tres bacterias, las dos anteriormente empleadas y además la bacteria Gram negativa *E. coli*.

4.5.3.1 Evaluación de la actividad antibacteriana de los coloides

La evaluación de la actividad antibacteriana de los coloides se hizo teniendo en cuenta las concentraciones de plata (expresada en función de la concentración del precursor).

En la Figura 4.51 se muestran las imágenes de la actividad antibacteriana de los coloides obtenidos utilizando AgNO_3 2×10^{-4} M, PVP al 0,5% e isopropanol (0; 0,2 y 4 M) y en la Figura 4.52 se muestran los resultados para los coloides obtenidos en las mismas condiciones pero con AgNO_3 2×10^{-2} M. Como se aprecia en las imágenes los coloides obtenidos con la menor concentración del precursor de plata, los halos de inhibición presentan diámetros mínimos o nulos; mientras que los halos de inhibición de los coloides obtenidos con AgNO_3 2×10^{-2} M presentan mayor diámetro frente a las tres bacterias probadas. Las medidas de los halos es mayor para la bacteria *S. aureus* y disminuye para las bacterias Gram negativa, siendo frente a *E. coli* donde se observan los halos de inhibición de menor dimensión, lo cual indicaría que la acción bactericida de las nanoparticulas es más eficiente para la bacteria Gram positiva. Las

dimensiones de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano se muestran en la Tabla 4.14.

Los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana del coloide con PVA donde se obtuvieron nanovarillas y del coloide con partículas de tamaños alrededor de 18 nm se muestran en la Figura 4.53. Las dimensiones de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano son muy similares a los obtenidos con los coloides con PVP, con lo cual, podemos decir que macroscópicamente, no se ha observado diferencia significativa en la actividad antibacteriana debido al tamaño y las formas de las nanopartículas. Sin embargo un estudio microscópico a fin de evaluar el daño en las paredes celulares sí podría mostrar la influencia del tamaño y formas de las nanopartículas, como lo han reportado otros trabajos [63]. Por otro lado, en ambos casos, es muy notorio el efecto de la concentración de la plata, observándose que la inhibición bacteriana esta en relación directa con ésta.

Finalmente, se hicieron observaciones de los halos a las 96 horas, estas mostraron que los halos presentes frente a la bacteria *S. aureus*, se mantienen inclusive a las 96 horas, lo que no se observa frente a la bacteria *P. aeruginosa* en donde se ha observado crecimiento de colonias en la zona de inhibición y por consiguiente una disminución en la dimensión del halo (Figura 4.54). Como control se ha usado, el antibiótico imipenem, el cual presentó un halo de 24 mm, encontrándose dentro de las especificaciones de la NCCLS.

Por lo tanto, después de haber evaluado los resultados obtenidos, para la formación del nanocompuesto se emplearan únicamente aquellos coloides obtenidos con PVP como estabilizador del coloide.










	Coloides obtenidos con AgNO_3 2×10^{-4} M, PVP al 0,5% e isopropanol		
	0 M	0,2 M	4 M
<i>S. aureus</i>			
<i>P. aeruginosa</i>			
<i>E. coli</i>			

Figura 4.51. Evaluación de la actividad antibacteriana de los coloides obtenidos a partir de la irradiación de las mezclas AgNO_3 2×10^{-4} M, PVP al 0.5% e isopropanol 0; 0,2 y 4 M.




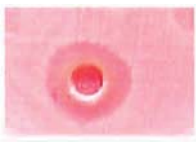





	Coloides obtenidos con AgNO_3 2×10^{-2} M, PVP al 0,5% e isopropanol		
	0 M	0,2 M	4 M
<i>S. aureus</i>			
<i>P. aeruginosa</i>			
<i>E. coli</i>			

Figura 4.52. Evaluación de la actividad antibacteriana de los coloides obtenidos a partir de la irradiación de las mezclas AgNO_3 2×10^{-2} M, PVP al 0.5% e isopropanol 0, 0.2 y 4 M.

Tabla 4.14. Dimensión de los halos de inhibición (en mm) de las soluciones coloidales de nanopartículas de plata frente a las cepas bacterianas

	Coloides obtenidos con PVP, AgNO_3 2×10^{-4} M e isopropanol			Coloides obtenidos con PVP, AgNO_3 2×10^{-2} M e isopropanol			Coloides obtenidos con PVA	
	0 M	0,2 M	4 M	0 M	0,2 M	4 M	nanopartículas	nanovarillas
<i>S. aureus</i>	12	11	9	23	22	30	12	22
<i>P. aeruginosa</i>	11	10	NH	20	17	23	-	-
<i>E. coli</i>	NH	NH	NH	15	13	23	-	-

NH = No hay halo

Dimensión del pozo = 8 mm

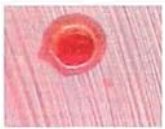
	Coloides obtenidos con PVA	
	Nanopartículas con AgNO_3 2×10^{-4} M	Nanovarillas con AgNO_3 2×10^{-2} M
<i>S. aureus</i>		

Figura 4.53. Evaluación de la actividad antibacteriana de los coloides obtenidos a partir de la irradiación de las mezclas AgNO_3 2×10^{-2} M, PVA al 1% e isopropanol 0.2 M, (nanovarillas), y AgNO_3 2×10^{-4} M, PVA al 0.5% e isopropanol 0.2 M (nanopartículas).

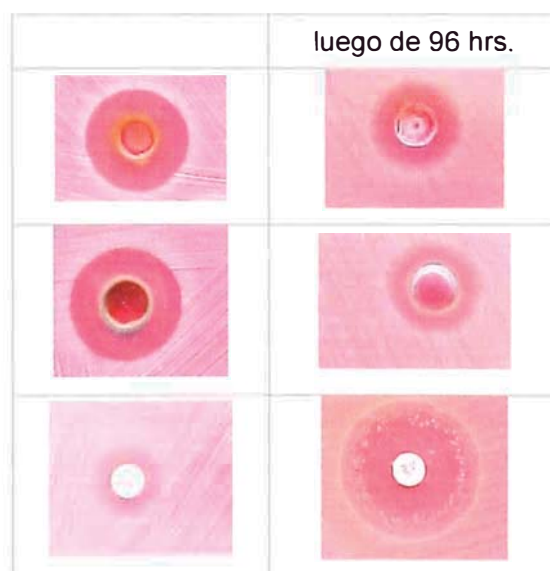


Figura 4.54. Evaluación de la actividad antibacteriana de algunos coloides luego de 96 horas frente a *P. aeruginosa*.

4.5.3.2 Caracterización de los nanocompuestos

En la Figura 4.55 se muestran los espectros UV-Vis del hidrogel impregnado con el coloide así como el del coloide. El espectro de absorción del hidrogel hinchado en el coloide muestra una banda de absorción del plasmón superficial alrededor de 418 nm, el cual estaría desplazado hacia el rojo comparado con la banda del coloide primario (408 nm) el cual en la figura se observa incompleto debido a su alta absorbancia frente al nanocompuesto. Al respecto del desplazamiento de la longitud de onda de absorbancia máxima podemos pensar que este se debe a que las nanopartículas se han aglomerado al introducirse al hidrogel.

En la Figura 4.56 se muestran las imágenes de la topografía de un hidrogel hinchados en un coloide con nanopartículas de plata (Figura 4.56). En ella se aprecia una superficie bastante rugosa, similar a lo observado en los nanocompuestos obtenidos por el método I.

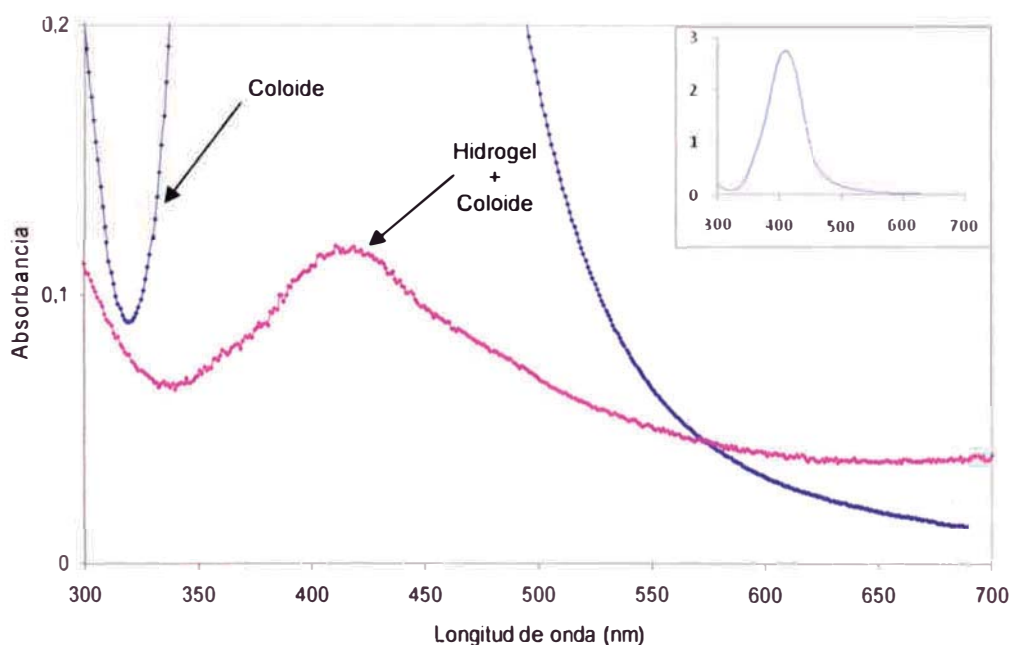


Figura 4.55. Espectros UV-Visible del coloide de nanopartículas de plata y del hidrogel PVA-PVP hinchado en el coloide. En la esquina superior derecha se muestra el espectro completo del coloide.

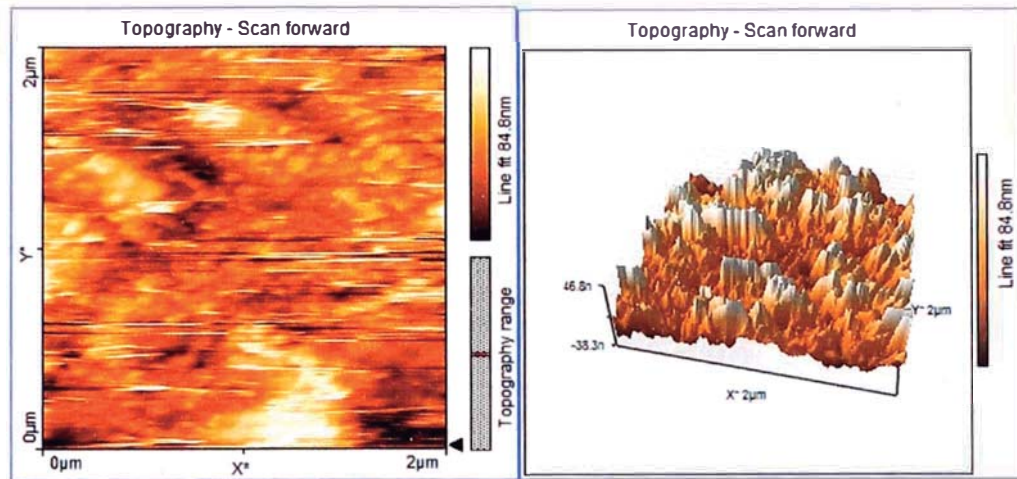


Figura 4.56. Imágenes por MFA de la topografía de los nanocompuestos PVA-PVP/Ag obtenidos al impregnar el hidrogel en una solución coloidal de nanopartículas de plata.

4.5.3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana de los nanocompuestos

Luego de evaluar la actividad antibacteriana de los coloides, se procedió a evaluar la actividad antibacteriana de los hidrogeles PVA-PVP impregnados en los coloides obtenidos con PVP como estabilizador del coloide. Como blancos se utilizó películas PVA-PVP hinchadas en agua.

Como puede observarse de la Figura 4.57 no hubo formación de halos de inhibición para ninguno de los hidrogeles impregnados en los coloides obtenidos con la más baja concentración de plata, éstos se comportaron como si fueran hidrogeles solos. Mientras que los hidrogeles hinchados en los coloides obtenidos con la mayor concentración de plata (Figura 4.58) presenta actividad antibacteriana frente a las tres bacterias, lo cual se evidencia por la formación de halos de inhibición, los mismos que, al igual que en el coloide, son de mayor diámetro frente a la bacteria Gram positiva y de menor dimensión para las bacterias Gram negativa, siendo frente a *E. coli* para la que se observan los diámetros mas pequeños, Tabla 4.15. Por otro lado, los bordes de los halos son homogéneos para todos los casos, a diferencia de lo observado en algunos coloides, debido probablemente a la difusión del alcohol presente en el coloide lo cual deformaría el halo, sin embargo este inconveniente se evita al utilizar el hidrogel como matriz para contener las nanopartículas.













	Hidrogel PVA-PVP	Hidrogeles impregnados con los coloides obtenidos con $\text{AgNO}_3 \ 2 \times 10^{-4} \ \text{M}$, PVP al 0,5% e isopropanol		
		0 M	0,2 M	4 M
<i>S. aureus</i>				
<i>P. aeruginosa</i>				
<i>E. coli</i>				

Figura 4.57. Actividad antibacteriana de los hidrogeles PVA-PVP y los nanocompuestos hidrogel/Ag obtenidos al impregnar los hidrogeles en los coloides obtenidos a partir de las mezclas de $\text{AgNO}_3 \ 2 \times 10^{-4} \ \text{M}$, PVP al 0.5% e isopropanol 0; 0,2 y 4 M.













	Hidrogel PVA-PVP	Hidrogeles impregnados con los coloides obtenidos con $\text{AgNO}_3 \ 2 \times 10^{-2} \ \text{M}$, PVP al 0,5% e isopropanol		
		0 M	0.2 M	4 M
<i>S. aureus</i>				
<i>P. aeruginosa</i>				
<i>E. coli</i>				

Figura 4.58. Actividad antibacteriana de los hidrogeles PVA-PVP y los nanocompuestos hidrogel/Ag obtenidos al impregnar los hidrogeles en coloides obtenidos a partir de las mezclas de $\text{AgNO}_3 \ 2 \times 10^{-2} \ \text{M}$, PVP al 0.5% e isopropanol 0; 0,2 y 4 M.

Tabla 4.15. Dimensión de halos de inhibición (en mm) de películas embebidas en soluciones coloidales de nanopartículas de plata frente a las cepas bacterianas.

	Hidrogel PVA-PVP	Hidrogeles impregnados con los coloides obtenidos con AgNO_3 2×10^{-4} M, PVP al 0,5% e isopropanol			Hidrogeles impregnados con los coloides obtenidos con AgNO_3 2×10^{-2} M, PVP al 0,5% e isopropanol		
		0 M	0,2 M	4 M	0 $D_i=14$	0,2 M $D_i=14$	4 M $D_i=14$
<i>S. aureus</i>	NH*	NH*	NH*	NH*	21	21	21
<i>P. aeruginosa</i>	NH	NH*	NH*	NH	19	20	20
<i>E. coli</i>	NH	NH	NH	NH*	-	19	18

NH: No hay halo de inhibición

* Crecimiento de bacterias en la zona de contacto

D_i : Diámetro de la película (mm)

Finalmente, a fin de evaluar el efecto de las condiciones ácidas de los coloides en la actividad antibacteriana, se hizo una prueba empleando HNO_3 con un pH similar al de los coloides (pH = 3) y también empleando un hidrogel impregnado en esta solución. Como se observa en la Figura 4.59 no se observó inhibición en el crecimiento bacteriano, lo cual nos permite establecer que no son las condiciones ácidas del medio las que determinan la actividad antibacteriana si no los compuestos preparados con nanopartículas de plata.

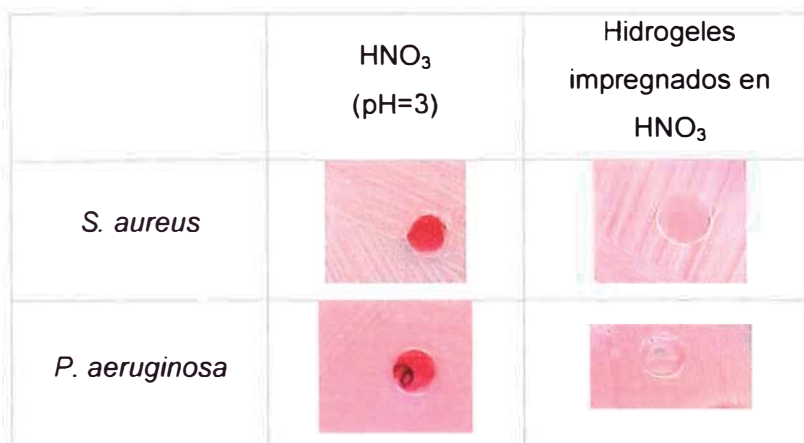


Figura 4.59. Evaluación de la actividad antibacteriana de una solución de HNO_3 de pH 3 y de hidrogeles impregnados en esta solución.

Los mecanismos a través de los cuales las nanopartículas de plata manifiestan propiedades antibacterianas son solo parcialmente entendidos. Al respecto se han hecho diversos estudios para tratar de entender el mecanismo principal de tal acción antimicrobiana. Algunos investigadores sugieren que plata iónica interactuaría fuertemente con los grupos thiol de enzimas vitales inactivándolas [77,78]. Otras

evidencias experimentales sugieren que el ADN pierde su capacidad de replicación una vez que la bacteria ha sido tratada con iones plata [29]. Otros estudios han mostrado evidencias de cambios estructurales en la membrana celular así como la formación de pequeños gránulos formados por plata y azufre [29, 79]. Otros investigadores sugieren que el mecanismo principal por el cual las nanopartículas manifiestan propiedades antibacterianas es por anclaje y penetración de la pared celular de las bacterias. Las nanopartículas actuarían de tres modos contra la bacteria Gram negativa: (1) las nanopartículas, principalmente en el rango de 1-10 nm atacan a la superficie de la membrana celular y perturban drásticamente sus funciones, como la permeabilidad, respiración, (2) ellas son capaces de penetrar dentro de la bacteria y causar futuros daños posiblemente por interacción con compuestos que contienen azufre y fósforo tales como el ADN, (3) las nanopartículas liberan iones de plata, los cuales tienen una contribución adicional al efecto bactericida de las nanopartículas de plata [29].

Se debe, además, mencionar que el efecto antibacterial de las nanopartículas es independiente de la adquisición de resistencia por la bacteria contra los antibióticos. Sin embargo, se deben realizar futuros estudios para verificar si la bacteria desarrolla resistencia hacia las nanopartículas y examinar su citotoxicidad hacia células humanas antes de garantizar su uso terapéutico.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Respecto a los hidrogeles

- Se han obtenido hidrogeles de PVA y PVA-PVP, por entrecruzamiento por radiación gamma, con buenas propiedades de transparencia, adhesividad a la piel y mecánicamente resistentes a la manipulación.
- Los hidrogeles obtenidos a partir de la mezcla PVA-PVP presentaron mayores grados de hinchamiento que el obtenido a partir de PVA puro, hasta de 1000 y 400%, respectivamente. Así mismo, en los hidrogeles PVA-PVP se observó que el grado de hinchamiento disminuye a medida que se incrementa la concentración de PVA en la mezcla.
- Las observaciones cualitativas de la resistencia mecánica de los hidrogeles mostraron que las muestras que presentan concentraciones totales de PVA iguales o ligeramente superiores que las de PVP presentan mejor resistencia al estiramiento.
- Los espectros obtenidos por las distintas técnicas de caracterización empleados fueron importantes en cuanto permitió conocer las propiedades espectroscópicas del hidrogel que nos servirá como matriz para contener nanopartículas de plata.

5.2. Respecto a los coloides de nanopartículas de plata obtenidos utilizando PVP como estabilizador del coloide

- Fue posible obtener nanopartículas a partir de soluciones acuosas de AgNO_3 y PVP sin necesidad de agregar isopropanol como removedor de radicales OH. Las nanopartículas así obtenidas presentan un máximo de absorbancia entre 414 y 420 nm y esta se incrementa proporcional a la concentración de PVP. Por otro lado, los análisis por MET mostraron nanopartículas de tamaños entre 10 y 70 nm de formas esféricas y hexagonales, cuya dispersión mejora al incrementarse la concentración del polímero. Mientras que los análisis por difracción de electrones muestran que las partículas formadas corresponderían a Ag acompañada de óxidos.
- Sin embargo, la presencia del isopropanol, en cantidades adecuadas, permitió obtener nanopartículas de tamaños homogéneos, con una dispersión más

estrecha de los tamaños de partículas (~ 25 nm) y cuyos patrones de difracción de electrones confirman que se trataría de plata metálica principalmente.

5.3. Respecto a los coloides de nanopartículas de plata obtenidos utilizando PVA como polímero estabilizador del coloide

- Se han obtenido nanopartículas y nanovarillas de plata y sus óxidos a partir de la irradiación de soluciones acuosas de AgNO_3 -PVA y AgNO_3 -PVA-isopropanol. Para la mayoría de los casos los tamaños de las nanopartículas fueron muy dispersos y con poca homogeneidad.
- Las formaciones tipo nanovarillas se vieron favorecidas para mezclas donde se empleó PVA al 1 %p/v.
- Se ha comprobado que la forma de los espectros ópticos, obtenidos por espectroscopia UV-Vis, se debe a la contribución de las diferentes formas (nanoesferas, nanohexágonos, nanovarillas, etc), y tamaños de las nanopartículas lo cual concuerda con las observaciones por MET.
- La coloración del coloide también estaría asociada a la forma y tamaños de partículas, ya que se ha observado que coloides amarillentos consistirían principalmente de nanopartículas esféricas, colores cafés amarillentos indicarían la presencia de nanopartículas de formas triangulares y hexagonales y finalmente, coloides rojizos indicarían la presencia de nanovarillas.

5.4. Respecto al uso de alcohol en la síntesis de las nanopartículas

- La presencia de alcohol en exceso (2 - 6 M) parece no influir negativamente en la actividad antibacteriana de los coloides así obtenidos, por lo que no habría ningún inconveniente en sintetizar nanopartículas de plata en exceso de alcohol. Por el contrario, como se ha mostrado en el presente trabajo, esto favorece la formación de nanopartículas de menor tamaño y con una distribución de tamaños bastante estrecha.

5.5. Respecto a los nanocompuestos Hidrogel/Ag

- Se han obtenido nanocompuestos PVA/Ag y PVA-PVP/Ag incorporando nanopartículas de plata por tres métodos diferentes. Las películas conteniendo nanopartículas de plata obtenidos fueron de color café amarillento y amarillo tenue, dependiendo de la concentración de plata en la matriz, a diferencia de

los hidrogeles sin nanopartículas de plata que son transparentes. Los nanocompuestos obtenidos, en su mayoría, fueron mecánicamente estables ya que permiten su manipulación sin dificultad.

- Por el método I fue posible la obtención de nanocompuestos hidrogel/Ag sólo para el caso donde se trabajó con mezclas de soluciones acuosas de AgNO_3 y los polímeros en ausencia de alcohol, así mismo, el entrecruzamiento de los polímeros, fue posible sólo para concentraciones de AgNO_3 menores a 2×10^{-2} M. Por lo cual, se observó que tanto la presencia de isopropanol como el incremento de la concentración de AgNO_3 , por encima del valor antes indicado, influyen negativamente a la gelificación de los polímeros formadores del hidrogel. Finalmente, los nanocompuestos obtenidos fueron, en su mayoría, inestables mecánicamente, debido a la pobre gelificación.
- El método II permitió obtener el nanocompuesto hidrogel/Ag por impregnación del precursor de plata en la matriz polimérica en estado sólido, seguida de la reducción radiolítica del precursor. En éste método se observó que el alcohol no tiene mayor trascendencia en la formación de nanopartículas, por el contrario los nanocompuestos obtenidos empleando alcohol no son estables en el tiempo ya que cambian de coloración. Los espectros obtenidos por espectroscopia UV-vis no mostraron diferencias significativas en los hidrogeles obtenidos con o sin alcohol.
- El método III, consistió en la obtención del nanocompuesto por impregnación del hidrogel en soluciones coloidales de nanopartículas de plata. La estabilidad de las propiedades mecánicas del hidrogel, evaluadas cualitativamente por su facilidad y resistencia a la manipulación, están definidas únicamente por la matriz, ya que la impregnación de ésta en el coloide no modifica las propiedades mecánicas del hidrogel. Este es un método sencillo, sin embargo, al secarse los nanocompuesto se ha observado la formación de una capa dorada, lo cual podría indicar la presencia de gran cantidad de nanopartículas en la superficie del hidrogel, las cuales, por la naturaleza del método, se habrían concentrado preferentemente en la superficie.
- De los tres métodos evaluados podemos proponer el método II como el óptimo para la obtención del nanocompuesto Hidrogel/Ag ya que como vimos es de fácil obtención. Así mismo, respecto a los otros dos métodos, su estabilidad sería mejor en cuanto al alojamiento de las nanopartículas de plata, ya que los nanocompuestos obtenidos por el método III se secan fácilmente y lo hacen formando una capa dorada sobre el hidrogel y en cuanto al nanocompuesto

obtenido por el método I, se ha visto que su formación estaría limitada por la concentración de plata que se emplee.

5.6. Respecto a la irradiación gamma

- El uso de radiación gamma ha permitido obtener coloides de nanopartículas de plata de características diferentes. Este método de reducción de los iones Ag^+ inducido por radiación es un método sencillo y ha proporcionado nanopartículas con una distribución de tamaños estrecha. Así mismo, se ha demostrado la dependencia de la dosis de irradiación en el rendimiento de la formación de las nanopartículas debido probablemente a que con el incremento de la dosis de irradiación, también se incrementa la generación de especies reactivas que participan en los procesos de reducción de los iones de plata, favoreciendo un mejor rendimiento en la formación de las nanopartículas como lo muestran los espectros obtenidos por espectroscopia UV-Vis. Así mismo, las imágenes obtenidas por MET muestran nanopartículas con distribución de tamaño más homogénea al utilizar dosis mayores a 5 kGy.
- El uso de la radiación gamma para la formación y modificación de hidrogeles ha permitido obtener materiales con buenas propiedades mecánicas (medidas cualitativas). Por otro lado, siendo principalmente las especies reactivas generadas por la radiólisis del agua, las encargadas de llevar a cabo los procesos que conllevan a la formación del hidrogel y el nanocompuesto hidrogel/Ag, se asegura la obtención de un producto no contaminado con residuos de iniciadores tóxicos que se suelen utilizar en los procesos químicos. Así mismo, el empleo de esta técnica garantiza un producto estéril, ya que el producto obtenido queda esterilizado en el mismo proceso de fabricación.

5.7. Respecto a la actividad antibacteriana de los coloides y los nanocompuestos Hidrogel/Ag

- Los coloides y películas conteniendo nanopartículas de plata presentan actividad antimicrobiana frente a las cepas bacterianas *S. aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Se ha demostrado que la actividad antimicrobiana es debida a la presencia de las nanopartículas de plata y que esta es fuertemente influenciada por la concentración de plata, ya que los diámetros de los halos de inhibición es mayor a medida que se incrementa la concentración de plata.

- Así mismo, se ha demostrado que no es el carácter ácido que presentan las soluciones coloidales las que determinan la actividad antimicrobiana.
- Los halos presentes frente a la bacteria *S. aureus*, se mantiene inclusive a las 96 horas, lo que no se observa con *P. aeruginosa* en donde el halo disminuye en dimensión.
- Los hidrogeles sin plata presentaron crecimiento bacteriano en la zona de contacto frente a *S. aureus*. Mientras que los hidrogeles con plata muestran zonas transparentes en la zona de contacto, lo cual indica la inhibición del crecimiento bacteriano.

A modo general podemos decir que, la síntesis radiolítica de hidrogeles, coloides de nanopartículas de plata y nanocompuestos hidrogel/Ag es una técnica sencilla que ha permitido obtener materiales con buenas propiedades.

El PVP y el PVA juegan un rol muy importante no solo en la estabilización de las nanopartículas, sino también en la forma de las nanopartículas, como parecen indicarlo las diversas estructuras obtenidas (nanoesferas, nanohexágonos, nanopirámides, nanovarillas, etc). Teniendo en cuenta que las estructuras tipo nanovarillas solo se presentaron en los coloides estabilizados con PVA, y como lo demuestran los resultados obtenidos para las mezclas sin alcohol, podemos sugerir que las formaciones de tipo nanovarillas dependen del tipo de polímero más que de la concentración de alcohol empleado. Sin embargo, la concentración de alcohol, es determinante en la formación de las nanopartículas ya que en cantidades insuficientes se ve principalmente favorecida las formaciones de óxidos. Por otro lado, se ha podido verificar los efectos del tamaño y distribución de tamaño de partículas, observadas por MET, en los corrimientos de las resonancias del plasmón superficial, los cuales también se reportan en otros trabajos. Así mismo, se ha encontrado que los coloides que contienen nanovarillas presentan coloraciones rojizas a diferencia de las coloraciones amarillentas características de las nanopartículas de plata.

Finalmente, como se ha visto, todos los nanocompuestos obtenidos así como las soluciones coloidales conteniendo nanopartículas de plata presentaron actividad antibacteriana, pero esta es principalmente dependiente de la concentración de plata, la cual en el presente trabajo ha sido expresada en términos de la concentración del precursor de plata. Por otro lado, no se ha observado cambios en la actividad antibacteriana debido a las formas y tamaños de las nanopartículas. Los hidrogeles sin nanopartículas de plata no presentaron actividad antibacteriana.

6. Anexos

6.1. Anexo 1. Irradiación de soluciones acuosas de AgNO_3

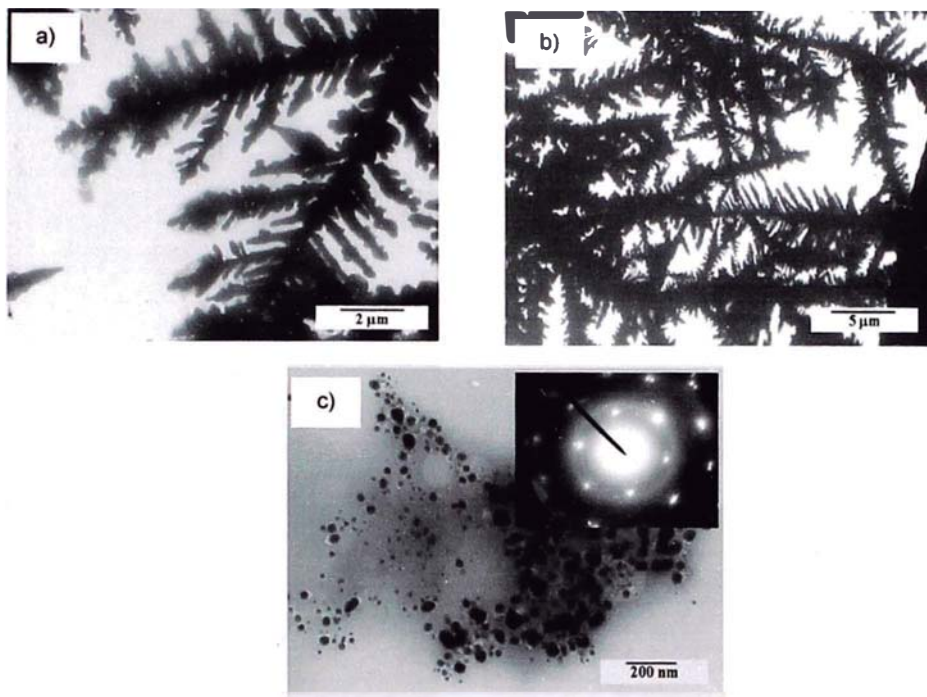


Figura 6.1. Imágenes MET y patrones de difracción de electrones de las estructuras obtenidas al irradiar la solución acuosa de AgNO_3 .

Tabla 6.1. Distancias interplanares de las partículas mostradas en las imágenes 6.1 b y 6.1c

Distancias interplanares de las partículas mostradas en la imagen 6.1b			
d_{hkl} experimental	d_{hkl} referencia	(hkl)	
2,6000	2,6780	(212)	AgNO_3
	2,6145	(012)	Ag_3O_4
2,4767	2,4820	(523)	AgNO_3
2,3589	2,3380	(123)	AgNO_3
	2,3630	(200)	Ag_2O
2,1667	2,1680	(311)	AgNO_3
2,0975	2,0980	(132)	AgNO_3
2,0096	2,0030	(230)	AgNO_3
Distancias interplanares de las partículas mostradas en la imagen 6.1c			
d_{hkl} experimental	d_{hkl} referencia	hkl	
1,2064	1,1800		Ag
1,2500	1,2200	(311)	Ag
1,4833	1,4400	(220)	Ag
	1,4945	(310)	Ag_2O
2,1134	2,0500	(200)	Ag
	2,1380	(102)	AgO
	2,1783	(331)	Ag_2O_3
2,4284	2,3630	(200)	Ag_2O
	2,4160	(111)	AgO
	2,4015	(131)	Ag_2O_3

6.2. Anexo 2. Irradiación de soluciones acuosas de AgNO_3 -isopropanol

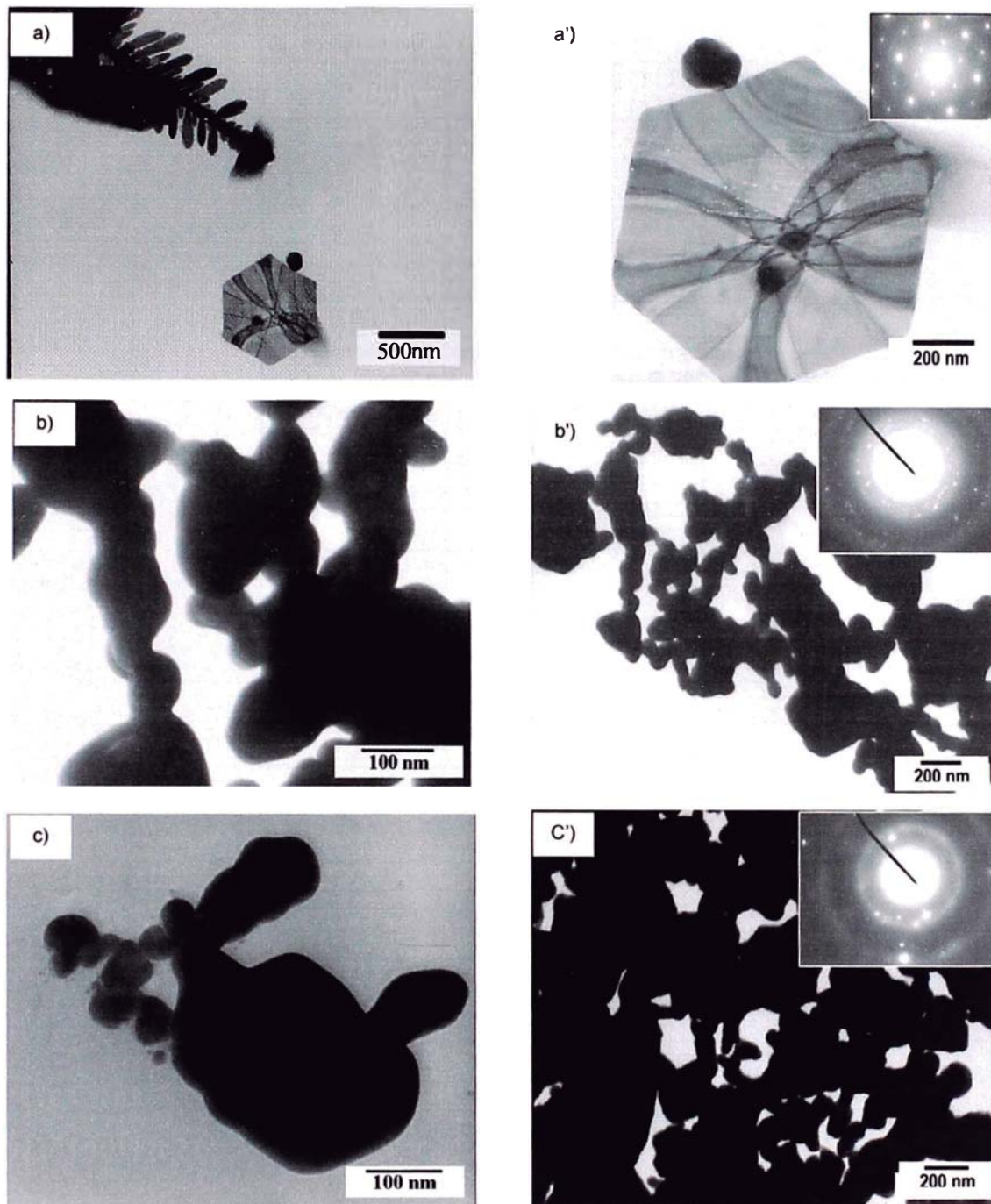


Figura 6.2. Imágenes MET y patrones de difracción de electrones de las estructuras obtenidas al irradiar la solución acuosa de AgNO_3 e isopropanol 0,2 (a), 2 (b) y 4 M (c).

Tabla 6.2 Distancias interplanares de las partículas mostradas en las imágenes 6.2a' y 6.2b'

Distancias interplanares de las partículas mostradas en la imagen 6.2a'			
d_{hkl} experimental	d_{hkl} referencia	(hkl)	
2,49	2,42	(111)	AgO
	2,48	(131)	,Ag ₂ O ₃
1,43	1,44	(220)	Ag
	1,42	(311)	Ag ₂ O
	1,49		Ag ₂ O ₃ ,
1,25	1,22	(311)	Ag,
	1,26	(321)	Ag ₂ O,
1,23	1,18	(400)	Ag ₂ O
0,93	0,96		Ag ₂ O
Distancias interplanares de las partículas mostradas en la imagen 6.2b'			
d_{hkl} experimental	d_{hkl} referencia	(hkl)	
2,10	2,14	(102)	AgO
2,05	2,09		AgO
	2,06	(511)	Ag ₂ O ₃
	2,05	(200)	Ag
1,97	1,91		AgO
	1,93	(211)	Ag ₂ O
	1,99	(620)	Ag ₂ O ₃
1,83	1,82		AgO
	1,80	(121)	Ag ₂ O ₃
1,79	1,76	(202)	Ag ₂ O ₃
1,26	1,22	(311)	Ag

7. Bibliografia

- [1] Corriu R., Mehdi A., Reyé C., Molecular chemistry and nanosciences: on the way to interactive materials, *J. Mater. Chem.*, 2005. 15: 4285–4294.
- [2] R. Gehr, R. Boyd, Optical Properties of Nanostructured Optical Materials, *Chem Mater.* 1996. 8: 1807-1819.
- [3] Soloviev M., Nanobiotechnology today: focus on nanoparticles, *Journal of Nanobiotechnology* 2007. 5:11-13.
- [4] Wouters D., Schubert U., Sequential oxidation and functionalization of nanostructures: the site-specific controlled assembly of different sized particles on a surface, *J. Mater. Chem.*, 2005, 15, 2353–2355.
- [5] Harpeness R., Gedanken A., The microwave-assisted polyol synthesis of nanosized hard magnetic material, FePt, *J. Mater. Chem.*, 2005, 15, 698–702.
- [6] Grossiord N., Loos J., Koning C., Strategies for dispersing carbon nanotubes in highly viscous polymers, *J. Mater. Chem.*, 2005, 15, 2349–2352.
- [7] Faulds K., Smith W., Graham D., Evaluation of surface enhanced resonance Raman scattering for quantitative DNA analysis, *Anal. Chem.* 2003. 76: 412–417.
- [8] Panigrahi S., Praharaj S., Basu S., Kumar S., Jana S., Pande S., Vo-Dinh T., Jiang H., Pal T., Self-Assembly of Silver Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Optical Properties, and Application in Surface-Enhanced Raman Scattering, *J. Phys. Chem. B*, 2006. 110: 13436 -13444.
- [9] Haes A., Zou S., Schatz G., Van Duyne R., Nanoscale optical biosensor: short range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 2004. 108: 6961–6968.
- [10] Prikulis J., Svedberg F., Kall M., Optical spectroscopy of single trapped metal nanoparticles in solution. *Nano. Lett.* 2004. 4: 115–118.
- [11] Shiraishi Y., Toshima N., Colloidal silver catalysts for oxidation of ethylene. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 1999. 141: 187-192.
- [12] Oh S., Byun B., Lee S., Choi S., Radiolytic Synthesis of Ag-Loaded Polystyrene(Ag-PS) Nanoparticles and Their Antimicrobial Efficiency Against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*, *Macromolecular Research* 2007. 15: 285-290.
- [13] Yu H., Xu X., Chen X., Ly T., Zhang P., Jing X., Preparation and antibacterial effects of PVA-PVP hydrogels containing silver nanoparticles, *Journal of applied polymer science.* 2007. 103: 125-133.

- [14] Petica A., Gavrilu S., Lungu M., Buruntea N., Panzaru C., Colloidal silver solutions whit antimicrobial properties., *Mater. Sci. Eng. B* (2008), doi:10.1016/j.mseb.2008.06.021
- [15] R. Pucek, L. Kvítek, J. Hrbáč, Silver colloids - Methods of preparation and utilization, *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Chemica*. 2004. 43: 59-67.
- [16] Wang D., Song C., Hu Z., Zhou X., Synthesis of silver nanoparticles with flake-like shapes, *Materials Letters*, 2005. 59: 1760-1763.
- [17] Rosemary M., Pradeep T., Solvothermal synthesis of silver nanoparticles from thiolates, *Journal of Colloid and Interface Science* 2003. 268: 81–84.
- [18] Gaddy G., Korchev A., McLain J., Slaten B., Steirgerwalt E., Light-Induced Formation of Silver Particles and Clusters in Crosslinked PVA/PAA Films, *J. Phys Chem B*. 2004.108:14850-14857.
- [19] Guin D., Manorama S, J. Lavanya, Singh S., Photoreduction of Silver on Bare and Colloidal TiO₂ Nanoparticles/ Nanotubes: Synthesis, Characterization, and Tested for Antibacterial Outcome, *J. Phys. Chem. C* 2007. 111: 13393-13397.
- [20] Yin B., Ma H., Wang S., Chen S., Electrochemical synthesis of silver nanoparticles under protection of poly(N-vinylpyrrolidone). *J. Phys. Chem. B*. 2003. 107: 8898-8904.
- [21] Starowicz M., Stypuła B., Banaś J., Electrochemical synthesis of silver nanoparticles, *Electrochemistry Communications*. 2006. 8: 227-230.
- [22] Salkar R., Jeevanandam P., Aruna S., Kolytin Y., Gedanken A., The sonochemical preparation of amorphous silver nanoparticles, *J. Mater. Chem*. 1999. 9: 1333–1335.
- [23] Krklješ A., Marinović-Cincović M., Kacarevic-Popovic Z., Nedeljković J., Radiolytic synthesis and characterization of Ag-PVA nanocomposites, *European Polymer Journal* 2007. 43: 2171-2176.
- [24] Temgire M., Joshi S., Optical and structural studies of silver nanoparticles, *Rad. Phys. Chem*. 2004. 71: 1039-1044.
- [25] Taihua Li, Hyun Gyu Park, Seong-Ho Choi, γ -Irradiation-induced preparation of Ag and Au nanoparticles and their characterizations, *Materials Chemistry and Physics* 2005. 105: 325-330.
- [26] Yoshii F., Makuuchi K., Darwis D., Iriawan T., Razzak M., Rosiak J., Heat resistance poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Radiation Physics and Chemistry*. 1995. 46: 169-174.
- [27] Singh M., Singh S., Prasad S., Gambhir I. S., Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles., *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* Vol. 3, No.3, September 2008, p. 115 – 122.

- [28] <http://www.biopps.com/article.php?query=nosotros&story=nano-silver-particles-vaginal-cream>
- [29] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 52662 (2000).
- [30] Langer, R., Folkman, J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*; 263: 797-800 (1976).
- [31] Bruchez M, Jr., Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998, 281:2013-2016.
- [32] W.C. Chan, S. Nie, Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science* 281 2016 (1998).
- [33] Y. Cui, Q. Wei, H. Park and C. M. Lieber, Nanowire Nanosensors for Highly-Sensitive, Selective and Integrated Detection of Biological and Chemical Species. *Science* 293, 1289-1292 (2001).
- [34] A. B. Lugão, S. O. Rogero, S. M. Malmonge. Rheologica behaviour of irradiated wound dressing poly(vinyl pyrrolidone) hydrogels. *Radiat. Phys. Chem.* 63 (2002). 543-546.
- [35] Mirzan T. Razzak, et al. Irradiation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hidrogel for wound dressing. *Radiat. Phys. Chem.* 2001. Vol. 62 p.p. 107-113
- [36] Mirzan T. Razzak, et al. The characterization of dressing component materials and radiation formation of PVA-PVP hydrogel. *Radiat. Phys. Chem.* 1999. Vol. 55 p.p. 153-165
- [37] Rosiak J., Ulanski P., Pajewski L., Yoshii F., Makuuchi K. Radiation formation of Hydrogels for biomedical purposes. *Radiation Physics and Chemistry.* 1995. 46: 161-168.
- [38] Doudna C., Bertino M., Pillalamarri S., Blum F., Tokuhiko A., Chattopadhyay S., Terry J.. Radiolytic Synthesis of Bimetallic Nanoparticles with High Aspect Ratio, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 2003. 740, I11.2.
- [39] Choi S, Lee S, Hwang Y, et al. Interaction between the surface of the silver nanoparticles prepared by gamma-irradiation and organic molecules containing thiol group. *Radiation Phys Chem*, 2003, 67(3-4): 517-521
- [40] D.K. Lee, Y.S. Kang. Preparation and characterization of magnetic nanoparticles by γ -irradiation. *Mater. Sci. Eng. C* 24 (2004) 107-111.
- [41] Shin J., Kim Y., Lee K., Lim Y. M., Nho Y.Ch. Significant effects of sodium acetate, an impurity present in poly(vinyl alcohol) solution on the radiolytic formation of silver nanoparticle. *Radiation Physics and Chemistry.* 77 (2008) 871-876.

- [42] Jun J., Yuan-yuan D., Shao-hai W., Shao-feng Z., Zhong-yi W. Preparation and Characterization of Antibacterial Silver-containing Nanofibers for Wound Dressing Applications. *Journal of US-China Medical Science*, ISSN1548-6648, USA Feb. 2007, Volume 4, No.2 (Serial No.27)
- [43] Thomas V., Yallapu M. M., Sreedarh B., Bajpai S. K. A versatile strategy to fabricate hidrogel silver nanocomposites and investigation of their antimicrobial activity. *Journal of Colloid and Interface Science* 315 (2007) 389-395.
- [44] Dzedzig-Goclawska A. y Stachowicz W. Sterilization of tissue allografts. En: *Advences in Tissue banking vol 1*, ed. World Scientific. Songapore (1997).
- [45] www.mitr.p.lodz.pl/biomat/raport/0_radiation_hydrogels.html
- [46] Jalochowski, M; Bauer, E. Quantum size and surface effect s in the electrical resistivity of ultra-thin Pb films, *Phys. Rev. B* 38, 5272(1988).
- [47] De Miguel, J. J. et al. Influence of the growth conditions on the magnetic properties:form monolayers to superlattices, *J. Magn. Magn. Mat.* 93, 1(1991).
- [48] Jalochowski, M; Hoffman, M.; Bauer, E. Quantized Hall effect in ultrathin metallic films, *Phys. Rev. Lett.* 76, 4227 (1996).
- [49] Paggel, J. J. et al. Atomic layer resolved quantum oscillations in the work function, *Phys. Rev. B* 66, 233403 (2002).
- [50] Czoschke, P. et al. Quantum oscillations in the layer structure of thin metal films, *Phys. Rev. Lett.* 91, 226801 (2003)
- [51] Guo, Y. et al. Superconductivity modulated by quantum size effects, *Science*, 306, 1915 (2004)
- [52] Haruta, M. Size and support dependency in the catalysis of gold, *Catalysis Today*, 36, 153 (1997).
- [53] Leuchtner, R. E. et al. Thermal metal cluster anion reactions: Behavior of aluminum clusters with oxygen. *J. Chem. Phys.* 91, 2753 (1989).
- [54] R. L. Whetten, D. M. Cox, D. J. Trevor, and A. Kaldor. Correspondence between Electron Binding Energy and Chemisorption Reactivity of Iron Clusters. *Phys. Rev. Lett.* 54, 1494 - 1497 (1985).
- [55] Danese, A. G.; Curti, F. G.; Bartynski, R. A. Quantum size effect induced modification of the chemisorption properties of thin films, *Phys. Rev. B* 70, 165420 (2004).
- [56] Aballe, L. et al. Tuning surface reactivity via electron quantum confinement, *Phys. Rev. Lett.* 93, 196103 (2004).
- [57] Duncan, M. A.; Rouvray, D. H. Microclusters. *Scientific American* 110-115 (1989).

- [58] Knight, W. D. et al. Electronic Shell Structure and Abundances of Sodium Clusters. *Phys. Rev. Lett.* 52, 2141 - 2143 (1984)
- [59] Mi F.L, Wu Y.B, Shyu S.S, Schoung J.Y, Huang Y.B, Tsai Y.H, Hao J.Y. Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002;**59**:438–449.
- [60] Mi F.L, Wu Y.B, Shyu S.S, Chao A.C, Lai J.Y, Su C.C. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. *J. Memb. Sci.* 2003;212:237–254.
- [61] Lajos Balogh, Douglas R. Swanson, Donald A. Dendrimer–Silver Complexes and Nanocomposites as Antimicrobial Agents. *Nano Letters*, 2001, 1 (1), pp 18–21
- [62] W. K. Son, J. H. Youk, T. S. Lee, W. H. Park. Preparation of antimicrobial ultrafine cellulose acetate fibers with silver nanoparticles. *Macromol. Rapid. Commun.* 25, 1632(2004).
- [63] Elechigerra J. L., Burt J., Morones J., Camacho A., Gao X., Lara H., Yacaman M. J., Interaction of silver nanoparticles with HIV-I., *Journal of Nanobiotechnology* 2005, 3:6 doi:10.1186/1477-3155-3-6.
- [64] Zachariadis, P.C., Hadjikakou, S.K., Hadjiliadis, N., Skoulika, S., Michaelides, A., Balzarini, J. & De Clercq, E. Synthesis, characterization and in vitro study of the cytostatic and antiviral activity of new polymeric silver (I) complexes with ribbon structures derived from the conjugated heterocyclic thioamide 2-mercapto-3,4,5,6-tetrahydropyrimidine. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1420-1426 (2004).
- [65] Gosheger G, Harges J, Ahrens H, Streitburger A, Buerger H, Erren M, Gonsel A, Kemper FH, Winkelmann W, von Eiff C: Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model – an analysis of the infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials* 2004, **25**:5547-5556.
- [66] Percival, S.L., Bowler, P.G., & Russell, D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.*, 60, 1-7 (2005).
- [67] Skoog D., West D. *Análisis Instrumental*, Mac Graw Hill Interamericana de México, 1990.
- [68] Ian M. Watt. *The principles and practice of E. M.* Second Edition. Cambridge University Press (1997).
- [69] J. Cabrera. Propiedades de hidrogeles de PVA-PVP obtenidos con radiaciones ionizantes. Comisión Nacional de Energía Atómica (2007)
- [70] Anna Aragón. Esterilización de productos farmacéuticos por rayos gamma de cobalto-60. *Farmespaña Industrial* 54-58 (2006)

- [71] L. Carlos Cesteros Iturbe. Aplicaciones de la FTIR al estudio de las interacciones polímero-polímero. Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 5(3), (2004)
- [72] Wiley B, Sun Y, Mayers B, Xia Y: Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. Chemistry - A European Journal 2005, 11:454-463.
- [73] Sun Y. y Xia Younan. Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles.
- [74] M. V. Roldán, A. L. Frattini y O. A. de Sanctis, N. S. Pellegri. Nanopartículas metálicas con formas diversas metal nanoparticles with different shapes. Anales AFA Vol. 17 La Plata 2005 – 212- 217. ISSN (en línea): 1850 – 1158.
- [75] Z.H. Mbhele, et al., Fabrication and Characterization of Silver–Polyvinyl Alcohol Nanocomposites. Chem. Mater., **2003**, 15 (26), pp 5019–5024.
- [76] B. Karthikeyan, Spectroscopic studies on Ag–polyvinyl alcohol nanocomposite films, Physica B 364 (2005) 328–332
- [77] Y. Matsumura, K. Yoshikata, S. Kunisaki, T. Tsuchido, Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. Appl., Environ. Microbiol 69(7), 4278-4281 (2003).
- [78] Gupta, A., M. Maynes, and S. Silver. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 64:5042-5045 (1998).
- [79] Nover L, Scharf K-D, Neumann D. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. Mol Cell Biol. 1983;3:1648–1655.
- [80] J. M. Rosiak in cooperation with I. Janik, S. Kadlubowski, M. Kozicki, P. Kujawa, P. Stasica and P. Ulanski. IAEA report-Radiation Formation of Hidrogels for Biomedical Applications (2002);
- [81] S. Baccaro, L. A. Pajewski, et. al., (1995) Mechanical properties of polyvinylpyrrolidone (PVP) undergoing radiation. Nucl. Instr. And Meth. In Phys. Res. B 105 p.p.100-102
- [82] A. V. Mondino, M. E. Gonzáles, G.R. Romero, E.E. Smolko (1999). Physical properties of gamma irradiated poly(vinyl alcohol) hydrogel preparations. Radiation Physics and Chemistry 55 (1999) 723-726.
- [83] Agustín Tanarro Sanz, Agustín Tanarro Onrubia, Diccionario tecnología nuclear. Foro de la Industria Nuclear Española.