



# ESTUDIO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CON APLICACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

**TFG Experimental**

Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla  
Guillermo Martínez Muñoz

**Guillermo Martínez Muñoz**



**Universidad de Sevilla**

**Facultad de Farmacia**

**Trabajo de Fin de grado, carácter experimental**

**Grado en Farmacia**

**“Estudio de Nanopartículas Poliméricas con Aplicación en Microbiología”.**

**Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica.**

**Profesorado tutor:**

**Dra. Ana Alcudia Cruz (Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia)**

**Dra. María Jesús Martín Valero (Departamento de Química Analítica, Facultad de Química)**

**En Sevilla, a Noviembre de 2019**

En la actualidad científica se habla mucho del término “nanopartículas” y de sus aplicaciones en múltiples campos de la ciencia y la tecnología y ha alcanzado una gran notoriedad, atrayendo gran interés. En este sentido, la “nanotecnología” abre la puerta a nuevas investigaciones en ámbitos tan diversos como la ingeniería de materiales y superficies, la química orgánica, la bioquímica, la química farmacéutica y la medicina entre otros. En este trabajo, se ha estudiado la síntesis de dos nanopartículas diferentes sintetizadas a partir de alcohol polivinílico y ácido tánico por un lado, y alcohol polivinílico y ácido poli(láctico-co-glicólico), por otro. Las nanopartículas sintetizadas se han caracterizado empleando diversas técnicas instrumentales como “Dynamic-light scattering” (DLS), para obtener el tamaño hidrodinámico y el potencial zeta, y su observación morfológica a nivel microscópico mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Una propiedad estudiada ha sido la capacidad de formar complejos con metales de transición (hierro, cobre, zinc y plata entre otros), que fue observada de forma cualitativa, debido al cambio de color producido por la formación del complejo, y determinada cuantitativamente en el caso del hierro y del cobre mediante espectrofotometría de absorción molecular y espectrofotometría de emisión atómica respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que podrían resultar potencialmente útiles como quelantes de iones de metales pesados como aguas contaminadas, biofortificación de plantas o incluso para aplicación como compuestos bacteriostáticos y/o bactericidas en diferentes microorganismos, siendo esta última potencial aplicación la que se ha estudiado en este trabajo. En esta línea, se decidió realizar algunos ensayos con cepas de *Staphylococcus intermedius* y *Pseudomonas aeruginosa* para determinar su capacidad antimicrobiana. Los resultados obtenidos son prometedores, ya que abren la posibilidad a nuevos estudios para el desarrollo de nuevas estrategias médicas y farmacéuticas de abordaje del tratamiento de enfermedades infecciosas provocadas por bacterias, en especial en estas cepas.

**Palabras clave:** Nanopartículas metálicas, Nanopartículas, Ácido tánico, Quelación, Antimicrobiano.

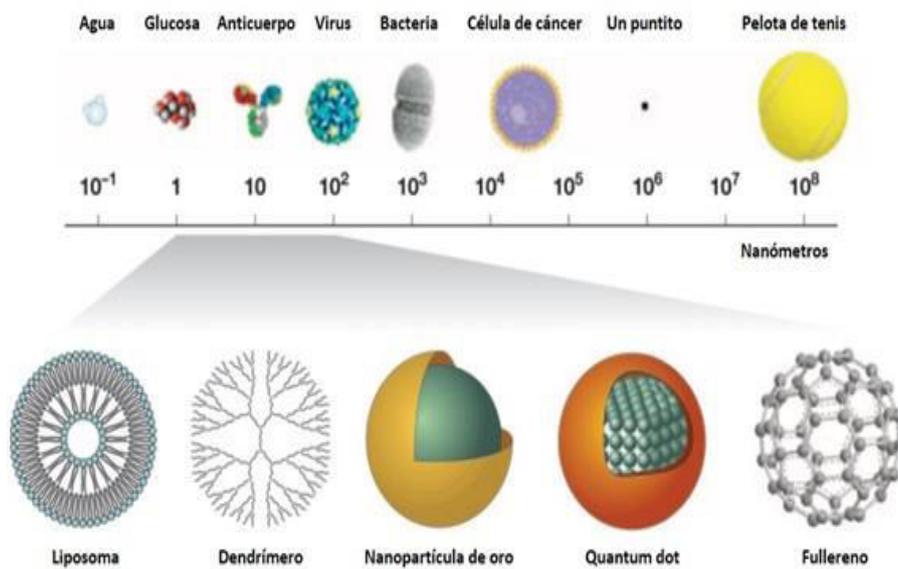
# ÍNDICE

I.	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
	Definición de nanopartícula	1
	Perspectiva histórica	2
	Nanotecnología actual	3
	Nanotecnología, metales y microbiología	6
	Ácido tánico	8
	Caracterización de una nanopartícula	9
II.	<b>OBJETIVOS</b>	11
III.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	12
IV.	<b>RESULTADOS</b>	22
V.	<b>CONCLUSIONES</b>	31
VI.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	33

# I.- INTRODUCCIÓN

## 1.- Definición de nanopartícula y nanotecnología.

La palabra “nano” tiene origen en el latín, cuyo significado es “enano”. Por tanto, la definición de nanopartículas hace referencia principalmente al tamaño de las mismas. Según la Organización Internacional de Normalización (ISO por sus siglas en inglés), el prefijo “nano-” hace referencia a valores de tamaño entre 1 y 100nm aproximadamente. Existe un consenso en que los tamaños oscilan entre valores de 10nm hasta unos 100nm, aunque hay muchos autores que consideran que su tamaño puede oscilar hasta los 1000nm (Mohanraj y Chen, 2006).



**Figura 1.** Escala de tamaños tomando como referencias distintos objetos. En ella se observa el rango de tamaños en el que oscila el diámetro de una nanopartícula y su comparación con otras estructuras similares.

## **2.- Perspectiva histórica**

Desde una perspectiva histórica, las nanopartículas son consideradas un descubrimiento del siglo XX. Sin embargo, existen datos de que fueron empleadas por los artesanos de la antigua Mesopotamia que las utilizaban como materiales finamente divididos, para obtener un efecto luminoso resplandeciente en las superficies de vasijas de cerámica en el siglo IX a.C. (Strambeanu et al., 2014) Uno de los ejemplos más famosos es la Copa de Licurgo, fabricada en torno a los siglos V – IV a.C. Esta copa en jaula de vidrio romano se ve de color rojo rubí si es atravesada por la luz y de color verde si la luz es reflejada, debido a la presencia de coloides de oro (Daniel y Astruc, 2004) Un poco más tarde, en la Edad Media y el Renacimiento se desarrollaron métodos para producir finas películas de metal sobre superficies de cristal o vidrio y otorgarles este efecto brillante que hoy día siguen siendo ampliamente usados. Así, se desarrollaron las artes visuales y la imprenta, favoreciendo el desarrollo de nuevos métodos y técnicas de producción de polvos compuestos de pequeñas partículas orgánicas o inorgánicas, cercanas al tamaño de las nanopartículas actuales, y dispersiones estables en diferentes disolventes que eran utilizados como tintes en la pintura y la escritura. Curiosamente, Michael Faraday fue el primer científico que describió las propiedades ópticas de nanopartículas metálicas (Faraday, 1857). Thomas Turner describió un proceso por el cuál, al depositar láminas de oro o plata en superficies de vidrio calentadas a 500°C, las propiedades tanto de los materiales depositados como del vidrio se veían alteradas, permitiendo el paso de la luz blanca a través de la película metálica ya que se producía una marcada reducción de la reflexión del material mientras aumentaba la resistencia eléctrica considerablemente (Turner, 1908). Concretamente, James Clark Maxwell propuso varios conceptos en este campo de la nanotecnología pero sin utilizar este término para referirse a las delgadas capas monomoleculares.

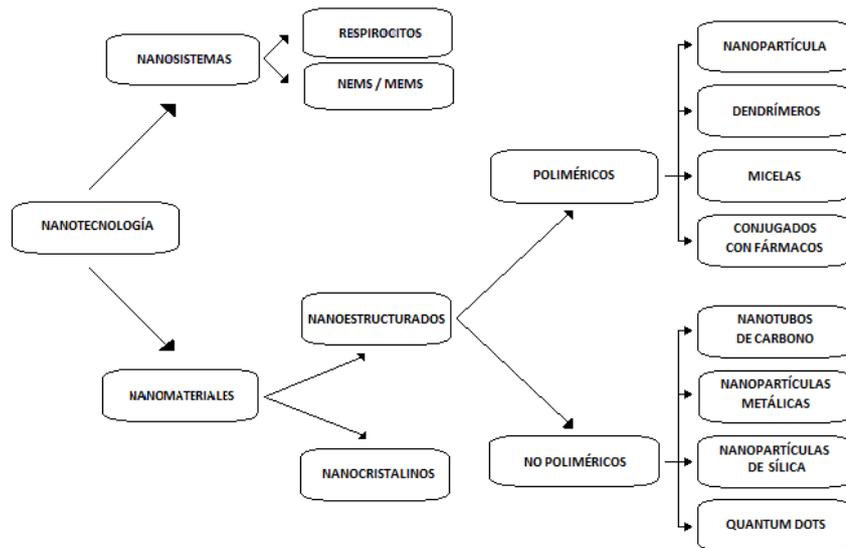
Las primeras observaciones precisas de estas partículas fueron realizadas de la mano de Richard Adolf Zsigmondy mediante el uso de ultramicroscopía de campo oscuro (Zsigmondey, 1926). Esta técnica permite observar partículas de un tamaño inferior a la de la longitud de onda de luz monocromática y fue el primero en acuñar el término “nanopartícula” para estos compuestos. Se consideraron ya en su tiempo tan importantes que en 1932 se le otorgó el Premio Nobel de Química a Irving Langmuir

gracias a sus contribuciones teóricas a la química, entre las que se encuentra el concepto de “monocapa”, una lámina de material de una molécula de grosor y que fue determinada mediante estudios de caracterización de nanopartículas y algunos fenómenos relacionados que definen la interfase en los sistemas coloidales (Langmuir, 1917).

Más tarde, hacia los años 1970-1980 surgió la definición sinónima de nanopartículas y partículas ultrafinas, cuando el primer estudio con “nanopartículas” estaba siendo liderado por Estados Unidos (Granqvist et al., 1976) y por Japón. Eran entonces conocidas como “partículas ultrafinas” debido a que se trataban de partículas del orden de los 100nm. Sin embargo, no fue hasta la década de 1990 cuando se puso de moda el término “nanopartícula”. En un estudio realizado sobre la distribución de tamaños de estas nanopartículas en el que participó el mismo autor se observa el uso de este término con mucha frecuencia, quedando en desuso el término “partícula ultrafina” (Kiss et al., 1999).

### **3.- Nanotecnología actual**

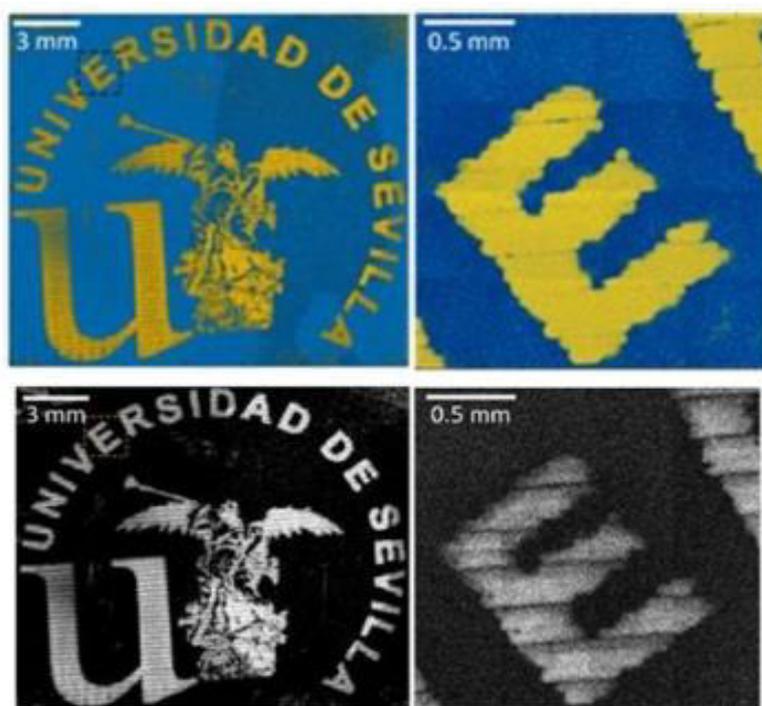
Hoy en día, la nanotecnología se ha convertido en una ciencia “accesoria” utilizada en muchos campos de la ciencia como la electrónica, la física o la ingeniería. Recientemente se ha abierto la posibilidad de emplear esta nanotecnología en la ciencia biomédica y farmacéutica, obteniéndose una mejora en los resultados de múltiples estudios de desarrollo de sistemas de liberación de fármacos o detección precoz de enfermedades cancerosas (Bhatia, 2016). Conseguir que el fármaco llegue a su diana específica es un gran problema en el tratamiento de muchas enfermedades. Por otro lado, el uso de fármacos convencionales se caracteriza por una pobre distribución en el organismo, una efectividad limitada, la aparición de efectos secundarios no deseados y la falta de selectividad. Así pues, estrategias basadas en el control de la liberación del fármaco son potencialmente eficaces para superar estas limitaciones, facilitando el transporte del fármaco a su diana terapéutica y protegiéndolo de la degradación metabólica. El resultado es un aumento de la concentración en el tejido diana, reduciendo la dosis de administración necesaria y los consecuentes efectos secundarios.



**Figura 2.** Ilustración de distintos sistemas farmacéuticos basados en nanotecnología (Bhatia, 2016).

Una aplicación de las nanopartículas y de la nanotecnología en general hoy en día es la búsqueda de nanocompuestos poliméricos capaces de ser utilizados en impresión 3D (Inkjet 3D Printing). Esta tecnología permite su aplicación en casos complicados de geometría y personalización (Wimpenny et al., 2017). Su producción “layer-by-layer” (Murphy y Atala, 2014) le otorga gran interés industrial, pues permite una combinación única de ventajas entre las que se incluye el uso de multi-materiales, una alta resolución de producción y escalabilidad (Angjellari, 2017). Entre estas ventajas cabe destacar la posibilidad de usar estos multi-materiales para fabricar componentes multi-funcionales en un solo paso, revolucionando la producción industrial en algunos campos anteriormente mencionados como la electrónica (Ke Sun et al., 2013) y la biomedicina (Khaled et al., 2014) (Kolesky et al., 2014). Aunque esta tecnología existía desde la década de los 90, la limitación en la disponibilidad de materiales de impresión ha restringido su uso hasta la última década. Sin embargo, el desarrollo de nuevos materiales y aplicaciones de los mismos se ha convertido en una prioridad para los investigadores de hoy en día (Määttänen et al., 2012) (Jang et al., 2010) (Wang et al., 2016). Muchos estudios interdisciplinarios han surgido para desarrollar nanomateriales como base para estas aplicaciones de impresión 3D. Las nanopartículas, específicamente las nanopartículas de oro (AuNP) tienen un gran potencial e interés debido a su

demostrada biocompatibilidad (Daniel y Astruc, 2004) (Goodman et al., 2004). En esta línea han surgido estudios que utilizan nanopartículas de oro para el diagnóstico de cáncer pulmonar en el aliento (Peng et al., 2009), catálisis (Thompson, 2007), como el proceso de oxidación aeróbico, o como sistemas liberadores de fármacos (Patra et al., 2008). En un estudio liderado y publicado por nuestro grupo de investigación se han desarrollado algunos nuevos compuestos poliméricos biodegradables que poseen propiedades óptimas para actuar como matriz polimérica para compuestos con nanopartículas de oro, constituyendo así una nueva área de trabajo con un enorme potencial. En este sentido, estos materiales podrían alcanzar niveles excepcionales de estabilidad y tienen un demostrado potencial como nuevo material de impresión para la tecnología de impresión 3D. Estos materiales abrirían la puerta a nuevas rutas y aplicaciones para fabricar sensores nanometálicos para su uso en biomedicina a partir de nanopartículas de oro estables (Begines et al., 2019).



**Figura 3.** Imagen del logotipo de la Universidad de Sevilla impreso mediante tecnología 3D obtenida por ToF-SIMS.

#### **4.- Nanotecnología, metales y microbiología**

Como ya se ha comentado previamente, el uso de las nanopartículas en diversos campos de la ciencia y de la ingeniería atrae a los científicos a explorar en nuevas dimensiones sus trabajos, debido concretamente a las posibilidades que brindan su pequeño tamaño. Muchos estudios han probado la existencia de efectos antimicrobianos en algunas de sus formas (Ahmed et al., 2016). Por otro lado, el continuo aumento de la resistencia de patógenos hacia los antibióticos constituye un problema mayor de salud en los últimos años a nivel mundial. Así, la combinación de nanotecnología y la actividad intrínseca de materiales metálicos es una nueva arma a disposición de los investigadores para tratar este problema (Dizaj et al., 2014). Se tienen datos de que el 70% de las infecciones bacterianas son resistentes a uno o más antibióticos que normalmente se utilizan para erradicarlas (Allahverdiyev et al. 2011). Es conocido también que la actividad antimicrobiana de metales como plata (Ag), cobre (Cu), oro (Au), titanio (Ti), y zinc (Zn), cada uno con varias propiedades, mecanismos y espectros de acción, ha sido utilizada desde hace siglos (Malarkodi et al., 2014).

Según la literatura, el metal más utilizado para la formación de nanopartículas con actividad antimicrobiana es la plata, formando nanopartículas de plata (AgNPs) (Zinjarde, 2012). Se han publicado algunos estudios que indican que la acción antibacteriana de las AgNPs es debido al daño de la membrana externa de la bacteria (Lok et al., 2006). Algunos investigadores apuntan que las AgNPs podrían inducir la formación de agujeros en la membrana bacteriana y fragmentar la célula (Yun et al., 2013) (Iavicoli et al., 2013). Además, es también conocido que los iones de plata interaccionan con los restos ricos en sulfuro de enzimas, lo que conlleva la ruptura de procesos metabólicos que conducen a la muerte celular (Egger et al., 2009).

Por otro lado, la seguridad del ZnO y su compatibilidad con la piel humana lo convierte en un candidato perfecto para ser añadido en textiles y superficies que permanecen en contacto con el cuerpo humano (Liu et al., 2014). Concretamente, las nanopartículas de ZnO (ZnONPs) han demostrado efecto bactericida sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como sobre esporas, las cuales son resistentes a altas temperaturas y presiones (Azam et al., 2012). El aumento de rendimiento en actividad antibacteriana de las nanopartículas frente a sus micropartículas se debe al aumento del área superficial

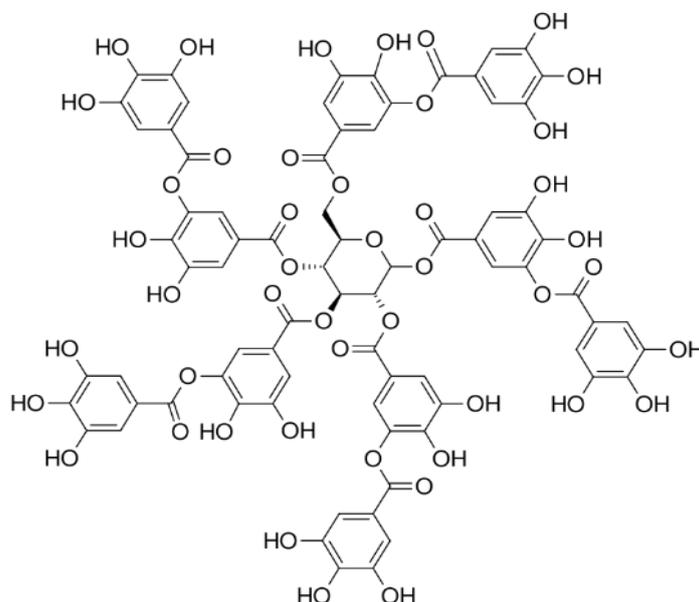
en las ZnONP (Xie et al., 2011), demostrando que la eficacia bactericida aumenta cuando se disminuye el tamaño de la partícula (Padmavathy y Vijayaraghavan, 2008).

Por otra parte, las nanopartículas de cobre deben su interés a sus propiedades biológicas, químicas, físicas y antimicrobianas, así como su bajo coste de preparación (Wu et al., 2002) (Usman et al., 2013) (Ahamed et al., 2014). Concretamente, Usman et al. investigaron los efectos antimicrobianos de nanopartículas Cu-quitosano (2-350 nm). Evaluaron el efecto antibacteriano y antifúngico de estas nanopartículas en varios organismos entre los que se encuentran *S. aureus* meticilinresistente (SAMR), *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* y *C. albicans*. Sus resultados han evidenciado el alto potencial de estas nanopartículas como agentes antimicrobianos. (Usman et al., 2013). Por otro lado, Azam et al. indicó la relación entre el tamaño y la actividad antibacteriana de nanopartículas de CuO (CuONPs) en un estudio. En particular, ellos investigaron la actividad antibacteriana de las nanopartículas de CuO frente a dos bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*) y dos bacterias Gram-negativas (*P. aeruginosa* y *E. coli*). Sus resultados indican actividad frente a ambos grupos de bacterias. (Azam et al., 2012).

Al mismo tiempo, en los últimos años, el aumento de la industrialización y la urbanización ha contribuido al desgaste medioambiental. En esta línea, las nanopartículas también tienen aplicaciones para contrarrestar agentes contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos (Cai et al., 2014) (Ponder et al., 2000). Por otra parte, las nanopartículas de hierro (FeNPs) poseen características que las convierten en candidatas únicas para su uso en catálisis (Hassan y Hameed, 2011). Además, gracias a su alta susceptibilidad magnética y biocompatibilidad, las FeNPs han sido utilizadas en muchas ocasiones para tratamientos de cáncer y para radiación oncológica (Park et al., 2015). También se están utilizando en combinación con otros compuestos que podrían otorgarles capacidad antibacteriana (Irshad et al., 2017)

## 5.- Ácido tánico

El ácido tánico es un polifenol hidrolizable que se forma en las cortezas y frutos de muchas plantas (Quideau et al., 2011). Este y otros polifenoles presentan actividad antimutagénica, anticarcinogénica y antioxidante, y sus mecanismos están siendo recientemente estudiados (Batista et al., 2016) (Woźniak et al., 2018) (Di Sotto et al., 2016). Los taninos hidrolizables como el ácido tánico han sido estudiados por sus efectos antioxidantes, antimicrobianos y antivirales (Kim et al., 2010). En este trabajo, además de las capacidades antioxidantes que presenta el ácido tánico (Gülçin et al., 2010), resultó de gran interés debido a su capacidad de formar nanopartículas metálicas (Aswathy Aromal y Philip, 2012) (Ahmad, 2014) (Ranoszek-Soliwoda, 2017), de formar complejos con diversos metales (Park et al., 2018) (Chakrabarty et al., 2017) y a sus efectos antimicrobianos (Çolak et al., 2010) e inhibidores de la formación de biofilm (Lee et al., 2013), lo que podría representar una nueva línea de investigación para superar la creciente multirresistencia de microorganismos patógenos.



**Figura 4.** Estructura química del ácido tánico. Contiene un azúcar central (glucosa) rodeado de 10 grupos galoílos.

## 6.- Caracterización de una nanopartícula

La caracterización de nanopartículas y nanomateriales en general se basa en propiedades como el área superficial, la composición química, la química de superficie, el tamaño de partícula y su distribución, la morfología, la carga superficial, la formación de aglomerados y agregados, la estructura cristalina, o la solubilidad (Stefaniak, 2017) (Lisinger et al., 2011).

En este trabajo se han caracterizado en base a su tamaño, morfología y carga superficial, ya que estas propiedades modifican la acción *in vivo* de las nanopartículas (Liu W et al., 2010). A continuación, se explican brevemente estas características y su importancia:

### a) Tamaño

La propiedad más importante para la caracterización de nanopartículas es el tamaño. Se obtiene mediante la evaluación del tamaño de las mismas y su distribución (índice de polidispersión o PDI por sus siglas en inglés), ya que ambos valores resultan importantes para determinar las capacidades de una nanopartícula (Bahari y Hamishehkar, 2016). El tamaño de una nanopartícula está comprendido entre 10nm-100nm, aunque el límite superior es difuso. El índice de polidispersión, PDI o índice de heterogeneidad es un valor calculado a partir de la correlación de los datos (los análisis acumulativos) y carece de dimensiones. Valores mayores de 0.7 indican que la muestra tiene una amplia distribución de valores de tamaño, por lo que probablemente no pueda ser medida correctamente mediante técnicas "Dynamic-Light Scattering" (DLS) (Daenei et al., 2018). Está ampliamente comprobado que el tamaño de las partículas afecta directa y profundamente a su capacidad para ser utilizadas como transportadores de fármacos. A menor tamaño, mayor es la superficie relativa de las partículas, lo que resulta en una liberación de fármaco más rápida. Sin embargo, cuanto menor es el tamaño de la nanopartícula, mayor es la tendencia a formar agregados durante su almacenamiento y transporte. Por tanto, es necesario obtener un equilibrio entre el menor tamaño posible y la máxima estabilidad permitida (Redhead et al., 2001) (Seil y Webster, 2012)

## **b) Potencial zeta**

No hay una técnica válida para medir el potencial de superficie de pequeñas partículas en suspensión, por lo que se recurre a medir el potencial eléctrico a una distancia determinada de la superficie de la partícula, en la capa difusa. Esta zona se denomina plano de deslizamiento. El potencial zeta hace referencia al potencial electrostático que aparece en la doble capa eléctrica que aparece rodeando a una nanopartícula en disolución (plano de deslizamiento) (Hunter, 1982). Las nanopartículas con un potencial zeta entre -10 y +10 mV se consideran aproximadamente neutrales, mientras que nanopartículas con un potencial zeta superior a +30 mV o inferior a -30 mV se consideran fuertemente catiónicas y aniónicas respectivamente. (Clogston y Patri, 2010) Debido a que la mayoría de las membranas celulares se encuentran cargadas negativamente, el potencial zeta puede afectar a la capacidad de las nanopartículas para permear membranas, resultando en la mayor toxicidad de las nanopartículas catiónicas que pueden producir la ruptura de la pared celular.

En este trabajo, se tratará de diseñar un proceso de síntesis de nanopartículas de ácido tánico y alcohol polivinílico (TA-PVA NPs), capaz de producir nanopartículas con propiedades de tamaño y carga en concordancia con la bibliografía consultada y anteriormente constatada, con el objetivo de emplear las propiedades antimicrobianas del ácido tánico presente en las mismas para ofrecer alternativas frente a infecciones multirresistentes de microorganismos. Además, se estudiará su capacidad de formar complejos con metales que puedan potenciar sinérgicamente esta acción, abriendo un nuevo horizonte de posibilidades para tratar este problema mundial.

## II.- OBJETIVOS

- 1- Diseñar un proceso de síntesis de nanopartículas poliméricas de manera sencilla y reproducible
- 2- Determinar las características de dichas nanopartículas y su estabilidad frente a diferentes agentes y condiciones
- 3- Determinar y cuantificar la capacidad quelante de estas nanopartículas respecto a varios metales de interés por su aplicación en diferentes campos.
- 4- Identificar posibles aplicaciones en el campo de la microbiología como inhibidores del crecimiento de microorganismos.

### III.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### Reactivos empleados:

- Tricloruro de hierro hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) PANREAC, calidad para análisis.
- Dicloruro de hierro tetrahidratado ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) Sigma-Aldrich, calidad para análisis.
- Sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) PANREAC, calidad para análisis.
- Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) Sigma-Aldrich, calidad para análisis.
- Sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) Sigma-Aldrich, calidad para análisis.
- Alcohol polivinílico (PVA) Sigma-Aldrich, 87-90% hidrolizado. Peso molecular medio: 30000-70000 g/mol.
- Ácido Tánico (TA) Sigma-Aldrich ( $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$ ). Peso molecular: 1701.20 g/mol.
- Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) Sigma-Aldrich ( $[\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2]_x[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2]_y$ ). Peso molecular medio: 30000-60000 g/mol.

Todos los reactivos y disolventes fueron empleados sin posterior purificación.

#### Equipo empleado:

**Zetasizer Nano ZSP:** Analizador de tamaño y potencial Z de la casa Malvern. Equipo de alta sensibilidad que permite medir tamaño de partícula en el rango de 0.6 nm a 6  $\mu\text{m}$  (por la técnica DLS, dispersión dinámica de luz), potencial zeta en el rango de tamaño de partícula de 5 nm a 10  $\mu\text{m}$  (por microelectroforesis láser Doppler) y peso molecular en el rango de  $1 \times 10^3$  a  $2 \times 10^7$  Daltons (por la técnica SLS, dispersión estática de la luz). Todas estas medidas se aplican a partículas en suspensión.

**FEI Teneo:** Microscopio electrónico de barrido de alta resolución (FEGSEM). Permite realizar estudios de muestras de muy diferente naturaleza, incluyendo muestras

eléctricamente aislantes, o magnéticas. Se pueden obtener imágenes de la superficie de muestras tanto pulidas como con topografías abruptas; pudiendo obtener, mediante pegado, imágenes de grandes regiones de la muestra a alta magnificación. Tiene capacidad para realizar estudios de composición elemental. Puede mostrar, a la vez, hasta 4 señales de diferentes detectores. La cámara de muestras es de gran capacidad y versatilidad. El portamuestras permite montar hasta 18 muestras a la vez, con una fácil y rápida navegación entre ellas.

**UNICAM UV 500ICP:** Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis de la casa Thermo Spectronics, con resolución de 1 nm en el rango 190-850 nm.

**4200 MP – AES:** Plasma por microondas – Espectrómetro de emisión atómica de la casa Agilent Technologies. Emplea una fuente de microondas para generar un plasma de nitrógeno.

#### **Microorganismos empleados:**

Se utilizarán dos cepas distintas de microorganismos para estos ensayos, escogidas en base a criterios de disponibilidad y conveniencia en los ensayos:

- *Staphylococcus pseudintermedius* proveniente de la Colección Belga de Cultivos Tipo (BCCM/LMG) con número de registro LMG22219.
- *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de la colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de registro CECT 110

*Staphylococcus pseudintermedius* es una bacteria tipo Coco Gram (+) muy relacionada con el *Staphylococcus aureus*. Está presente en el microbioma de animales de compañía, dando lugar a importantes infecciones oportunistas, especialmente en perros (Van Duijkeren et al., 2011). Los estafilococos tienen la propiedad de volverse resistentes a ciertos antimicrobianos, particularmente a la meticilina ("*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina") debido a la presencia del gen *mecA* (Weese y Van Duijkeren,

2010). Además, en 2006 un estudio reportó el primer caso de infección por *Staphylococcus pseudointermedius* en humanos (Van Hoovels, 2006).

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria tipo Bacilo Gram (-) con una alta relevancia clínica por presentar multirresistencia en algunas de sus cepas por varios mecanismos (Lambert, 2002). Uno de los mecanismos que poseen estas bacterias para contrarrestar la acción de los antimicrobianos es la formación de biofilm (Drenkard, 2003) (Rybtke et al., 2015), por lo que es una de las dianas terapéuticas que están en el punto de mira del estudio de desarrollo de fármacos (Maura y Rahme, 2017).

### **1. Síntesis de nanopartículas de ácido tánico y alcohol polivinílico (TA-PVA NPs)**

A continuación, se explica el proceso de síntesis que se ha llevado a cabo para elaborar las nanopartículas. La síntesis se ha basado en el procedimiento descrito por la profesora Zaderenco para la síntesis de otro sistema similar de nanopartículas que contienen ácido tánico, alcohol polivinílico y polietilenglicol (TA-PVA-PEG NPs) (Aguilera et al., 2016). En este sentido, se realizaron las modificaciones que a continuación se detallan tanto de escalado como para obtención de la estabilidad y tamaño adecuados.

La síntesis se llevó a cabo en medio acuoso. Se tomaron 32mg de ácido tánico que fueron disueltos en 10ml de agua desionizada y 100mg de alcohol polivinílico que fueron disueltos en 10ml de agua desionizada, en viales distintos, con ayuda de un agitador magnético vortex a máxima potencia (1400 rpm) durante dos minutos. Una vez obtenidas ambas disoluciones, la disolución de alcohol polivinílico se coloca en un matraz en agitación a máxima potencia cuanta. Sobre él se añade la disolución de ácido tánico gota a gota con ayuda de una pipeta y se deja agitando treinta minutos a temperatura ambiente. Ambas disoluciones incoloras transparentes forman una fase homogénea opaca de color blanco de gran estabilidad.

Posteriormente, las nanopartículas fueron liofilizadas y pesadas para obtener el rendimiento de la síntesis.

## **2. Caracterización de nanopartículas**

A continuación, una vez optimizado el proceso de síntesis, se procedió a la caracterización de sus propiedades como nanopartículas en base a propiedades de tamaño y carga superficial.

### **2.a) Potencial zeta, diámetro hidrodinámico e índice de polidispersión**

El analizador Zetasizer Nano ZSP es capaz de medir estos parámetros valiéndose de dos técnicas analíticas, “Dynamic Light Scattering” (DLS) y “Electrophoretic Light Scattering” (ELS). DLS, también conocida como “Photon Correlation Spectroscopy” (PCS) o “Quasi-Elastic Light Scattering” (QELS) utiliza luz dispersada para medir el ratio de difusión de las partículas. Estos datos son procesados para obtener una distribución de tamaños de la muestra, donde el tamaño viene dado por el diámetro hidrodinámico o radio de Stokes. Este diámetro hidrodinámico depende tanto de la masa como de la conformación (forma) de las nanopartículas. Este método nos proporciona ventajas muy importantes como la posibilidad de analizar muestras con una amplia distribución de especies de distintos tamaños (por ejemplo, en la existencia de una nanopartícula original y sus posibles agregados). Además, no produce la disgregación o dilución de la muestra, por lo que no se afectan los posibles agregados moleculares.

ELS, también conocida como electroforesis láser Doppler, es una combinación de las técnicas de electroforesis, el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, con la velocimetría de laser Doppler, una técnica para determinar las velocidades de las partículas mediante la medida del desplazamiento Doppler de la luz láser que se dispersa de ellas. Esta técnica se lleva a cabo en un tiempo mucho menor que otros métodos y permite el estudio de sistemas que interactúan en concentraciones uniformes, ya que no requiere la separación de las especies en disolución ni genera gradientes de concentración. En muchos casos, se obtiene una mayor precisión y resolución que la que podría obtenerse por cualquier otra técnica.

Se tuvo en cuenta el efecto de la dilución en los resultados de potencial zeta obtenidos. (Braun A et al., 2011) Cada muestra fue medida tres veces consecutivas para cada uno de los parámetros medidos y se realizó la media correspondiente.

## **2.b) Microscopía electrónica de barrido (MEB):**

Adicionalmente, se observaron las nanopartículas TA-PVA en microscopía electrónica de barrido (MEB), también conocido como SEM por sus siglas en inglés (“Scanning Electron Microscopy”)

El fundamento de esta técnica radica en la aceleración de un haz de electrones por la acción de un campo eléctrico, aprovechando así el comportamiento ondulatorio. Esto se realiza mediante diferencias de potencial de entre 50 a 30000 voltios. Los electrones acelerados salen del cañón y son enfocados mediante las lentes condensadoras y objetiva, reduciendo el diámetro del haz de electrones para obtener una mayor resolución. Este haz es usado para barrer la muestra punto por punto y línea por línea.

Los electrones irradiados interactúan con los átomos de la muestra provocando el desprendimiento de electrones secundarios con distinta energía. La señal de estos electrones es recogida por detectores y procesada posteriormente para obtener la imagen de barrido de la muestra.

## **3. Estabilidad de nanopartículas**

Asimismo, se estudió la estabilidad de las nanopartículas sintetizadas frente a distintas variables, como fueron pH del medio, luz, temperatura y contacto al aire.

### **3.a) Estabilidad de nanopartículas frente al pH:**

Se preparó una disolución de HCl 10% p/v y una disolución de NaOH 0,1 M para realizar dos experimentos. Para el primer experimento se tomaron 10 mL de disolución de nanopartículas y se agitaron a medida que se añadían gotas de la disolución de HCl. Mediante un pHmetro se fueron realizando medidas de la acidez del medio, hasta comprobar a qué pH se producía la degradación de las nanopartículas. El segundo experimento se realizó exactamente igual con la disolución de NaOH en lugar del HCl. Ambos experimentos se realizaron por triplicado.

### **3.b) Estabilidad de nanopartículas frente a la acción de la luz:**

Se prepararon seis muestras de las disoluciones, la mitad de las cuales fueron tapadas para evitar el contacto con la luz.

### **3.c) Estabilidad de nanopartículas frente a la temperatura:**

Se prepararon seis muestras de las disoluciones, la mitad de las cuales se dejaron a temperatura ambiente y la otra mitad se mantuvo en refrigeración a 5 °C.

### **3.d) Estabilidad de nanopartículas frente a la acción del aire:**

Se prepararon cuatro muestras de las disoluciones, la mitad de las cuales fueron selladas con parafina para evitar el intercambio gaseoso y la acción del oxígeno y reducir al máximo la contaminación microbiana.

## **4. Determinación de la quelación de metales**

En base a criterios de disponibilidad y conveniencia del estudio, se realizaron los siguientes experimentos únicamente en las TA-PVA NPs. Se realizaron ensayos con iones  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{FeCl}_3$ ),  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4$ ) y  $\text{ZnCl}_2$ . Los experimentos fueron evaluados tanto cualitativamente (aparición que quelato y estabilidad) como cuantitativamente (cantidad de metal quelado) de manera visual (aparición de coloración, coloides, sedimentación, homogeneidad) y por técnicas analíticas. Estas técnicas fueron la determinación colorimétrica mediante espectrofotometría de absorción molecular y espectrofotometría de absorción atómica con plasma de nitrógeno por microondas (MP-AES) (Li W et al., 2013) (Burriel, 1991)

Adicionalmente, en los estudios de quelación de iones férricos se estudió la variación en el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta respecto a la disolución de nanopartículas pura. En las nanopartículas PVA-PLGA se realizaron ensayos con sales disueltas en la fase interna acuosa ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ) y con los iones previamente quelatados ( $\text{PPD-Ag}^{2+}$ ,  $\text{TA-Fe}^{3+}$ ,  $\text{NH}_3\text{-Zn}^{2+}$ ). Los experimentos fueron evaluados cualitativamente del mismo modo que los anteriores.

Para los ensayos cuantitativos se prepararon disoluciones madre cobre y hierro. Para la disolución madre de cobre se utilizó sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) y se tomaron cantidades para obtener concentraciones de entre 10 mg/L y 20 mg/L en volúmenes de 10ml. Para la disolución madre de hierro se utilizó tricloruro de hierro hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) y se tomaron cantidades para obtener concentraciones de entre 10 mg/L y 20 mg/L en volúmenes de 10ml.

#### **4.a) Quelación cuantitativa de iones $\text{Fe}^{3+}$ a una concentración estática de iones férricos**

Después de un arduo proceso de optimización, se consiguió establecer las condiciones ideales para protocolizar los ensayos de quelación con  $\text{Fe}^{3+}$ . De una disolución madre formada a partir de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  se tomaron las cantidades necesarias para preparar diluciones de  $\text{Fe}^{3+}$  en concentraciones de 10ppm y se varió la cantidad de nanopartículas para comprobar la variación respecto a la quelación del mismo. Las cantidades de nanopartículas utilizadas fueron 20 $\mu\text{l}$ , 40 $\mu\text{l}$ , 60 $\mu\text{l}$ , 80 $\mu\text{l}$ , 100 $\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{l}$ , 400 $\mu\text{l}$  y 500 $\mu\text{l}$  y se enrasó con agua desionizada hasta un volumen total de 10ml.

La determinación de la cantidad de hierro quelado se hizo por diferencia del total de concentración de hierro de la muestra (10 mg/L) respecto al hierro ferroso medido por espectrofotometría colorimétrica. Para dicho estudio, se realizó un protocolo de análisis basado en un método que utiliza o-fenantrolina como reactivo para formar un quelato con Fe(II). El compuesto resultante se denomina ferroína y su absorbancia es medible a  $\lambda$  510 nm (Burriel, 1991)

#### **4.b) Quelación cuantitativa de iones $\text{Fe}^{3+}$ a una concentración variable de iones férricos**

Se diseñó y llevó a cabo un experimento en el que se variaron las concentraciones de iones férricos entre 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L y 20 mg/L. También se emplearon diferentes cantidades de nanopartículas en cada concentración para analizar la relación entre ambas variables. Se enrasaron con agua desionizada hasta un volumen total de 10ml. La determinación de la cantidad de hierro no quelado en la muestra se realizó mediante el mismo método colorimétrico que el empleado anteriormente.

#### **4.c) Quelación cuantitativa de iones $\text{Fe}^{3+}$ a una concentración estática de iones férricos y pH 5**

Se realizó un ensayo similar a los anteriores alterando el pH final de la disolución para observar si este factor tiene relevancia en la capacidad quelante de las nanopartículas..

#### **4.d) Quelación cuantitativa de iones $\text{Cu}^{2+}$**

Se llevaron a cabo los ensayos de quelación con  $\text{Cu}^{2+}$  con un método similar a los experimentos con el hierro. De una disolución madre formada a partir de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  se tomaron las cantidades necesarias para preparar diluciones de  $\text{Cu}^{2+}$  en concentraciones de 10 mg/L y se varió la cantidad de nanopartículas para comprobar la variación respecto a la quelación del mismo. Las cantidades de nanopartículas utilizadas fueron 250 $\mu\text{l}$ , 500 $\mu\text{l}$  y 900 $\mu\text{l}$  y se enrasó con agua desionizada hasta un volumen total de 10ml. La determinación de la cantidad de cobre no quelado en la muestra se realizó mediante plasma por microondas (MP-AES).

### **5. Ensayos microbiológicos**

Se diseñaron dos ensayos microbiológicos para comprobar la efectividad antibacteriana en las cepas anteriormente citadas de *Staphylococcus pseudointermedius* y *Pseudomonas aeruginosa*. El primero de ellos de carácter cualitativo y el segundo de carácter cuantitativo (determinación de Concentración Mínima Inhibitoria o CMI).

#### **5.a) Ensayo comparativo de tres métodos semicuantitativos de TA-PVA NPs en cepas de *Staphylococcus pseudointermedius* y *Pseudomonas aeruginosa*.**

En primer lugar, se realiza un primer experimento de carácter cualitativo o semicuantitativo para comprobar si estas nanopartículas poseen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus pseudointermedius* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se decide utilizar tres métodos distintos de instilación o colocación de las soluciones de nanopartículas en las placas de agar, ya que se desconoce la capacidad de las mismas para difundir a través del medio.

Se realiza una siembra en césped de 100 µl de cultivo líquido en las placas de agar TSA, tras lo cual se dejan secar en la campana de flujo laminar. Una vez seca la superficie se procede a la instilación de las diferentes suspensiones de nanopartículas por los tres métodos descritos a continuación:

- **Método del pocillo:** El primero de ellos es realizando un pocillo en el agar previamente sembrado. Para ello utilizaremos una cuchilla circular estéril (punch de biopsia dermatológica).
- **Método del disco:** El segundo de ellos es utilizando unos discos de papel estériles, que absorben la solución de nanopartículas.
- **Método de la gota:** El tercer método es depositar una gota directamente en la superficie de la placa y dejar secar durante unos minutos en la campana de flujo laminar.

Como controles se utilizarán PVA y ácido tánico. En cada método se ha utilizado un volumen de 20µl de producto. Una vez instilados, se incubó 48 horas a 37 °C. Para medir los resultados del método del pocillo y del método del disco se medirá el diámetro del halo de inhibición que aparece tras la incubación de la muestra.

#### **5.b) Ensayo de la utilización de TA-PVA NPs para la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus pseudointermedius*: método cuantitativo.**

Se utilizaron distintos volúmenes de medio de cultivo líquido TSB, TA-PVA NPs y agua destilada estéril para así obtener distintas concentraciones. El medio de cultivo líquido fue TSB triplemente concentrado, para que al mezclar con los otros componentes de la solución su concentración final sea la adecuada. A continuación, se prepararon cinco disoluciones “madre” con distintas concentraciones de nanopartículas para determinar la CMI de las mismas.

- A. Blanco. 600µl de medio TSB y 1,2 ml de H2O estéril.
- B. 600µl de medio TSB, 900 µl de H2O estéril y 300 µl de NPs.
- C. 600 µl de medio TSB, 600 µl de H2O estéril y 600 µl de NPs.
- D. 600 µl de medio TSB, 300 µl de H2O estéril y 900 µl de NPs.
- E. 600 µl de medio TSB y 1,2 ml de NPs.

Posteriormente se utilizaron tubos eppendorfs a los que se añadió un volumen de 300 µl procedentes de las soluciones “madre” previamente preparadas. Finalmente, se añadió un volumen de 5 µl del cultivo de la especie de *Staphylococcus* que fuese ensayada. Estos eppendorfs se colocan en una noria que va a permitir homogeneizar de manera continua las soluciones. Se incubó a 37 °C durante 24 horas. Una vez incubados, se utilizó una placa de micropocillos para medir la absorbancia a 600 nm de longitud de onda. Instilamos 200µl de cada eppendorf en su correspondiente pocillo para realizar la medición. Dichos valores de absorbancia indican la turbidez, que está directamente relacionada con la ausencia o presencia de crecimiento bacteriano en el medio. A mayor turbidez, mayor crecimiento.

### III.- RESULTADOS

#### 1. Síntesis de TA-PVA NPs y aspecto visual

El protocolo ha demostrado ser efectivo para sintetizar este tipo de nanopartículas de una manera rápida y sencilla. El aspecto de la disolución final es de un coloide blanco lechoso brillante, totalmente opaco al paso de la luz, sin grumos o sedimentos. Pueden aparecer burbujas o espuma debido a la presencia en exceso de PVA.



**Figura 4.** Aspecto de las nanopartículas sintetizadas exitosamente a partir de ácido tánico y alcohol polivinílico.

Los fenómenos principales identificados que han producido una síntesis no exitosa mejor de las nanopartículas han sido el uso de agua no desionizada (aparición de una ligera coloración por quelación de metales contaminantes en el agua), el uso de material que no estuviera completamente seco o con restos de disolvente orgánico como acetona (no formación de la nanopartícula y agregación de los componentes) y el uso de tampones iónicos en la síntesis para comprobar la estabilidad dependiente de pH. Todas las síntesis se han llevado a cabo en condiciones ambientales (temperatura 25 °C), en presencia de aire y luz y no se ha encontrado ninguna diferencia significativa entre las diferentes muestras analizadas.

Tras liofilizar las nanopartículas, se obtuvo un rendimiento de >99%. Estos datos están en concordancia con los observados en la bibliografía (Aguilera et al., 2016)

## **2. Estabilidad de las nanopartículas TA-PVA.**

Las nanopartículas se han mostrado estables frente a la formación de agregados durante todos los experimentos, mostrando los mismos resultados de tamaño y potencial hasta una semana después de su preparación.

### **2.a) Estabilidad de nanopartículas frente al pH:**

Se han realizado estudios con diferentes muestras comprobándose la degradación o no de las mismas de manera visual (desaparición del aspecto visual normal tras la modificación del pH) y mediante medidas del diámetro hidrodinámico y del potencial zeta. El pH de la solución tras la formación de las nanopartículas es de 4.5. Se ha comprobado que son estables a pH 1.5 (tras adición de ácido clorhídrico a la muestra) como límite inferior y a pH 6.5 (tras adición de una disolución de hidróxido de sodio) como límite superior. Su capacidad quelatante resultó dependiente del pH al que se encuentre el medio.

### **2.b) Estabilidad de nanopartículas frente a la acción de la luz:**

Las medidas de diámetro hidrodinámico y de potencial zeta resultaron equivalentes a las obtenidas en nanopartículas recién sintetizadas. No se mostraron diferencias entre ambos grupos de nanopartículas tras el ensayo.

### **2.c) Estabilidad de nanopartículas frente a la temperatura:**

Las medidas de diámetro hidrodinámico y de potencial zeta resultaron equivalentes a las obtenidas en nanopartículas recién sintetizadas. No se mostraron diferencias entre ambos grupos de nanopartículas tras el ensayo (la temperatura máxima alcanzada fueron 30 °C).

### 2.c) Estabilidad de nanopartículas frente a la acción del aire:

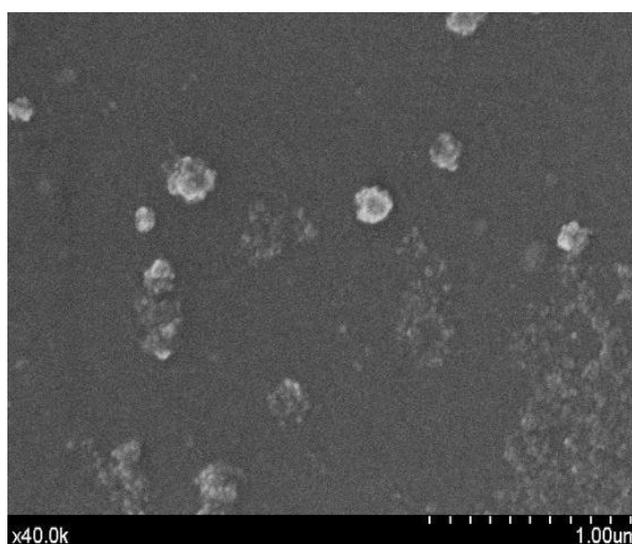
Se apreció degradación de las nanopartículas que no estaban selladas al final del experimento, perdiendo el color blanco opaco de la disolución. Esta degradación probablemente sea debida a la acción de microorganismos transportados por el aire.

### 3. Caracterización de nanopartículas mediante equipo Zetasizer Nano ZSP y observación al microscopio electrónico (MEB) en el equipo FEI Teneo

Las nanopartículas fueron diluidas en proporción 1:10 para la caracterización de las mismas mediante un equipo Zetasizer Nano ZSP, obteniéndose los siguientes resultados

	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta
<i>Nanopartícula A</i>	164.3	0.155	-19.1
<i>Nanopartícula B</i>	165.5	0.168	-20.7
<i>Nanopartícula C</i>	163.0	0.176	-20.1
<b>Promedio</b>	<b>164.3</b>	<b>0.16</b>	<b>-20.0</b>
<b>Desviación st</b>	<b>1.2</b>	<b>0.01</b>	<b>0.8</b>

**Tabla 1.** Datos obtenidos por medida mediante DLS y ELS en Zetasizer Nano ZSP tras la medida de tres muestras de nanopartículas TA-PVA.



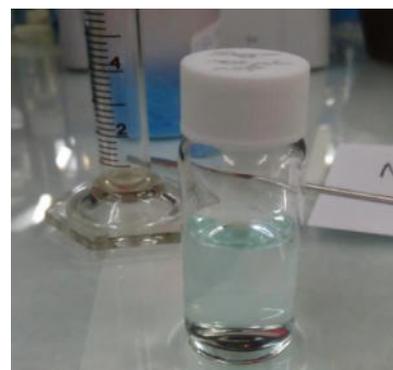
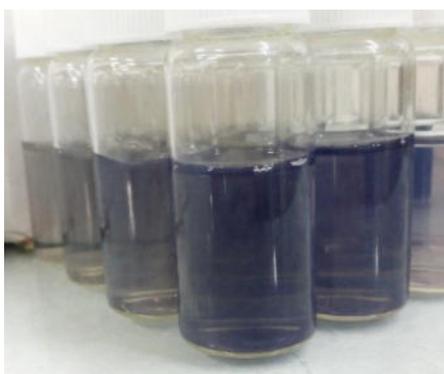
**Figura 5.** Imagen tomada mediante microscopía electrónica de barrido en el FEI Teneo (microscopio electrónico de barrido de alta resolución). Micrografía de las nanopartículas donde puede apreciarse el tamaño.

Los datos obtenidos indican un diámetro hidrodinámico aproximado de 164.3nm y caracterizan la muestra con monodispersidad por su bajo índice de polidispersión. Para corroborar estos datos se realizó la observación al microscopio electrónico (MEB). En la imagen se observa la esfericidad de las nanopartículas. El diámetro de las mismas se encuentra entre 120-130 nm, lo que explica el diámetro hidrodinámico obtenido por la técnica DLS anteriormente.

En cuanto al potencial zeta observado, las nanopartículas poseen una carga superficial de -20 mV, ligeramente negativa. Según la bibliografía, estos datos son prometedores corresponden a unas nanopartículas con baja toxicidad celular (Clogston y Patri, 2010).

#### **4. Determinación de la quelación de metales de las nanopartículas TA-PVA**

La visualización de la formación de un complejo de absorción entre el metal y la nanopartícula fue evidente en las muestras de hierro férrico y de cobre cúprico. En las muestras de hierro ferroso, zinc y plata no se observó formación de complejo, por lo que se dio preferencia a estudiar los complejos anteriores de forma cuantitativa.

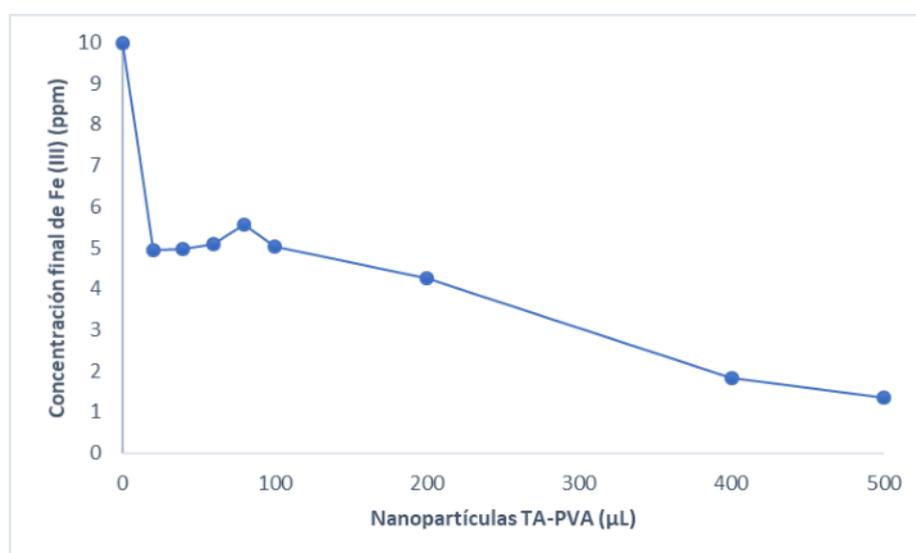


**Figuras 6 y 7.** A la izquierda (fig. 6), el complejo formado por nanopartículas TA-PVA y  $\text{Fe}^{3+}$ . A la derecha (fig. 7), el complejo formado por nanopartículas TA-PVA y  $\text{Cu}^{2+}$ .

4.a) Quelación cuantitativa de iones  $\text{Fe}^{3+}$  a una concentración estática de iones férricos y pH 4 (resultado de la disolución original):

TA-PVA NPs ( $\mu\text{l}$ )	Concentración final de $\text{Fe}^{3+}$ (mg/L)
0	$9.99 \pm 0.03$
20	$4.95 \pm 0.03$
40	$4.98 \pm 0.03$
60	$5.10 \pm 0.03$
80	$5.57 \pm 0.03$
100	$5.02 \pm 0.03$
200	$4.26 \pm 0.03$
400	$1.83 \pm 0.03$
500	$1.34 \pm 0.03$

**Tabla 2.** Datos obtenidos tras extrapolar la medida por espectrofotometría del complejo de ferroína formado entre el  $\text{Fe}^{2+}$  (obtenido tras reducir todo el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en la muestra) y la *o*-fenantrolina. La concentración original de hierro (III) presente en la muestra corresponde a 10 mg/L.



**Gráfica 1.** Representación de los datos obtenidos en la tabla 2.

Tras estos datos, observamos la disminución drástica de la concentración de iones férricos disueltos en la muestra tras la adición de diferentes cantidades de nanopartículas. Cabe destacar el mínimo observado tras añadir 20  $\mu\text{l}$  de TA-PVA NPs.

**4.b) Estudios de diámetro hidrodinámico y potencial Zeta de las nanopartículas queladas con Fe<sup>3+</sup>**

	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta
<i>Nanopartícula A</i>	187.7	0.130	2.13
<i>Nanopartícula B</i>	189.7	0.149	2.52
<i>Nanopartícula C</i>	185.6	0.130	1.75
<b>Promedio</b>	<b>187</b>	<b>0.136</b>	<b>2.1</b>
<b>Desviación st</b>	<b>2</b>	<b>0.011</b>	<b>0.4</b>

**Tabla 3.** Datos obtenidos por medida mediante DLS y ELS en Zetasizer Nano ZSP.

De los datos recogidos en la tabla se observa un aumento constante del diámetro hidrodinámico y del potencial zeta respecto a las soluciones de nanopartículas medidas anteriormente (tabla 1). Estos datos se explican por la formación de un complejo FeNP que aumenta el tamaño y neutraliza la carga superficial de las nanopartículas.

**4.c) Quelación cuantitativa de iones Fe<sup>3+</sup> a una concentración estática de iones férricos y pH 5:**

TA-PVA NPs (μL)	Concentración final de Fe <sup>3+</sup> (mg/L)
1000	<LOQ
900	<LOQ
700	<LOQ
600	<LOQ
500	<LOQ
400	<LOQ
300	<LOQ
200	<LOQ
100	0.38

**Tabla 4.** La concentración original de hierro disuelto en la muestra corresponde a 10 mg/L. “<LOQ” significa que la concentración de Fe (III) se encuentra por debajo del límite de medida del aparato.

Estos datos (tabla 4) en comparación con los obtenidos con anterioridad (tabla 2) indican que el pH de la disolución afecta en gran medida a la formación del complejo FeNP.

4.d) Quelación cuantitativa de iones  $Fe^{3+}$  a una concentración variable de iones férricos:

Nanopartículas TA-PVA ( $\mu$ L)	Hierro sobrenadante (mg/L)
50	10.86
75	15.16
100	14.52
200	13.16

Tabla 5. La concentración original de hierro disuelto en la muestra corresponde a 20 mg/L.

Nanopartículas TA-PVA ( $\mu$ L)	Hierro sobrenadante (mg/L)
50	8.73
75	10.57
100	10.84
200	8.58

Tabla 6. La concentración original de hierro disuelto en la muestra corresponde a 15 mg/L.

Nanopartículas TA-PVA ( $\mu$ L)	Hierro sobrenadante (mg/L)
50	5.41
75	6.25
100	6.3
200	4.1

Tabla 7. La concentración original de hierro disuelto en la muestra corresponde a 10 mg/L.

Nanopartículas TA-PVA ( $\mu$ L)	Hierro sobrenadante (mg/L)
50	2.2
75	1.66
100	1.7
200	0.66

Tabla 8. La concentración original de hierro disuelto en la muestra corresponde a 5 mg/L.

Los datos obtenidos en este ensayo (tablas 5, 6, 7 y 8) evidencian un alto poder quelatante de la nanopartícula para este metal, llegando en todos los ensayos a quelar el 50% del hierro (III) presente en la muestra. Como anteriormente, cabe destacar el mínimo que aparece tras la adición de la menor cantidad de TA-PVA NPs (gráfica 1).

4.e) Quelación cuantitativa de iones  $\text{Cu}^{2+}$  a una concentración estable de iones:

Nanopartículas	Cobre sobrenadante (mg/L) (1)	Cobre sobrenadante (mg/L) (2)	Cobre sobrenadante (mg/L) (3)	Promedio
TA-PVA				
250	8,22	9,01	9,92	<b>9,47</b>
500	9,55	9,23	9,91	<b>9,56</b>
900	8,43	8,56	8,84	<b>8,61</b>

Tabla 9. La concentración original de cobre disuelto en la muestra corresponde a 10 mg/L.

A pesar de la apreciación visual de la formación de un complejo de absorción entre el cobre y la nanopartícula, la captación del metal por parte de la misma es mucho más pobre que la del hierro en este ensayo.

- Ensayos microbiológicos

1. Ensayo comparativo de tres métodos semicuantitativos de TA-PVA NPs en cepas de *Staphylococcus pseudointermedius* y *Pseudomonas aeruginosa*..

Nanopartículas	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	Pocillo	Disco	Gota	Pocillo	Disco	Gota
1. PVA control	0	0	0	0	0	0
2. Ácido Tánico (Control)	3mm	0	+++	3mm	0	++
3. TA-PVA NPs	1mm	0	+	2mm	0	++

Tabla 10. El método de instilación en gota no permite medir cuantitativamente el resultado obtenido por tamaño como sí lo permiten los otros dos, por lo que se empleó una escala arbitraria de “0” a “+++” para indicar su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias.

En este ensayo observamos la inhibición del crecimiento bacteriano por parte de las nanopartículas en los métodos del pocillo y la gota. Probablemente la falta de efecto en el método del disco sea debido a una baja capacidad de difusión a través del agar.

**2. Ensayo de la utilización de nanopartículas de PVA-TA para la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus pseudintermedius*: método cuantitativo.**

	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4	Promedio	Desv. st
<b>A (blanco)</b>	0.815	0.910	0.847	0.854	<b>0.857</b>	<b>0.040</b>
<b>B (300 µL)</b>	0.072	0.015	0.027	0.014	<b>0.032</b>	<b>0.027</b>
<b>C (600 µL)</b>	0.067	0.016	0.043	0.023	<b>0.037</b>	<b>0.023</b>
<b>D (900 µL)</b>	0.064	0.008	0.074	0.034	<b>0.045</b>	<b>0.030</b>
<b>E (1200 µL)</b>	0.055	0.095	0.032	0.039	<b>0.055</b>	<b>0.014</b>

**Tabla 12.** Medida de la absorbancia de los pocillos tras la incubación a 37 °C de una alícuota de *Staphylococcus pseudintermedius*. A las medidas obtenidas directamente del aparato se les restó el un valor de blanco previamente obtenido.

Como en el primer rango se aprecia una disminución marcada de la absorbancia, mostrando por lo tanto una clara inhibición del crecimiento bacteriano se decide repetir el experimento con un rango más corto de volumen de nanopartículas para la determinación de la CMI (concentración mínima inhibitoria):

	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Promedio	Desv. st.
<b>A(10µl)</b>	0,51	0,488	0,458	<b>0,485</b>	<b>0,021</b>
<b>B(20µl)</b>	0,259	0,439	0,361	<b>0,353</b>	<b>0,090</b>
<b>C(30µl)</b>	0,114	0,165	0,225	<b>0,168</b>	<b>0,056</b>
<b>D(40µl)</b>	0,041	0,124	0,053	<b>0,073</b>	<b>0,045</b>
<b>E(50µl)</b>	0,003	0,03	0,004	<b>0,012</b>	<b>0,015</b>
<b>F(60µl)</b>	-0,03	0,053	-0,027	<b>-0,001</b>	<b>0,047</b>

**Tabla 13.** Medida de la absorbancia de los pocillos tras la incubación a 37 °C de una alícuota de *Staphylococcus pseudintermedius*. A las medidas obtenidas directamente del aparato se les restó el un valor de blanco previamente obtenido.

En este caso, es posible apreciar una notable disminución del valor de la absorbancia a partir de los 40 µL de nanopartículas, por lo que se concluye que la CMI<sub>90</sub> es de 112 µg/mL para las TA-PVA NPs en esta cepa de *Staphylococcus pseudintermedius*. Aunque es algo superior a otros antibióticos (Rubin et al., 2011), la sinergia de los posibles mecanismos de acción diferente es una buena oportunidad para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos a partir de este trabajo.

## V.- CONCLUSIONES

El trabajo experimental realizado constituye una nueva línea de investigación multidisciplinar dentro de nuestro grupo de investigación en la que se ha explorado el potencial de nuevas nanopartículas (TA-PVA NPs) como posibles alternativas al uso de antimicrobianos clásicos, debido a la creciente incidencia de resistencias bacterianas descritas en la última década.

Las nanopartículas obtenidas han sido caracterizadas para describir las propiedades más relevantes mediante las técnicas habitualmente utilizadas y descritas en la bibliografía. Así, para el sistema TA-PVA NPs se ha observado un diámetro hidrodinámico de 164.3 nm (en concordancia con las imágenes obtenidas mediante MEB), con un potencial de superficie de -20 mV (ligeramente negativo) y una buena distribución de tamaños de las nanopartículas de la muestra (PDI: 0.16). Además, se ha demostrado que poseen una alta estabilidad frente a procesos de degradación, lo que indica un buen perfil para su futura utilización.

Por otro lado, se ha demostrado una muy alta capacidad quelante con Fe (III) por parte de estas nanopartículas, debido a los enlaces con el ácido tánico presente en las mismas. La optimización de la quelación de nuevos metales, y en concreto la optimización de la quelación de cobre, es potencialmente uno de los próximos pasos a realizar en la investigación futura con estas nuevas nanopartículas.

Muy interesante, es la capacidad bactericida de estas entidades químicas frente a las especies de microorganismos estudiadas (*Staphylococcus pseudintermedius* y *Pseudomonas aeruginosa*), en las que ha sido posible determinar la concentración mínima inhibitoria de nanopartículas necesaria para detener el crecimiento de *Staphylococcus pseudintermedius*, ofreciendo una nueva posibilidad para la lucha frente a la multiresistencia que suele aparecer en ésta y otras especies del mismo género y que ha sido realizada en colaboración con el Departamento de Microbiología de la misma Facultad.

Como complemento a estos estudios y descrito en un TFM en colaboración con el anteriormente mencionado Departamento, es interesante resaltar que se están

obteniendo resultados prometedores en estudios que han continuado empleando estas nanopartículas cargadas con hierro y que se han demostrado ser eficientes biofortificadores.

## VI.- BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilera JR, Venegas V, Oliva JM, Sayagués MJ, de Miguel M, Sánchez-Alcázar JA et al. Targeted multifunctional tannic acid nanoparticles. *RSC Adv.* 2016; 6(9): 7279-7287.
2. Ahamed M Alhadlaq HA, Khan MA, Majeed K, Ponmurugan A-D, Naif A. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Copper Oxide Nanoparticles. *J Nanomater.* 2014; 3: 1-4.
3. Ahmad T. Reviewing the Tannic Acid Mediated Synthesis of Metal Nanoparticles. *J Nanotechnol.* 2014; 1: 1-11.
4. Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *J Adv Res.* 2016; 7(1): 17-28.
5. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Rafailovich M. Antimicrobial effects of TiO<sub>2</sub> and Ag<sub>2</sub>O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. *Future Microbiol.* 2011; 6(8): 933-940.
6. Angjellari M, Tamburri E, Montaina L, Natali M, Passeri D, Rossi M et al. Beyond the concepts of nanocomposite and 3D printing: PVA and nanodiamonds for layer-by-layer additive manufacturing. *Mater Design.* 2017; 119: 12-21.
7. Astruc M-C, y Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem Rev.* 2004; 104: 293-346.
8. Aswathy Aromal S, y Phillip D. Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its size-dependent catalytic activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2012; 97: 1-5.
9. Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 6003-6009.
10. Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Memic A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 3527-3535.
11. Azhar Shekoufeh Bahari L, y Hamishehkar H. The Impact of Variables on Particle Size of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers; A Comparative Literature Review. *Adv Pharm Bull* 2016; 6(2): 143-151.
12. Batista AG, Ferrari, AS, da Cunha DC, da Silva JK, Cazarin CB, Correa LC et al. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chem* 2016; 197 Pt B: 1153-1159.
13. Begines B, Alcudia A, Aguilera JR, Martinez G, He Y, Wildman R et al. Design of highly stabilized nanocomposite inks based on biodegradable polymer-matrix and gold nanoparticles for Inkjet Printing. *Sci Rep-UK.* 2019; 9(1): 16097.

14. Bhatia S. *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. 1ª Edición. Nueva York: Springer; 2016.
15. Braun A, Couteau O, Franks K, Kestens V, Roebben G, Lamberty A et al. Validation of dynamic light scattering and centrifugal liquid sedimentation methods for nanoparticle characterisation. *Adv Powder Technol*. 2011; 22(6): 766-770.
16. Burriel F, Lucena F, Arribas S, Hernández J. *Química analítica cualitativa*. 18ª Edición. Madrid: Thomson Paraninfo, S.A.; 2006.
17. Cai X, Gao Y, Sun Q, Chen Z, Megharaj M, Naidu R. Removal of co-contaminants Cu (II) and nitrate from aqueous solution using kaolin-Fe/Ni nanoparticles. *Chem Eng J*. 2014; 244: 19-26.
18. Chakrabarty T, Pérez-Manríquez L, Neelakanda P, Peinemann K-V. Bioinspired tannic acid-copper complexes as selective coating for nanofiltration membranes. *Sep Purif Technol*. 2017; 184: 188-194.
19. Clogston JD y Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol*. 2011; 697: 63-70.
20. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018; 10(2).
21. Di Sotto A, Di Giacomo S, Toniolo C, Nicoletti M, Mazzanti G. *Sisymbrium Officinale* (L.) Scop. and its Polyphenolic Fractions Inhibit the Mutagenicity of Tert-Butylhydroperoxide in *Escherichia Coli* WP2uvrAR Strain. *Phytother Res* 2016; 30(5): 829-834.
22. Dizaj SM, Lotfipour F, Barzegar-Jalali M, Zarrintan MH, Adibkia K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014; 44: 278-284.
23. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*. 2003; 5(13): 1213-1219.
24. Egger S, Lehmann RP, Height MJ, Loessner MJ, Schuppler M. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(9): 2973-2976.
25. Farady, M. X. The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philos. Trans. R. Soc. Lond*. 2004; 147: 145-181.
26. Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chem*. 2004; 15(4): 897-900.
27. Granqvist CG, Buhrman RA, Wyns J, Sievers AJ. Far-Infrared Absorption in Ultrafine Al Particles. *Phys Rev Lett*. 1976; 37(10): 625-629.
28. Gülçin İ, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab J Chem*. 2010; 3(1): 43-53.

29. Hassan H y Hameed BH. Fe–clay as effective heterogeneous Fenton catalyst for the decolorization of Reactive Blue 4. *Chem Eng J.* 2011; 171(3): 912-918.
30. Hunter RJ. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications.* 1ª Edición. Estados Unidos: Academic Press; 1981.
31. Iavicoli I, Fontana L, Leso V, Bergamaschi A. The effects of nanomaterials as endocrine disruptors. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(8): 16732-16801.
32. Irshad R, Tahir K, Li B, Ahmad A, Siddiqui A, Nazir S. Antibacterial activity of biochemically capped iron oxide nanoparticles: A view towards green chemistry. *J Photochem Photobiol B* 2017; 170: 241-246.
33. Jang S, Seo Y, Choi J, Kim T, Cho J, Kim S et al. Sintering of inkjet printed copper nanoparticles for flexible electronics. *Scripta Mater.* 2010; 62(5): 258-261.
34. Khaled SA, Burley JC, Alexander MR, Roberts CJ. Desktop 3D printing of controlled release pharmaceutical bilayer tablets. *Int J Pharm.* 2014; 461(1-2): 105-111.
35. Kim TJ, Silva JL, Kim MK, Jung YS. Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. *Food Chem* 2010; 118(3): 740-746.
36. Kiss LB, Söderlund J, Niklasson GA, Granqvist CG. New approach to the origin of lognormal size distributions of nanoparticles. *Nanotechnology.* 1999; 10(1): 25-28.
37. Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv Mater* 2014; 26(19): 3124-3130.
38. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Roy Soc Med.* 2002; 95 Suppl 41(Suppl 41): 22–26.
39. Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. I. *J. Am. Chem. Soc.* 1917; 39(9): 1848-1906.
40. Lee JH, Park JH, Cho HS, Joo SW, Cho MH, Lee J. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling* 2013; 29(5): 491-499.
41. Li W, Simmons P, Shrader D, Herrman TJ, Dai SY. Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. *Talanta.* 2013 112: 43-48.
42. Linsinger TPJ, Roebben G, Solans C, Ramsch R. Reference materials for measuring the size of nanoparticles. *Trac Trend Anal Chem.* 2011; 30(1): 18-27.
43. Liu Q, Zhang M, Fang ZX, Rong XH. Effects of ZnO nanoparticles and microwave heating on the sterilization and product quality of vacuum-packaged Caixin. *J Sci Food Agric.* 2014; 94(12): 2547-2554.
44. Liu W, Wu Y, Wang C, Li HC, Wang T, Liao CY et al. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology* 2010; 4(3): 319-330.

45. Lok CN, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H et al. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *J Proteome Res.* 2006; 5(4): 916-924.
46. Maattanen A, Ihalainen P, Pulkkinen P, Wang S, Tenhu H, Peltonen J. Inkjet-printed gold electrodes on paper: characterization and functionalization. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2012; 4(2): 955-964.
47. Malarkodi C, Rajeshkumar S, Paulkumar K, Vanaja M, Gnanajobitha G, Annadurai G. Biosynthesis and Antimicrobial Activity of Semiconductor Nanoparticles against Oral Pathogens. *Bioinorg Chem Appl.* 2014; 14: 347167.
48. Maura D y Rahme LG. Pharmacological Inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* MvFR Quorum-Sensing System Interferes with Biofilm Formation and Potentiates Antibiotic-Mediated Biofilm Disruption. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(12).
49. Menten-Colak S, Yapici B, Yapici A. Determination of antimicrobial activity of tannic acid in pickling process. *Rom Biotech Lett.* 2010; 15(3).
50. Mohanraj VJ and Y. Chen. Nanoparticles - A Review. *Trop J Pharm Res.* 2007; 5 (1): 561-573
51. Murphy SV y Atala A. 3D Bioprinting of Tissues and Organs. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(8): 773-785.
52. Padmavathy N, y Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study. *Sci Technol Adv Mater.* 2008; 9(3): 035004.
53. Park HS, Koduru JR, Choo KH, Lee B. Activated carbons impregnated with iron oxide nanoparticles for enhanced removal of bisphenol A and natural organic matter. *J Hazard Mater* 2015; 286: 315-324.
54. Park T, Kim WI, Kim BJ, Lee H, Choi IS, Park JH et al. Salt-Induced, Continuous Deposition of Supramolecular Iron(III)-Tannic Acid Complex. *Langmuir.* 2018; 34(41): 12318-12323.
55. Patra CR, Bhattacharya R, Wang E, Katarya A, Lau JS, Dutta S et al. Targeted delivery of gemcitabine to pancreatic adenocarcinoma using cetuximab as a targeting agent. *Cancer Res.* 2008; 68(6): 1970-1978.
56. Peng G, Tisch U, Adams O, Hakim M, Shehada N, Broza YY et al. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol.* 2009; 4(10): 669-673.
57. Ponder SM Darab JG, Mallouk TE. Remediation of Cr(VI) and Pb(II) Aqueous Solutions Using Supported, Nanoscale Zero-valent Iron." *Environ Sci Technol.* 2000; 34(12): 2564-2569.
58. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegou L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011; 50(3): 586-621.

59. Ranoszek-Soliwoda K, Tomaszewska E, Socha E, Krzyczmonik P, Ignaczak A, Orłowski P et al. The role of tannic acid and sodium citrate in the synthesis of silver nanoparticles. *J Nanopart Res* 2017; 19(8): 273.
60. Redhead HM, Davis SS, Illum L. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *J Control Release* 2001; 70(3): 353-363.
61. Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals." *Can Vet J.* 2011; 52(2): 153-157.
62. Rybtke M, Hultqvist LD, Givskov M, Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. *J Mol Biol.* 2015; 427(23): 3628-3645.
63. Seil JT y Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature." *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 2767-2781.
64. Stefaniak AB. Principal Metrics and Instrumentation for Characterization of Engineered Nanomaterials. En: Mansfield E, editora. *Metrology and Standardization of Nanotechnology: Protocols and Industrial Innovations.* 1ª Edición. Weinheim (Alemania): Wiley-VCH; 2017. p 151-173.
65. Strambeanu N, Demetrovici L, Dragos D, Lungu M. Nanoparticles: Definition, Classification and General Physical Properties. En: Lungu M., editor. *Nanoparticles' Promises and Risks.* Edición 2015. Nueva York: Springer; 2015. p. 3-8.
66. Sun K, Wei TS, Ahn BY, Seo JY, Dillon SJ, Lewis JA. 3D printing of interdigitated Li-ion microbattery architectures. *Adv Mater* 2013; 25(33): 4539-4543.
67. Thompson DT. Using gold nanoparticles for catalysis. *Nano Today.* 2007; 2(4): 40-43.
68. Turner, T. Transparent Silver and Other Metallic Films. *P. Roy. Soc. A-Math. Phy.* 1908; 81(548): 301-310.
69. Usman MS, El Zowalaty ME, Shameli K, Zainuddin N, Salama M, Ibrahim NA. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 4467-4479.
70. Van Duijkeren E, El Zowalaty ME, Shameli K, Zainuddin N, Salama M, Ibrahim NA et al. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemoth.* 2011; 66(12): 2705-2714.
71. Van Hoovels L, Vankeerberghen A, Boel A, Van Vaerenbergh K, De Beenhouwer H. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(12): 4609-4612.
72. Wang X, Jiang M, Zhou Z, Gou J, Hui D. 3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective. *Compos Part B-Eng.* 2017; 110: 442-458.

73. Weese JS y van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 2010; 140(3-4): 418-429.
74. Wimpenny DI, Pandey PM, y Kumar LJ. *Advances in 3D Printing & Additive Manufacturing Technologies*. 1ª Edición. Singapur: Springer, 2017.
75. Wozniak D et al. Comparison of Polyphenol Profile and Antimutagenic and Antioxidant Activities in Two Species Used as Source of *Solidaginis herba* - Goldenrod. *Chem Biodivers.* 2018; 15(4): e1800023.
76. Wu H-Q, Wei X-W, Shao M-W, Gu J-S, Qu M-Z. Synthesis of copper oxide nanoparticles using carbon nanotubes as templates. *Chem Phys Lett.* 2002; 364(1): 152-156.
77. Xie Y, He Y, Irwin PL, Jin T, Shi X. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(7): 2325-2331.
78. Yun H, Kim JD, Choi HC, Lee CW. Antibacterial Activity of CNT-Ag and GO-Ag Nanocomposites Against Gram-negative and Gram-positive Bacteria. *B Korean Chem Soc.* 2013; 34(11): 3261-3264.
79. Zinjarde S. Bio-inspired nanomaterials and their applications as antimicrobial agents. *Chron Young Sci.* 2012; 3(1).
80. Zsigmondy RA. (1926). Property of colloids, Nobel lecture. [en línea]. [Consultado en Septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1925/zsigmondy/lecture/>