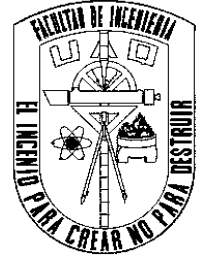




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



FACULTAD DE INGENIERÍA

**“Desarrollo de nanopartículas de magnetita con
recubrimiento polimérico para la evaluación de su efecto
antimicrobiano”**

TESIS INDIVIDUAL

Para obtener el grado de:
Ingeniera en Nanotecnología

Presenta:
Daniela Montes Morales

Directora de tesis:
Dra. Alejandra Álvarez López

Santiago de Querétaro, Querétaro, 2022



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Desarrollo de nanopartículas de magnetita con
recubrimiento polimérico para la evaluación de su
efecto antimicrobiano

por

Daniela Montes Morales

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGLIN-235988



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



FACULTAD DE INGENIERÍA

Ingeniería en Nanotecnología

“Desarrollo de nanopartículas de magnetita con recubrimiento polimérico para la evaluación de su efecto antimicrobiano”

TESIS INDIVIDUAL

Para obtener el grado de:
Ingeniera en Nanotecnología

Presenta:
Daniela Montes Morales


Dirigido por:
Dra. Alejandra Álvarez López


Dra. Alejandra Álvarez López
Presidente


Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa
Secretario


Dr. Aarón Rodríguez López
Vocal

Dra. Vanessa Vallejo Becerra
Sinodal









Santiago de Querétaro, Querétaro, 2022

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a mi familia, profesores y amigos, a quienes les agradezco infinitamente todo el apoyo que me brindaron.

Quiero comenzar agradeciendo a mis papás, que me han dado todo y me han apoyado siempre con mucha dedicación a lo largo de mis estudios y de mi vida en general. También a mi hermana Ximena, mi mejor amiga, que siempre ha estado para escucharme, apoyarme y darme ánimos, le agradezco por creer en mí.

A mi asesora de tesis, la doctora Alejandra Álvarez López y al doctor Juan de Dios Galindo de la Rosa, les agradezco por haberme tenido tanta paciencia, por haber creído en mí, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por su asesoramiento y por el tiempo y dedicación que me brindaron.

A mis sinodales, que dedicaron su tiempo para la lectura y revisión de este trabajo, y me brindaron observaciones y correcciones muy valiosas.

A todos mis amigos del Laboratorio de Biosensores y de los laboratorios vecinos, pues a su lado pasé muy buenos momentos y aprendí mucho de cada uno. Quiero agradecer especialmente a aquellos que me ayudaron con la realización de las pruebas de cinética bacteriana, pasando una noche en vela trabajando.

Agradezco a mis queridas amigas Dulce, Carina, Liliana y Sharon por ser mis compañeras de lágrimas y alegrías durante nuestra etapa universitaria y que siempre están ahí en los buenos y en los malos momentos. Sé que también es gracias a ellas que me fue posible alcanzar este logro.

A todos mis amigos, primos, tías y abuelita que se preocupan por mí y que me preguntaron tantas veces cómo iba con mi tesis.

Tengo que agradecerme a mí misma, porque muchas veces dudé de mí y consideré

el rendirme, pasé por procesos difíciles de depresión y ansiedad. Pero he logrado llenarme de valor y levantarme, incluso hoy puedo ver mi tesis terminada y me lo agradezco.

A la energía divina que nunca me abandonó y me iluminó en los momentos más necesarios, muchas gracias.

RESUMEN

El combatir microorganismos patógenos es de suma importancia tanto para una serie de sectores industriales como para la salud pública. Diversas bacterias han desarrollado resistencia a agentes antimicrobianos, convirtiéndose en una gran amenaza para la humanidad. Debido a ello surge la necesidad de diseñar nuevas estrategias no convencionales para combatir bacterias patógenas. En este trabajo se sintetizaron y evaluaron formulaciones nanotecnológicas como posibles agentes antibacterianos. Se prepararon nanopartículas de magnetita empleando un método de síntesis electroquímico mediante pulsos de potencial asimétricos. Se modificaron superficialmente con diferentes recubrimientos poliméricos, para lo que se emplearon 3 polímeros biocompatibles: quitosano, polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona (PVP). Las nanopartículas sintetizadas con y sin modificación superficial se caracterizaron por difracción de rayos X (XRD), determinando así la obtención exitosa de magnetita. Empleando la información de los difractogramas se calculó el parámetro de red y se estimó el tamaño de partícula mediante la ecuación de Scherrer., microscopía electrónica de barrido (SEM). Se estudió la actividad antibacteriana tanto de las partículas de magnetita desnudas como de los materiales modificados con polímeros contra una bacteria grampositivo, *Staphylococcus aureus*, y una gramnegativo, *Pseudomonas aeruginosa*, realizando estudios de cinética de crecimiento bacteriano y conteo de colonias en placa a diferentes concentraciones. Los resultados mostraron que las nanopartículas de magnetita mejoran su efecto antibacteriano al ser recubiertas por alguno de los polímeros que se emplearon, además de incrementar su eficacia a bajas concentraciones. Las nanopartículas modificadas con quitosano mostraron una mayor actividad bacteriostática frente a ambas bacterias.

Palabras clave: nanopartículas de magnetita, electroquímica, polímero biocompatible, agente antibacteriano, resistencia bacteriana.

ABSTRACT

Pathogenic microorganisms are one of the most important safety concerns for both industrial sectors and public health. Several bacteria have developed resistance to antimicrobial agents, becoming a serious health problem. Due to this, the need arises to design new non-conventional strategies to combat pathogenic bacteria. In this research, nanotechnological formulations were synthesized and evaluated as possible antibacterial agents. Magnetite nanoparticles were prepared by an electrochemical synthesis method using asymmetric potential pulses. They were superficially modified with different polymeric coatings, for which three biocompatible polymers were used: chitosan, polyethylene glycol (PEG) and polyvinylpyrrolidone (PVP). The synthesized nanoparticles with and without surface modification were characterized by X-ray diffraction (XRD), thus determining the successful synthesis of magnetite. Using the information from diffractograms, lattice parameter was calculated and particle size was estimated using Scherrer equation. The antibacterial activity of both naked magnetite particles and polymer-modified materials were studied against a gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus*, and a gram-negative bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*. Kinetic studies on bacteria growth were performed as well as the standard plate count method using different treatment concentrations. Results shows that magnetite nanoparticles improve their antibacterial effect when coated with anyone of the polymers used in this stud. In addition, coated noparticles increased their efficacy at low concentrations. Chitosan-modified nanoparticles showed higher bacteriostatic activity against both bacteria.

Keywords: magnetite nanoparticles, electrochemistry, biocompatible polymer, antibacterial agent, bacterial resistance.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	15
CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	17
2.1. Bacterias resistentes	17
2.2. Nanotecnología	19
2.2.1. Nanopartículas antimicrobianas	22
2.3. Nanopartículas de magnetita	26
2.3.1. Propiedades	27
2.3.1.1 Magnetita en bulto	27
2.3.1.2 Magnetita nanométrica	28
2.3.2 Métodos de síntesis	30
2.3.2.1 Métodos físicos	31
2.3.2.2 Métodos biológicos	32
2.3.2.3 Métodos químicos	32
2.3.2.3.1. Microemulsión	32
2.3.2.3.2. Sol-Gel	33
2.3.2.3.3. Co-precipitación química	33
2.3.2.4 Métodos electroquímicos	34
2.3.2.4.1. Mecanismo de reacción	37
2.4 Modificación superficial	41
2.4.1. Quitosano	43
2.4.2. Polivinilpirrolidona	44
2.4.3. Polietilenglicol	44
2.5 Generalidades sobre las bacterias	44
2.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	46
2.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	50
3.1. Hipótesis	50
3.2. Objetivo general	50

3.3. Objetivos específicos	50
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA	52
4.1. Síntesis electroquímica de nanopartículas de magnetita	52
4.1.1 Selección de pulsos	53
4.1.2 Síntesis electroquímica	54
4.1.3 Obtención de polvos	54
4.2. Modificación superficial con polímeros	55
4.3. Caracterización fisicoquímica	55
4.3.1. Difracción de rayos X	55
4.4. Estudios microbiológicos	56
4.4.1 Cinética de crecimiento bacteriano	56
4.4.2 Conteo en placa	59
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
5.1. Síntesis de nanopartículas	60
5.1.1. Selección de pulsos y potenciales	61
5.1.1.1. Voltamperometría lineal	61
5.1.1.2. Cronoamperometría	63
5.1.2. Pulsos asimétricos	65
5.2. Modificación superficial	69
5.3. Difracción de rayos X	73
5.4. Cinética microbiana	79
5.5. Conteo en placa	87
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	95
CAPÍTULO 7. REFERENCIAS	97
ANEXOS	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Métodos de síntesis de nanopartículas de magnetita	31
Figura 2. Diseño experimental	53
Figura 3. Cepa de <i>S. aureus</i> aislada en medio manitol-sal	58
Figura 4. Potencial de circuito abierto	60
Figura 5. Voltamperograma en sentido catódico	61
Figura 6. Diagrama de Pourbaix para el sistema Fe-H ₂ O a 25°C	62
Figura 7. Voltamperograma en sentido anódico	63
Figura 8. Cronoamperograma en sentido catódico	64
Figura 9. Cronoamperograma en sentido anódico	65
Figura 10. Primer minuto de síntesis de magnetita por pulsos de potencial asimétricos	66
Figura 11. Comportamiento de la corriente durante la síntesis electroquímica de magnetita por pulsos de potencial asimétricos	67
Figura 12. a) Celda electroquímica al inicio de la síntesis, b) después de 10 min y c) al finalizar las 2 horas	68
Figura 13. Nanopartículas de magnetita en solución	69
Figura 14. Izquierda: Solución de ácido acético, PVP y nanopartículas de magnetita en el minuto 1. Derecha: Solución después de 20 horas	70
Figura 15. Representación de nanopartícula de magnetita	71
Figura 16. Modificación superficial de las nanopartículas de magnetita con PVP mediante enlaces puente de hidrógeno	71
Figura 17. Modificación superficial de las nanopartículas de magnetita con quitosano mediante enlaces puente de hidrógeno	72
Figura 18. Modificación superficial de las nanopartículas de magnetita con quitosano mediante enlaces puente de hidrógeno y enlaces covalentes	72
Figura 19. Polvos de a) nanopartículas de magnetita desnudas,	73

b) M-PEG, c) M-Q y d) M-PVP	
Figura 20. Difractogramas de los materiales sintetizados	75
Figura 21. Pico característico (311) de las nanopartículas de magnetita sintetizadas comparado con magnetita y maghemita (Cornell & Schwertmann, 2003)	76
Figura 22. Curvas de cinética de crecimiento durante 24 horas de <i>S. aureus</i> con diferentes tratamientos	79
Figura 23. Curvas de cinética de crecimiento durante 12 horas de <i>S. aureus</i>	81
Figura 24. Curvas de cinética de crecimiento durante 24 horas de <i>P. aeruginosa</i> con diferentes tratamientos	83
Figura 25. Curvas de cinética de crecimiento durante 12 horas de <i>P. aeruginosa</i>	84
Figura 26. Diferencias estructurales en las bacterias grampositivo y gramnegativo	85
Figura 27. Fotografías de las pruebas de conteo en placa contra la bacteria <i>S. aureus</i>	89
Figura 28. Fotografías de las pruebas de conteo en placa contra la bacteria <i>P. aeruginosa</i>	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de estudios respecto al efecto microbiano de nanopartículas	24
Tabla 2. Propiedades de la magnetita	29
Tabla 3. Estudios de síntesis de nanopartículas de magnetita por métodos electroquímicos	34
Tabla 4. Cálculos a partir de los resultados XRD	78
Tabla 5. Cálculos a partir de las pruebas de conteo en placa contra <i>S. aureus</i>	90
Tabla 6. Cálculos a partir de las pruebas de conteo en placa contra <i>P. aeruginosa</i>	94

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Los agentes antibacterianos son fundamentales para prevenir y combatir enfermedades infecciosas. Sin embargo, con su uso excesivo se ha propiciado la aparición de microorganismos resistentes (Hajipour et al., 2012).

Con el descubrimiento de la penicilina en 1928 y el consiguiente uso indiscriminado de antibióticos desde la década de 1940, una larga lista de bacterias patógenas, incluidas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacter cloacae*, han aumentado rápidamente su resistencia a los antibióticos, convirtiéndose en uno de los 10 problemas de salud pública más críticos a nivel mundial de la actualidad (S. Tang & Zheng, 2018).

Las infecciones bacterianas siguen siendo una de las principales causas de mortalidad (Mihai et al., 2020). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, las bacterias resistentes a los antibióticos provocan la muerte de unas 700,000 personas cada año en todo el mundo, y se prevé que este número aumente a 10 millones de muertes para el año 2050 (Y. Wang et al., 2020).

En general, la resistencia es la capacidad de los microorganismos para sobrevivir al efecto de agentes antimicrobianos (Maillard, 2012). Cabe mencionar que los microorganismos no solo desarrollan resistencia a antibióticos, sino que también frente a desinfectantes y antisépticos (Gnanadhas et al., 2013). De hecho, el uso de cualquier agente antimicrobiano impone una presión selectiva que da lugar a microorganismos resistentes (Lineback et al., 2018), ya sea hacia una sustancia específica o el desarrollo de resistencia cruzada hacia múltiples agentes antibacterianos, incluyendo antibióticos (Zhelev, 2021).

Además de inducir el desarrollo de resistencia, los agentes antibacterianos convencionales presentan otros inconvenientes, como los terribles efectos

secundarios derivados de su toxicidad y de la administración de altas dosis. Entre estos efectos se encuentran reacciones alérgicas, irritación e inflamación de diferentes órganos, alteración de la flora intestinal, problemas gastrointestinales, neurotoxicidad, daño renal y hepático, entre muchos otros. Asimismo, las dosis necesarias para combatir a los microorganismos cada vez son mayores, lo que aumenta su toxicidad y hace que los tratamientos sean muy costosos (Crawford et al., n.d.; Mohsen et al., 2020; Su et al., 2019).

Para abordar estos desafíos, se han dedicado grandes esfuerzos para combatir las infecciones bacterianas y la resistencia a agentes antibacterianos, y se ha planteado la necesidad de desarrollar estrategias alternativas, entre las que se encuentran el uso de péptidos antimicrobianos, terapia con fagos, anticuerpos terapéuticos, inhibidores de quorum sensing y nanopartículas antimicrobianas (Rodrigues et al., 2019).

En particular, la nanotecnología ha obtenido un éxito notable en las aplicaciones antibacterianas, mostrando un gran potencial para revolucionar las estrategias libres de antibióticos, pues los nanomateriales tienen una gran variedad de composiciones y, por lo tanto, ofrecen una serie de ventajas únicas.

La aplicación de soluciones nanotecnológicas, como el uso de nanopartículas, es una manera novedosa para enfrentar el problema de la resistencia bacteriana. Especialmente, las nanopartículas metálicas son prometedores agentes antimicrobianos (Slavin et al., 2017).

Las nanopartículas de magnetita se consideran como uno de los nanomateriales más populares que se investigan en la actualidad, debido a que presenta buenas propiedades y grandes ventajas en su uso en diferentes aplicaciones, como disponibilidad, bajo costo, versatilidad y bioseguridad (Niculescu et al., 2021). Presenta además una baja toxicidad y es biocompatible, además de tener un efecto antimicrobiano (Mashjoor et al., 2018).

CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Bacterias resistentes

Se define como antimicrobianos a los agentes capaces de matar microorganismos o de detener su crecimiento. Los principales tipos de agentes antimicrobianos son los desinfectantes, antisépticos y antibióticos: los desinfectantes son sustancias que matan a una gran variedad de microorganismos de manera no selectiva, siendo aplicados sobre superficies inertes; los antisépticos son sustancias que se aplican sobre tejido vivo para reducir un riesgo de infección; y los antibióticos son un tipo de medicamentos usados para combatir bacterias. (Turner, 2018).

Así mismo, dentro de los agentes antimicrobianos encontramos los agentes antifúngicos, que se encargan del control de hongos patógenos, y agentes antibacterianos, encargados ya sea de producir la muerte de bacterias (agente bactericida) o de detener su crecimiento (agente bacteriostático) (Hajipour et al., 2012).

En general, la resistencia es la capacidad que tienen los microorganismos para sobrevivir al impacto de agentes antimicrobianos (Maillard, 2012). Los microorganismos resistentes podrían definirse como células bacterianas o cepas que no pueden ser destruidas o inhibidas por concentraciones de un agente antimicrobiano a las que otras cepas de la misma especie son susceptibles (Zhelev, 2021).

La resistencia se clasifica en resistencia intrínseca y resistencia adquirida. La primera se refiere a la resistencia causada a los mecanismos naturales existentes en la bacteria, mientras que se considera resistencia adquirida cuando un microorganismo dado se vuelve resistente a un agente antimicrobiano específico, al que anteriormente era sensible (Maillard, 2012). La resistencia adquirida suele asociarse a alteraciones estructurales en la célula que impiden el acceso de los

agentes bactericidas. Algunos ejemplos de estas alteraciones son la modificación de la envoltura celular, los cambios en la permeabilidad celular, la actividad de las bombas de salida y la conversión (biotransformación) de biocidas en metabolitos inofensivos (Zhelev, 2021). A diferencia de la resistencia intrínseca, la adquirida no es una característica de toda la especie, sino de cepas o subpoblaciones específicas (Maillard, 2012).

La resistencia se basa con mayor frecuencia en procesos evolutivos que tienen lugar durante la interacción continua de los microorganismos con un agente antimicrobiano, como ocurre en la terapia con antibióticos, conduciendo a una resistencia hereditaria. Una posible forma en la que la resistencia se acumula y se hereda es la transferencia horizontal de genes, ya sea por conjugación, transducción o transformación (Witte, 2004).

Se han informado muchos mecanismos de resistencia en bacterias, como la inactivación de enzimas, el cambio de la permeabilidad celular, la alteración de los sitios de unión, el aumento de la salida de antibióticos y la realización de cambios de fenotipos complejos como la formación de biofilm (WHO, 2020). La resistencia se puede lograr también mediante mutaciones en diferentes loci cromosómicos o la adquisición horizontal de genes de resistencia (por plásmidos, integrones o transposones (Witte, 2004).

Cabe destacar que las bacterias no solo generan resistencia frente a los antibióticos, sino que también pueden desarrollar este mecanismo frente a cualquier otro agente antibacteriano, como los desinfectantes y antisépticos. De hecho, existe evidencia de que el contacto frecuente y repetido con ciertos antisépticos y desinfectantes conduce al desarrollo de resistencia tanto a la sustancia específica como a algunos otros agentes antimicrobianos. A este mecanismo se le conoce también como resistencia cruzada (Gnanadhas et al., 2013).

Además, algunas cepas y especies han desarrollado resistencia a múltiples antibióticos, por lo que se les conoce como “superbacterias”. Las superbacterias han contribuido a la reaparición de enfermedades que estuvieron bien controladas

durante muchos años, como lo es el caso de la tuberculosis, la neumonía y la salmonelosis (Hajipour et al., 2012).

Un hecho alarmante es la rápida propagación de la resistencia a múltiples antibióticos, en muchos de estos casos no existe ya algún tratamiento disponible. Se ha reportado la aparición de superbacterias principalmente en hospitales, pero también han aparecido en agua potable, aguas residuales, suelos, plantas, carne cruda y productos lácteos, así como el tracto gastrointestinal, el sistema respiratorio superior, y la piel de humanos y animales, incluyendo porcinos, bovinos y aves de corral (Serwecińska, 2020). Es así como la resistencia bacteriana no sólo compromete a la salud pública, sino que también a la seguridad alimentaria y al medio ambiente.

Así, día tras día, el uso de agentes antimicrobianos convencionales se está convirtiendo en un problema mundial cada vez más grave, que amenaza la salud de miles de personas, por lo que el desarrollo de nuevas estrategias alternativas para combatir bacterias es urgente.

Ante tal problemática se han generado nuevas estrategias en terapias antimicrobianas entre las que destacan el uso de péptidos antimicrobianos, terapias con fagos, anticuerpos terapéuticos, inhibidores de quorum sensing y nanopartículas antimicrobianas (Rodrigues et al., 2019).

2.2. Nanotecnología

La nanotecnología se puede definir como la investigación y el desarrollo de tecnologías a nivel atómico, molecular y macromolecular con al menos una de sus dimensiones dentro de una escala de longitud “nano”, es decir, de 1 a 100 nanómetros. Cabe mencionar que un nanómetro equivale a la billonésima parte de un metro o bien, 1×10^{-9} m (Mehlhorn, 2016).

La nanotecnología comprende el estudio, diseño, creación, síntesis y manipulación de materiales, equipos y sistemas funcionales a través del control de la materia dentro de dicha escala, con el fin de proporcionar una comprensión fundamental de

los fenómenos y materiales a nanoescala y para crear y utilizar estructuras, dispositivos y sistemas que tengan nuevas propiedades y funciones (Muñoz-Écija et al., 2017). Es un campo altamente multidisciplinario y se relaciona con muchas disciplinas, incluidas la ciencia coloidal, la química, la física aplicada y la biología.

Se prevé que la nanotecnología abrirá camino para una revolución en los materiales, la tecnología de la información y la comunicación, la medicina, la genética, etc., ya que este tipo de tecnología tiene un campo de aplicación muy extenso y promete ayudar a mejorar los productos y procesos que emplean materiales convencionales brindando mejores características así como nuevas posibilidades, además de dar solución a diversas problemáticas (Khan et al., 2019).

Los nanomateriales son una nueva clase de materiales que ofrece la nanotecnología. Pueden ser de tipo cerámicos, metálicos, orgánicos, semiconductores, poliméricos, o bien, una combinación de estos, los cuales presentan la característica de tener al menos una de sus dimensiones dentro de la nanoescala (<100nm) o estar formado por unidades nanométricas, como lo es el caso de los materiales nanoestructurados (Hemeg, 2017).

Este nuevo tipo de materiales representa una transición entre moléculas o átomos, y un material con dimensiones de sólido volumétrico (material en bulto) (Muñoz-Écija et al., 2017). Debido a su tamaño reducido a unos cuantos nanómetros, sus propiedades fisicoquímicas difieren de las del mismo material en bulto, así como de las moléculas y los átomos (Khan et al., 2019). Hay un interés creciente en el uso de nanomateriales derivado de dichas características y propiedades únicas, que permiten innovar con la creación de nuevos equipos, materiales y técnicas. Esto tiene un potencial impacto en el desarrollo múltiples aplicaciones (Moritz & Geszke-Moritz, 2013).

Algunos de los tipos de nanomateriales más estudiados son los nanotubos de carbono, los nanocristales fluorescentes, las estructuras nanoporosas, los dendrímeros, los nanoliposomas, el grafeno y las nanopartículas (Baig et al., 2021).

La definición de nanopartículas engloba a una amplia variedad de sustancias particuladas cuya dimensión de mayor tamaño mide menos de 100nm. Las nanopartículas pueden tener diferentes formas, desde esféricas y cúbicas, hasta nanorods, discos hexagonales y nanoflores (Moritz & Geszke-Moritz, 2013). Las partículas dentro de esta escala exhiben propiedades físicas y químicas distintivas debido a los efectos de la mecánica cuántica (Mehlhorn, 2016).

Las nanopartículas presentan un amplio desarrollo en la investigación científica debido a que poseen propiedades distintas a sus características volumétricas, dependiendo de su tamaño, morfología y distribución, lo que permite crear, y mejorar productos, servicios y procesos (Niculescu et al., 2021).

Se han estudiado síntesis de nanopartículas de diferentes materiales, desde polímeros naturales, como la celulosa, alginato, ácido poliláctico y quitosano, y artificiales, como el poliestireno y el polivinilo de cloruro; nanopartículas cerámicas como las de dióxido de silicio, óxido de zirconio y dióxido de titanio; hasta nanopartículas de metales como cobre, plata, zinc, paladio y oro. Todas ellas tienen propiedades físicas y químicas mejoradas debido a la gran área de superficie reactiva y expuesta de tamaño cuántico (Aisida et al., 2020).

Para sintetizar nanopartículas se pueden emplear diferentes estrategias, ya sea por métodos químicos, físicos y biológicos. Sin embargo, los métodos de reducción química son los más utilizados.

Conceptualmente, se consideran dos procesos principales de síntesis. El primero consiste en la miniaturización de los materiales en bulto, denominado enfoque de arriba abajo o *top-down*. El segundo proceso busca imitar a la naturaleza mediante el desarrollo de estructuras a partir de los niveles atómico y molecular, denominado enfoque de abajo arriba o *bottom-up* (Modan & Plăiașu, 2020).

La ruta de síntesis de los nanomateriales juega un papel crucial en la preparación de productos específicos, y es determinante en las propiedades que se desean obtener. Los métodos de síntesis incluyen coprecipitación a partir de soluciones,

condensación de gases (aerosoles), plasma, combustión, pirolisis en spray, “sputtering”, expansión de fluidos supercríticos, evaporación láser, polimerización, molienda mecánica, litografía, ensamblado molecular, cavitación hidrodinámica, sol-gel, solvotérmico, hidrotérmico, microemulsión y otros procesos.

Los nanomateriales se pueden diseñar para reducir la posibilidad de desarrollo de resistencia. Por lo tanto, comprender el impacto de las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales en su mecanismo y rendimiento antibacteriano es muy importante para desarrollar estrategias de tratamiento avanzadas sin antibióticos (Y. Wang et al., 2020).

2.2.1. Nanopartículas antimicrobianas

Con la creciente preocupación por las infecciones bacterianas, existe una importante necesidad de desarrollar agentes antibacterianos nuevos y efectivos. Los nanomateriales son prometedores en las terapias antibacterianas debido a sus propiedades fisicoquímicas mejoradas, como tamaños de partícula muy pequeños, gran relación superficie-masa y mayor reactividad química.

La aplicación de soluciones nanotecnológicas, como el uso de nanopartículas, es una de las propuestas viables para superar la resistencia a los antibióticos en las bacterias. La ventaja de las formulaciones a base de nanopartículas en comparación con los sistemas convencionales es que pueden aumentar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios, debido a la acción dirigida específica (Moritz & Geszke-Moritz, 2013).

En particular, las nanopartículas con propiedades antimicrobianas se han aplicado en: conservación de alimentos, apósitos para quemaduras, cosméticos seguros, dispositivos médicos e implantes, antisépticos para el tratamiento de llagas, tratamiento de aguas residuales, tratamiento de infecciones, desinfectantes, control de bacterias en cultivos, entre otras tantas aplicaciones y productos (Ezealigo et al., 2021; J. Li & Zhuang, 2020).

El amplio uso de las nanopartículas se debe a su excelente actividad antibacteriana en varias bacterias tanto grampositivas como gramnegativas. Se ha demostrado que el efecto bactericida de las nanopartículas depende de su tamaño, forma, distribución de tamaño, morfología, funcionalización superficial y su estabilidad. Además, el uso de nanopartículas inorgánicas como agentes antimicrobianos tiene varios beneficios, como una mayor estabilidad y seguridad en comparación con los agentes antimicrobianos orgánicos (Moritz & Geszke-Moritz, 2013).

Las nanopartículas antibacterianas pueden estar compuestas por metales, óxidos metálicos, sales metálicas, hidróxidos metálicos, nanoportadores orgánicos cargados con agentes antibacterianos, materiales híbridos y polímeros con propiedades antibacterianas.

En los últimos años, las nanopartículas de metal y óxido de metal a base de plata, oro, cobre, óxido de cobre, óxido de zinc, maghemita y magnetita también se han aplicado en medicina, odontología, farmacia y biología. Otros tipos de nanopartículas también han despertado una especial atención en el campo de la investigación biomédica.

Se ha reportado en innumerables trabajos que las nanopartículas de metales metales y sus óxidos, como lo son las de Ag, ZnO, Fe₂O₃, Fe₃O₄, Al₂O₃, TiO₂ y CuO, ejercen una acción antimicrobiana frente a diferentes bacterias, así como acción antifúngica (Gudkov et al., 2021), por ello es que las nanopartículas metálicas son de gran interés en la investigación para su aplicación como agentes antimicrobianos (Slavin et al., 2017) .

Las nanopartículas metálicas son materiales ampliamente estudiados y sintetizados, ya sea en su forma pura o en combinación con otros materiales, como es el caso de los recubrimientos cerámicos, las modificaciones superficiales con polímeros y otras moléculas orgánicas, las nanopartículas dopadas, las estructuras *core-shell* y los materiales nanocompositos (Bowles & Lu, 2014). En otros términos, la preparación, caracterización, modificación de la superficie y funcionalización de

nanopartículas inorgánicas abre la posibilidad a una nueva generación de materiales antimicrobianos (Gudkov et al., 2021).

Las nanopartículas de óxido metálico altamente reactivas exhiben una excelente acción bactericida contra diferentes bacterias grampositivas y negativas (Seil & Webster, 2012). En la Tabla 1. se enumeran diferentes trabajos con nanopartículas metálicas con efecto antibacteriano. Se aprecia que las concentraciones necesarias para eliminar a la mayoría de las bacterias son muy bajas, lo cual es favorable para su aplicación como materiales antimicrobianos.

Tabla 1. Resumen de estudios respecto al efecto microbiano de nanopartículas (Seil & Webster, 2012).

Material	Tamaño promedio (nm)	Organismo probado	Efectividad	Mecanismo de acción
ZnO	13	<i>S. aureus</i>	Reducción del 95% a 80 µg/mL	Inhibición de ROS (especies reactivas de oxígeno)
ZnO	60	<i>S. aureus</i>	Reducción del 50% a 400 µg/mL	Inhibición de ROS
ZnO	40	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Reducción del 99% a 400 µg/mL para ambas especies	Interrupción de la membrana
ZnO	12	<i>E. coli</i>	Reducción del 90% a 400 µg/mL	Daño de la membrana debido a abrasividad de las partículas
Iones de ZnO	N/A	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Reducción del 100% a 19 y 17.9 µg/mL	Inhibición de ROS
Ag	21	<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Reducción del 100% a 75 µg/mL	Interrupción de membrana, interferencia de iones Ag con replicación de ADN
Ag	50	<i>E. coli</i>	Reducción del 99 con 0.1 µg/mL	Interrupción de membrana, interferencia de iones Ag con replicación de ADN
Ag	13.5	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Concentración inhibitoria de 3.56 y 0.35 µg/L agregado a la superficie del agar	Interrupción de membrana, interferencia de iones Ag con replicación de ADN

Ag	12	<i>E. coli</i>	Reducción del 70% con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Interrupción de membrana, interferencia de iones Ag con replicación de ADN
Cu	100	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	Especies de bacterias reducidas al 90% con 33.4 y 20.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Inactivación de proteínas a través de interacción tiol
Fe_3O_4	9	<i>S. aureus</i>	Aumento de las células muertas observadas a 3mg/ml	ROS, disrupción de membrana
Fe_3O_4	8	<i>S. epidermidis</i>	Reducción del 65% a 2 mg/ml	ROS, disrupción de membrana
Al_2O_3	11	<i>E. coli</i>	Reducción del 68% a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	ROS dependiente de la dosis, penetración de partículas
Al_2O_3	60	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. fluorescens</i>	Especies de bacterias reducidas 36% y 57% a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Floculación
TiO_2	17	<i>E. coli</i>	Reducción del 0%, 35% y 80% con 110, 100 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Interrupción de la membrana
SiO_2	20	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	Especies de bacterias reducidas 58% y 40% a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Floculación, alteración de la membrana

Los mecanismos exactos de la toxicidad de las nanopartículas frente a diversas bacterias no se comprenden completamente y requieren de más estudios. No obstante, se ha reportado que las nanopartículas pueden adherirse a la superficie de la membrana de las bacterias mediante interacciones electrostáticas y alterar la integridad de la envoltura celular con la liberación de iones. Entonces, la nanotoxicidad generalmente se desencadena por la inducción de estrés oxidativo por la formación de radicales libres (Hajipour et al., 2012).

La acción antibacteriana de las nanopartículas generalmente está relacionada con su unión superficial a las bacterias, la liberación de iones, seguida de la generación de alto estrés oxidativo. Por lo tanto, se vuelve realmente difícil para las células bacterianas desarrollar múltiples mutaciones genéticas simultáneas frente a tratamientos mediados por nanomateriales (S. Tang & Zheng, 2018).

Las nanopartículas son una nueva estrategia para abordar las bacterias multirresistentes (Y. Wang et al., 2020). Las nanopartículas metálicas se dirigen a

múltiples biomoléculas a la vez, lo que tiene el potencial de evitar el desarrollo de nuevas cepas resistentes y así reducir o eliminar la evolución de bacterias (Slavin et al., 2017).

2.3. Nanopartículas de magnetita

El hierro es uno de los elementos más abundantes en la Tierra y el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre. Constituye más del 85% de la masa del núcleo de la Tierra y aproximadamente el 5% de la masa de la corteza terrestre. En los sistemas vivos, el hierro es uno de los microelementos clave y tiene varias funciones importantes como cofactor de varias enzimas y proteínas de transporte (Gudkov et al., 2021).

Dentro de las nanopartículas metálicas con aplicaciones antimicrobianas, las nanopartículas de hierro presentan una buena actividad contra microorganismos y alta biodisponibilidad (Cristea et al., 2017). Presentan interesantes propiedades como baja toxicidad, alta biocompatibilidad y vías de síntesis relativamente fáciles. Estas partículas tienen diversas aplicaciones en las áreas médicas y biológicas, como lo es en el etiquetado y separación celular, agentes de contraste en resonancia magnética, sistemas de administración de fármacos dirigidos, técnicas de hipertermia en la terapia del cáncer y detección (Setyawan & Widiyastuti, 2019).

Uno de los óxidos de hierro más prometedores para una larga lista de aplicaciones es la magnetita (Fe_3O_4) (Cristea et al., 2017). La magnetita es uno de los óxidos de hierro más abundantes en la naturaleza (Zuluaga, 2011). Se considera como uno de los nanomateriales más populares que se investigan en la actualidad, y esto es gracias a su disponibilidad, bajo costo, versatilidad y bioseguridad (Niculescu et al., 2021). Además, la magnetita en escala nanométrica ha representado un material de gran interés debido a su baja toxicidad en la salud humana, alta biocompatibilidad, propiedades magnéticas y buena actividad antimicrobiana (Mashjoor et al., 2018), que le han permitido tener aplicabilidad tecnológica en áreas diversas, como medio ambiente, medicina, biomedicina y alimentos (Cristea et al., 2017).

Su gran área superficial específica y su alta energía superficial les permiten a las nanopartículas de magnetita unirse a las superficies bacterianas (Ramteke et al., 2010). Las nanopartículas de magnetita pueden adsorberse en la superficie de las células bacterianas por interacciones electrostáticas o hidrófobas y decorarlas. La capacidad de decoración bacteriana de las nanopartículas magnéticas se ha utilizado en microbiología industrial y ambiental para la inmovilización celular en el bioprocesamiento. Diversas investigaciones han encontrado buenas propiedades antibacterianas contra cepas grampositivas y gramnegativas, incluyendo *Staphylococcus aureus* (Grumezescu et al., 2010), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Ramteke et al., 2010).

La actividad antimicrobiana intrínseca de las nanopartículas magnéticas está mediada por especies reactivas de oxígeno a través de la acción de los iones de hierro, que también son vitales para el crecimiento de los microorganismos, por lo que es poco probable que se desarrollen mecanismos de resistencia contra dichas nanopartículas. El uso de sustancias antimicrobianas para recubrir las nanopartículas podría aumentar su eficacia terapéutica (Rodrigues et al., 2019).

2.3.1. Propiedades

2.3.1.1. Magnetita en bulto

La magnetita (Fe_3O_4) es uno de los óxidos de hierro más importantes, un compuesto común que está muy extendido en la naturaleza y se sintetiza fácilmente en el laboratorio y se usa ampliamente en la industria. La magnetita es un mineral ferrimagnético negro que contiene Fe (II) y Fe (III) (Setyawan & Widiyastuti, 2019).

La estructura cristalina de la magnetita sigue un patrón de espinel inverso con una celda cúbica centrada en la cara basada en 32 iones de O^{2-} , que se encuentran regularmente empaquetados en forma cúbica a lo largo del [111]. La celda unitaria tiene ocho unidades de fórmula por celda unitaria con un parámetro de red de 0.839 nm. La magnetita contiene hierro divalente y trivalente y, con frecuencia, no es

estequiométrica, es decir, tiene una subred de Fe(III) deficiente en cationes. Las especies de hierro divalente ocupan la mitad de los sitios de la red octaédrica debido a la mayor energía de estabilización del campo cristalino. A la inversa, las especies de hierro trivalente ocupan los otros sitios de la red octaédrica y todos los sitios de la red tetraédrica. Las capas octaédricas y tetraédricas / octaédricas mixtas apiladas a lo largo de [111] (Cornell & Schwertmann, 2003).

La temperatura de Curie de la magnetita es de 850 K. A esa temperatura, la magnetita posee un comportamiento ferrimagnético. En este caso, los momentos magnéticos en los sitios tetraédricos, ocupados por Fe (III), están ferromagnéticamente alineados, mientras que los momentos magnéticos en los sitios octaédricos, ocupados por Fe (III) y Fe (II), son antiferromagnéticos y se cancelan entre sí. Cuando se alcanza la temperatura de Curie, la magnetización neta es cero y la magnetita posee un comportamiento superparamagnético (Setyawan & Widiyastuti, 2019).

2.3.1.2. Magnetita nanométrica

La magnetita de tamaño nanométrico aún exhibe color negro, con una celda unitaria cúbica centrada en la cara del mismo parámetro de red y volumen de celda unitaria. (Setyawan & Widiyastuti, 2019)

El área superficial efectiva de las partículas de magnetita debería aumentar al disminuir el tamaño de las partículas. El área de superficie efectiva de las partículas de magnetita de 0.2 μm es de aproximadamente 6 m^2g^{-1} y aumenta considerablemente a 100 m^2g^{-1} cuando el tamaño es de ~ 50 nm.

El cambio en el área de la superficie debido al cambio de tamaño de partícula no afecta la estructura cristalina de la magnetita (Li Q. et al., 2017).

La Tabla 2 se presentan dichas propiedades resumidas.

Material	Parámetro de red (Å)	Volumen de celda unitaria (Å³)
Magnetita	8.39	590.6
Nanopartículas de magnetita (6.4 nm)	8.40	592.7

Tabla 2. Propiedades de la magnetita (Setyawan & Widiyastuti, 2019)

2.3.2. Métodos de síntesis

Se ha reportado que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas depende de ciertos factores como el tamaño, la concentración, la carga superficial y el método de síntesis (Behera et al., 2012). Algunos estudios sugieren que el tamaño de la nanopartícula es inversamente proporcional a la actividad antimicrobiana, cuanto menor sea el tamaño, mayor será su actividad (Yong et al., 2017).

En lo que refiere al método de síntesis, el tamaño, morfología y estabilidad de la nanopartícula llega a ser dependiente del método de síntesis que se seleccione (Azeredo, 2011). Teniendo en cuenta las características deseadas y el campo de aplicación, existen tres rutas principales para la síntesis de nanopartículas de magnetita: métodos físicos, químicos y biológicos (Mihai et al., 2020). La Figura 1. muestra algunos de los métodos de síntesis más usados.

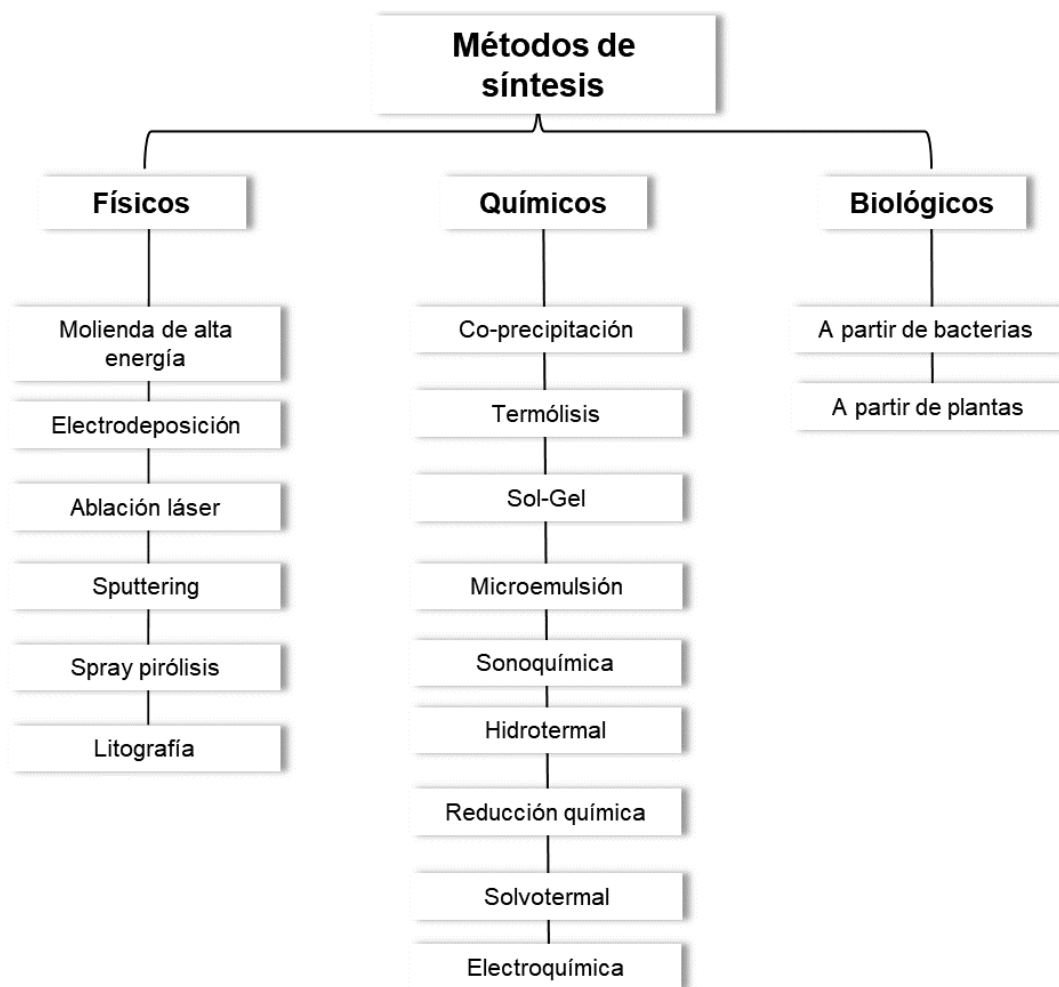


Figura 1. Métodos de síntesis de nanopartículas de magnetita (Mihai et al., 2020).

2.3.2.1. Métodos físicos

Los métodos físicos para la preparación de nanopartículas de magnetita siguen un enfoque top-down (de arriba hacia abajo) en el que los materiales a granel o las partículas grandes se rompen en partículas a nanoescala. Existe una variedad de métodos físicos para sintetizar nanopartículas de magnetita, que incluyen la molienda y la litografía por haz de electrones, como los más utilizados, y otros, como la ablación láser, el sputtering o pulverización catódica, la deposición en fase gaseosa y la pirólisis en aerosol (Mihai et al., 2020). Los métodos físicos consisten

en procedimientos elaborados que en general no pueden controlar el tamaño de las partículas en el rango de nanómetros pero que son fáciles de realizar (Xu et al., 2014). Si bien estos métodos son los preferidos para la producción a gran escala de nanopartículas, existen también importantes desventajas con respecto a las tecnologías costosas que requieren y su alto consumo energético (Aisida et al., 2020).

2.3.2.2. Métodos biológicos

Un método biológico o síntesis bacteriana puede ser también una opción para sustituir la síntesis química, ya que se llevan a cabo en condiciones suaves y evitan el uso de productos químicos tóxicos; por lo tanto, estos métodos puede ofrecer un nuevo compuesto biocompatible y no tóxico. Sin embargo, las síntesis biológicas presentan la desventaja de tener un bajo rendimiento de producción, y complicaciones para la reproducibilidad y la escalabilidad, pues los procesos de fermentación necesarios conllevan mucho tiempo (Rodrigues et al., 2019).

2.3.2.3. Métodos químicos

Los métodos químicos se usan con mayor frecuencia debido a su simplicidad, manejo controlable y eficiencia, además de ser más rentables en cuanto a tiempos y costos. Proporcionan una distribución de tamaño de partículas más estrecha. Existen diversos métodos reportados en la literatura para sintetizar magnetita, a continuación se describen los principales (Niculescu et al., 2021).

2.3.2.3.1. Microemulsión

Una microemulsión es una dispersión termodinámicamente estable de dos líquidos inmiscibles en presencia de un tensioactivo, que forma una monocapa en la interfaz entre el aceite y el agua, exhibiendo posiblemente una tensión interfacial ultrabaja. En microemulsión, las nanopartículas se sintetizan típicamente por nucleación y crecimiento intramicelar. Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas preparadas mediante tal técnica dependen esencialmente de la elección del tensioactivo. Específicamente, las nanopartículas dan como resultado una forma esférica (Ansari et al., 2019).

El tamaño y las formas de las partículas suelen variar en un intervalo relativamente amplio. Además, la ventana de trabajo para la síntesis en microemulsiones suele ser bastante estrecha y el rendimiento de nanopartículas es bajo en comparación con otros métodos. Se necesitan grandes cantidades de disolvente para sintetizar cantidades apreciables de material. Por tanto, no es un proceso muy eficiente y también bastante difícil de escalar (Lu et al., 2007)

2.3.2.3.2. Sol-Gel

Este método para la producción de nanopartículas consiste en la hidroxilación y condensación de algunos precursores de hierro formando un "sol" (es decir, una solución coloidal) de nanopartículas que luego se secan o gelifican mediante la eliminación del solvente hasta obtener una red tridimensional de óxido de hierro. En este proceso, se suele utilizar agua como disolvente (Ansari et al., 2019).

El sol-gel presenta algunas desventajas, ya que el producto final puede contener residuos de solventes, los cuales generalmente son sustancias orgánicas que pueden llegar a ser tóxicas (Modan & Plaiasu, 2020)

2.3.2.3.3. Co-precipitación química

La co-precipitación química es probablemente el método de síntesis de nanopartículas de magnetita más popular (Ansari et al., 2019). Consiste en mezclar en una disolución acuosa sales de Fe^{2+} y Fe^{3+} . Se pueden controlar parámetros como el pH y la temperatura, además de la posibilidad de trabajar bajo una atmósfera inerte (Lu et al., 2007). Las características de las nanopartículas obtenidas, como el tamaño y la forma, dependen fuertemente del tipo de sales empleadas, la razón de los iones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, la temperatura de reacción, el pH de la disolución y la fuerza iónica del medio (Ansari et al., 2019).

Sin embargo, la coprecipitación todavía tiene algunos inconvenientes en términos de la amplia distribución del tamaño de partícula de los productos, la necesidad de una base fuerte para el proceso de síntesis (Niculescu et al., 2021) y las reacciones inmediatas que se llevan a cabo en la solución y que dificultan el control del proceso de cristalización (Setyawan & Widiyastuti, 2019).

2.3.2.4. Métodos electroquímicos

Los métodos electroquímicos emplean energía eléctrica para generar reacciones químicas, reemplazando así el uso de reactivos químicos costosos o tóxicos (Muñoz-Écija et al., 2017). La síntesis electroquímica de magnetita presenta algunas ventajas sobre otros métodos, como la alta pureza del producto obtenido y el control del tamaño de partícula logrado mediante el ajuste de la corriente o el potencial aplicado al sistema (Cabrera et al., 2008).

En la Tabla 3 se presentan diferentes trabajos en donde se llevaron a cabo síntesis de nanopartículas de magnetita por métodos electroquímicos. Diversos factores influyen en las características del producto final, como pueden ser la configuración de la celda, la composición de los electrodos, el medio electrolítico empleado, el modo de operación y el tiempo de síntesis.

Tabla 3. Estudios de síntesis de nanopartículas de magnetita por métodos electroquímicos (Setyawan & Widiyastuti, 2019)

Precursor	Electrodo	Electrolito	Modo de operación	Tiempo	Tamaño de partícula (nm)	Referencia
Ánodo de Fe + Fe(ClO ₄) ₂	Láminas de Fe como ánodo y cátodo	Fe(ClO ₄) ₂ (ac) 0.01 M	Galvanostato: 40–60 mA·cm ⁻²	20 y 45 min	13-35 (cúbicas)	(Gopi D, et al., 2016)
Ánodo de hierro	Placas de acero como ánodo y cátodo	NaCl (ac) 0.04 M con aire burbujeado	Galvanostato: 62.5 y 125 mA·cm ⁻²	20 y 30 min (70°C)	30.5-45.2 (esféricas)	(Weng, Y.C. et al., 2005)
Ánodo de hierro	Láminas de Fe como ánodo y cátodo	Yo ₄ NCl (ac) 0.04 M	Potenciostato: 1-15V; galvanostato: 10-200 mA·cm ⁻¹	1800 s (60°C)	23-33 (esféricas)	(Cabrera L. et al., 2008)

Ánodo de hierro	Tres electrodos: pellets de acero inoxidable, SCE y Pt	NaCl 0.04 M (ac) con aire burbujeado	Galvanostato 12.5 mA·cm ⁻¹	30 min	45-80 (esféricas)	(Franger S. et al., 2004)
Fe(NO ₃) ₃	Tres electrodos: disco de carbono, Ag/AgCl y Pt	0.01-0.16M Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O en etanol	Voltametría cíclica (potencial de 20 a 60mV)	NA	6.2 (esféricas)	(Ibrahim M. et al., 2009)
Ánodo de hierro	Láminas de Fe como ánodo y cátodo	Na ₂ SO ₄ 0.25M	Potenciostato 5V (60°C)	30 min	25-90	(Mosivand S. et al., 2013)
Ánodo de hierro	Tres electrodos: 2 láminas de hierro y SSE como electrodo de referencia	KCl 0.5 M (ac)	Pulsos de potencial	60 min	27-32 (esféricas)	(Rodríguez-López A. et al., 2012)
Ánodo de hierro	Láminas de Fe como ánodo y cátodo	KOH 2M con CTAB	Corriente pulsada (UN=18 mA·cm ⁻² ; F=8Hz)	30 min	67 (nanorods)	(Karami H. y Chidar E., 2012)
Ánodo de hierro	Láminas de Fe como ánodo y cátodo	Agua desionizada	Galvanostato: 205-415 μA·cm ⁻²	20 h	10-30 (esféricas)	(Fajaroh F. et al., 2012)
Fe(NO ₃) ₃	Cilindros de carbono como ánodo y cátodo	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O 0.01-0.016 M en etanol	Potenciostato: 62 V	12 h	4.4-9 (esféricas)	(Marques R.F.C. et al., 2008)

Haciendo una recapitulación histórica, en 1999, Pascal y cols. sintetizaron nanopartículas de maghemita mediante un método electroquímico, y además demostraron que el tamaño de las nanopartículas puede ser controlado modificando la densidad de corriente impuesta, siendo ésta inversamente proporcional al tamaño de partícula (Pascal et al., 1999). A partir de este trabajo, se realizaron diversas investigaciones sobre métodos electroquímicos para la síntesis de nanopartículas metálicas.

Más tarde se reportaron las primeras síntesis electroquímicas de nanopartículas de magnetita. En 2002, Ying y col. sintetizaron partículas de magnetita utilizando electrodos de acero al carbono. Reportaron mecanismos de interés para la síntesis de nanopartículas de magnetita y compararon el efecto de diferentes electrolitos (NaCl, CaCl, MgCl₂ y CuCl₂) y de diferentes condiciones de operación como la temperatura y el voltaje (Ying et al., 2002).

Cabrera y col. (2008) estudiaron la síntesis electroquímica de nanopartículas de magnetita, empleando placas de hierro de alta pureza como ánodo de sacrificio y como cátodo, Me₄NCl como electrolito, y variando el potencial de 1 a 15 V y la densidad de corriente de 10 a 200 mA/cm². Obtuvieron nanopartículas uniformes y esféricas de 20 a 30 nm de tamaño de partícula y reportaron que aplicando un potencial o corriente elevados se obtiene hierro metálico como producto indeseado, además, indicaron la importancia de la distancia de separación entre los electrodos para favorecer la reacción, no debiendo ser mayor a 5 cm.

También en 2008, Santos y cols. publicaron un estudio sobre la síntesis y comportamiento electroquímico de nanopartículas de magnetita., empleando como electrolito soporte una solución acuosa de cloruro de hierro (II) y dimetil sulfóxido. Las nanopartículas obtenidas presentaron hidrofobicidad superficial y un tamaño controlado de aproximadamente 4–27 nm. Estos autores mencionan que para lograr la estabilidad, en la superficie de la nanopartícula se forma una pequeña capa de otro producto, por ejemplo un oxihidróxido,

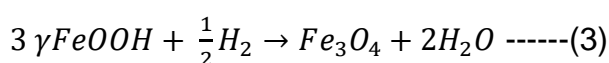
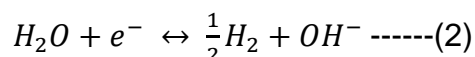
Rodríguez y cols., (2012) propusieron un novedoso método de síntesis electroquímica de nanopartículas de magnetita usando pulsos de potencial asimétricos, empleando barras de hierro de alta pureza como electrodos y cloruro de potasio (KCl) en solución acuosa como electrolito. Este método permite reducir costos energéticos y optimizar la síntesis. Básicamente consiste en alternar la polaridad de los electrodos, así el electrodo de trabajo actúa como ánodo por un tiempo, generando iones ferrosos y férricos, luego como cátodo, generando iones hidroxilo para formar hidróxido férrico químicamente y, al mismo tiempo, reduciendo

ese hidróxido a magnetita. De esta forma, los iones hidroxilo generados en el cátodo ya no viajan al otro electrodo, ahorrando en consecuencia la energía relacionada con esta transferencia de masa. Rodríguez y cols. (2012) realizaron múltiples experimentos bajo diferentes condiciones en cuanto a los potenciales anódicos y catódicos y la duración de cada uno, con lo que se demostró que controlando los pulsos se puede favorecer la formación de magnetita y evitar la producción de iones de hierro o de otros óxidos.

2.3.2.4.1. Mecanismo de reacción

En lo que respecta al mecanismo de reacción para la formación de magnetita por medio de síntesis electroquímica, en la literatura se han planteado diferentes propuestas.

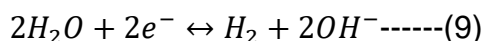
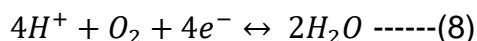
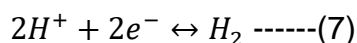
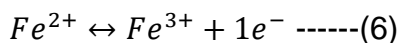
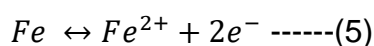
El mecanismo propuesto por Franger y cols. (2004) sugiere que la magnetita se produce a través de un intermediario de oxihidróxido de hierro (III). Propusieron tres reacciones involucradas en la formación de magnetita: oxidación del hierro en el ánodo (reacción 1), electrólisis del agua en el cátodo (reacción 2) y una reacción química en la solución (reacción 3).



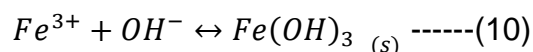
Mencionaron que el hidrógeno molecular (H₂) generado en el contraelectrodo desempeña un papel importante en la formación de magnetita, ya que su difusión a través de la solución permite reducir parcialmente el γ -FeOOH formado en el ánodo para formar magnetita. Sin embargo, este mecanismo ha sido discutido por otros autores (Rodríguez-López et al., 2012), puesto que se basa en la suposición de que el gas hidrógeno generado en la interfaz del electrodo viaja en forma de burbujas desde el cátodo hasta la disolución para reducir el oxihidróxido, cuando las burbujas

generalmente tienden a abandonar el medio acuoso tan pronto como se separan del electrodo.

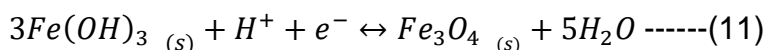
Ying et al. (2002) así como Cabrera et al. (2008) propusieron un segundo mecanismo que sugiere la reducción de hidróxido férrico en el cátodo. Se plantea que los iones ferroso y férrico se generan en el ánodo (reacciones 5 y 6); mientras que en el cátodo hay un aumento de pH debido a las reacciones 7 y 8. El pH interfacial incrementa también debido a que simultáneamente se lleva a cabo la reacción de electrólisis en el agua (reacción 9)



Los iones hidroxilo producidos en el cátodo llegan a la superficie del ánodo por difusión, proporcionando un medio básico que favorece la producción de hidróxido férrico (reacción 10) que precipita (Cabrera et al., 2008).



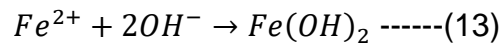
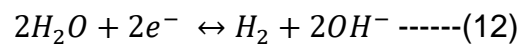
Una vez que se ha formado el hidróxido férrico, si el pH de la solución se encuentra alrededor de 8 o 9, la reducción a magnetita es posible (reacción 11). Para lograr esto, es necesario que el hidróxido viaje al cátodo para reducirse parcialmente en este electrodo (Ying et al. 2002; Cabrera et al. 2008).



Este segundo mecanismo también presenta algunas irregularidades debido a que sugiere que el hidróxido férrico ($Fe(OH)_3$), que es sólido, viaja a la superficie del cátodo mediante difusión para reducirse a magnetita, lo que parece poco probable debido a que este es un compuesto que tiende a precipitar. Además, para que se lleve a

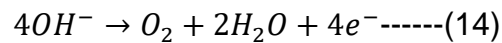
cabo la reacción 11 es necesaria la existencia de protones en la interfase catódica para reducir al hidróxido férrico, no obstante, éstos se consumen también mediante las reacciones 7 y 8 por lo que son escasos.

Fajaroh y cols. (2012) propusieron un mecanismo distinto que comienza con la oxidación del hierro en el ánodo a iones ferrosos (reacción 5) y la reducción del agua que se lleva a cabo en el cátodo (reacción 12) que genera iones hidroxilo, los cuales reaccionan con los iones ferrosos produciendo hidróxido ferroso (reacción 13).

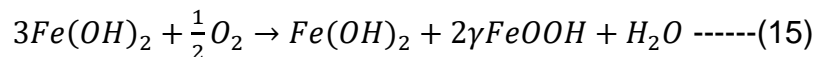


Los iones hidroxilo llegan al ánodo por difusión, creando el medio básico necesario para la formación de hidróxido ferroso, con un pH de solución de alrededor de 9 al final del proceso.

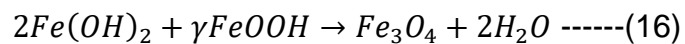
Además, se sugiere que la oxidación de iones hidroxilo es otra reacción que proporciona electrones cerca del ánodo según la siguiente reacción.



Entonces, en presencia de oxígeno, el hidróxido ferroso puede oxidarse parcialmente para formar oxihidróxido de hierro (reacción 15).



En tal caso, la magnetita se forma mediante la reacción del hidróxido ferroso y oxihidróxido de hierro mediante la siguiente reacción:

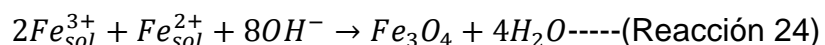
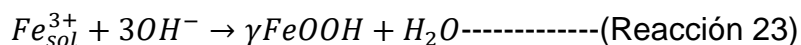
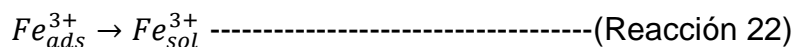
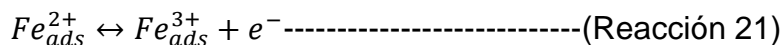
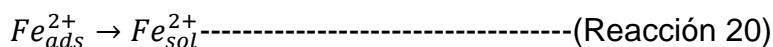
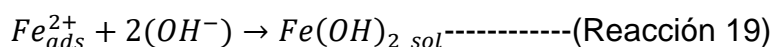
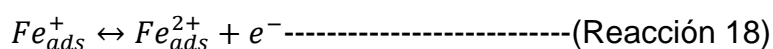
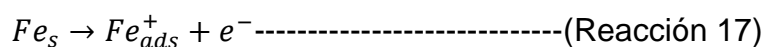


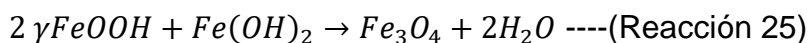
Fajaroh y cols. concluyeron que el rol de los iones hidroxilo es esencial en la síntesis electroquímica de magnetita y que γ -FeOOH es un producto intermediario en la formación de magnetita.

Más tarde, se llevaron a cabo algunos estudios para comprender mejor estos mecanismos, como el trabajo realizado por Lozano y cols. (2017), donde mediante experimentos se concluyó que el oxígeno (O₂) es necesario durante la síntesis para la formación de hidróxido ferroso (Fe(OH)₂), un precursor importante para la obtención de magnetita. Sus resultados van de acuerdo al mecanismo propuesto por Fajaroh et. al., sin embargo no coinciden con su propuesta sobre la producción de oxígeno en el ánodo por la oxidación del agua.

En ese mismo año, Montoya y cols. (2017) analizaron la formación de magnetita por electro-oxidación, identificando los precursores durante la síntesis por medio de espectroscopía Raman, evidenciando que la síntesis involucra una interacción redox entre γ -FeOOH y Fe(OH)₂ (reacción 16).

Reséndiz-Ramírez y cols. (2022) estudiaron el mecanismo mediante espectroscopía de impedancia electroquímica. Compararon sus resultados con los mecanismos reportados anteriormente haciendo una extensa revisión en la literatura. En base a sus resultados experimentales, concluyeron que el mecanismo de formación de la magnetita es más complejo que lo descrito por todos los modelos anteriores, por lo que se propone un mecanismo más, el cual se muestra a continuación. Este mecanismo considera los efectos de adsorción que se dan durante la síntesis en las superficies de los electrodos de hierro.





De acuerdo a las Reacciones 24 y 25, la magnetita se forma ya sea mediante la reacción de iones ferroso y férricos contenidos en la solución y en presencia de iones hidroxilo, o por la reacción del oxihidróxido de hierro con hidróxido ferroso.

Este último modelo es el que mejor describe los fenómenos que ocurren en el ánodo al considerar tres adsorbatos (Fe_{ads}^+ , Fe_{ads}^{2+} y Fe_{ads}^{3+}). Además que se basa en el análisis de modelos previos y se aproxima a las características experimentales, lo que sugiere una representación más completa del mecanismo de reacción.

2.4. Modificación superficial

La estabilidad de las nanopartículas de cualquier material en entornos acuosos depende de muchos parámetros, incluidas las condiciones ambientales, la concentración del material y las características intrínsecas de las nanopartículas.

Las nanopartículas de magnetita presentan una alta energía superficial, por lo que son generalmente inestables, principalmente en solución, y se agregan fácilmente.. Ya que suelen ser hidrófobas, cargadas positivamente y con alta energía superficial, existe una alta tendencia a formar grandes aglomerados a través de fuerzas de Van der Waals e interacciones magnéticas. La agregación afecta significativamente la dispersión de las nanopartículas en el medio acuoso, además que tienden a oxidarse (Mihai et al., 2020; Rodrigues et al., 2019).

Para superar tales desventajas, se pueden usar diferentes métodos de modificación de la superficie, incluido el uso de productos químicos (como ácido oleico, ácido cítrico, polímeros, etc.) o de moléculas biológicas (es decir, quitosano, albúmina, dextrano, etc.) (Rodrigues et al., 2019).

La modificación superficial de las nanopartículas de magnetita es un proceso fundamental para evitar fenómenos de aglomeración y oxidación, como la maduración de Ostwald, y mejorar la estabilidad y compatibilidad al proporcionar

fuerzas de repulsión electrostática o estérica interfacial entre partículas (Moacă et al., 2018). Además, la funcionalización de la superficie permite las respuestas específicas de las nanopartículas a las especies biológicas y elimina las interacciones no específicas con los componentes dentro del sistema, protegiendo a las nanopartículas de las condiciones del medio y la erosión por ácidos o bases (Mihai et al., 2020; Wallyn et al., 2019).

Muchos de los agentes antimicrobianos usados en la actualidad son causantes de diversos efectos adversos. En el caso de los desinfectantes, los más utilizados como aquellos basados en alcohol, cloro, fenol y aminas cuaternarias, pueden ocasionar desde daños en la piel e irritación ocular hasta reacciones alérgicas, dermatitis y asma (Crawford et al., 2000; Su et al., 2019). Debido a ello existe un gran interés en encontrar formulaciones innovadoras de materiales antimicrobianos que sean altamente biocompatibles (Prasad et al., 2017).

Una forma ideal de disminuir la toxicidad de las nanopartículas metálicas es la optimización de sus concentraciones a niveles no tóxicos y sin afectar sus propiedades funcionales. Este objetivo se puede lograr recubriendo a las nanopartículas con polímeros que mejoren su estabilidad, biocompatibilidad y eficacia (Petkova et al., 2014).

La funcionalización de nanopartículas metálicas tiene un gran impacto no solo en la estabilidad de las nanopartículas, sino que también puede mejorar sus propiedades, como lo es la biocompatibilidad e hidrofiliidad, además de agregar nuevas posibilidades a los nanosistemas (Kadhim et al., 2019).

Por otra parte, en las investigaciones generalmente se estudian nanopartículas metálicas modificadas superficialmente para evaluar su efecto antimicrobiano, ya que por sí solas requieren de concentraciones muy altas para inhibir el crecimiento bacteriano (Taimoory et al., 2018). El uso de nanopartículas magnéticas requiere de un método de modificación de la superficie o un recubrimiento con moléculas poliméricas biocompatibles para evitar efectos de aglomeración e interacciones indeseadas y permitir su aplicación en sistemas biológicos (Antarnusa & Suharyadi,

2020). El recubrir nanopartículas metálicas por otras especies químicas aumenta también las interacciones electrostáticas con la carga de la superficie celular bacteriana y la unión a las células bacterianas (Y. Wang et al., 2020).

A continuación, se explicarán algunos polímeros con buenas propiedades para su aplicación como recubrimiento de nanopartículas metálicas.

2.4.1. Quitosano

La quitina, un componente estructural del exoesqueleto de los crustáceos, es la segunda biomolécula más abundante en la naturaleza (Motiei et al., 2017). El derivado más común de la quitina es su forma N-desacetilada llamada quitosano. El quitosano es un aminopolisacárido natural biodegradable, biocompatible y no tóxico usado en diversas aplicaciones (Natesan et al., 2020).

El quitosano tiene una buena actividad antimicrobiana frente a hongos y bacterias grampositivas y gramnegativas; baja inmunogenicidad y alergenicidad; fácil procesamiento; y propiedades físicas y químicas que lo convierten en un material atractivo para su aplicación como recubrimiento (Vaz et al., 2018). Como resultado, se ha utilizado ampliamente en el campo de los antibacterianos. Sin embargo, la solubilidad del quitosano limita en gran medida su actividad antibacteriana, por lo que generalmente recibe tratamientos o es utilizado en combinación con otras sustancias (J. Li & Zhuang, 2020).

Representa un material muy atractivo para el desarrollo de recubrimientos superficiales con actividad antibacteriana inherente y permite la posibilidad de funcionalizar con otros antimicrobianos más selectivos (Vaz et al., 2018)

2.4.2. Polivinilpirrolidona

La polivinilpirrolidona (PVP), también llamada povidona, es un polímero sintético obtenido por polimerización radical del monómero, N-vinilpirrolidona (Schwarz, 2018).

Es soluble en agua, inerte, no tóxica, resistente a la temperatura, estable al pH, biocompatible y biodegradable, que interactúa tanto con moléculas hidrofílicas como lipofílicas. Su naturaleza anfifílica le permite servir como estabilizador de superficie, modificador de crecimiento, dispersante de nanopartículas y agente reductor. (Koczur et al., 2015). Es por tales motivos que ha ganado un importante papel en la industria farmacéutica, biomédica, cosmética y alimentaria. La PVP ha sido reconocida por muchos países como un excipiente no tóxico (ingrediente no medicinal) y aditivo de grado alimenticio, siendo un material aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA). (Kurakula & Rao, 2020)

2.4.3. Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) es un polímero sintético aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA). Para sistemas de administración de medicamentos y consumo interno. Es un polímero hidrófilo, plastificante, biocompatible, biodegradable no tóxico, no inmunogénico y no inflamatorio (Pereira et al., 2019). Así mismo, el PEG ha demostrado mejorar la hidrofobicidad de los sistemas (Keihan et al., 2017). Tiene buenas características como material de recubrimiento, como una buena capacidad de adsorción y alta estabilidad térmica y química (Kadhim et al., 2019).

2.5. Generalidades sobre bacterias

Las bacterias se pueden clasificar en dos grandes grupos: gramnegativas y grampositivas. Estos dos grupos difieren uno del otro por las características de la pared celular de los organismos (Martinko et al., 2004). Las bacterias grampositivas

y gramnegativas pueden responder a las nanopartículas antibacterianas de manera diferente (Seil & Webster, 2012).

Las bacterias grampositivas poseen una pared celular relativamente simple que comprende una sola membrana rodeada por una capa gruesa de moléculas de peptidoglicanos (Mihai et al., 2020). Por el contrario, las bacterias gramnegativas tienen una pared celular más compleja que comprende de una capa interna delgada rodeada por una capa de una o dos moléculas de peptidoglicanos, y una membrana externa que contiene el lipopolisacáridos o endotoxinas y una estructura que contiene poros. El espacio entre las dos membranas se denomina periplasma y contiene una serie de enzimas degradantes y proteínas de transporte (Long et al., 2012).

Muchos estudios han encontrado que las bacterias grampositivas son más resistentes a los mecanismos de acción de los nanomateriales. La destrucción de la pared celular que se produce por la interacción física entre las nanopartículas y la pared celular es más perjudicial para las bacterias gramnegativas, ya que carecen de la capa gruesa de peptidoglicano que se encuentra en las bacterias grampositivas que posiblemente podrían actuar como una capa protectora (Slavin et al., 2017).

Las bacterias gramnegativas están recubiertas con moléculas de lipopolisacáridos, que tienen una carga negativa (Hemeg, 2017). Estas moléculas cargadas negativamente tienen una mayor afinidad por los iones positivos que liberan la mayoría de las nanopartículas metálicas, lo que conduce a una acumulación y una mayor absorción de iones, que causan un daño intracelular (Long et al., 2012).

La clasificación de tinción de Gram es de vital importancia ya que las características de la envoltura celular están asociadas con varias propiedades celulares, especialmente relacionadas con su respuesta a estímulos externos (Mihai et al., 2020). Así que los estudios de materiales con propiedades antibacterianas a menudo incluyen al menos una especie grampositiva y una especie gramnegativa en una variedad de ensayos para determinar su eficacia (Seil & Webster, 2012).

La actividad antibacteriana de las nanopartículas generalmente se estima en el grupo representativo de microorganismos patógenos conocido como “ESKAPE”, es decir, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y especies de *Enterobacter*, que son las principales responsables de las infecciones nosocomiales y que además tienen la capacidad para “escapar” de la acción de los agentes antibacterianos. Estas bacterias representan una amenaza importante para la salud pública (Botelho et al., 2019; Moritz & Gieszke-Moritz, 2013).

2.5.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es una bacteria anaerobia facultativa tipo grampositiva. Es ubicua en el medio ambiente y común en el cuerpo humano en la superficie de la piel y en la mucosa del tracto respiratorio superior (Lowy, 1998). Aproximadamente el 20% de la población humana son portadores a largo plazo de *S. aureus* y la mayoría de las personas no muestran síntomas clínicos; sin embargo, *S. aureus* es uno de los patógenos más peligrosos para los seres humanos (Guo et al., 2020).

Es el patógeno más común que causa infecciones de la piel y tejidos blandos y contribuye a la fisiopatología de trastornos cutáneos complejos como la dermatitis atópica (Totté et al., 2017). Puede producir una amplia gama de enfermedades tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal (Tang et al., 2015).

Es la causa principal de infecciones del tracto respiratorio inferior y la segunda causa principal de bacteriemia nosocomial, neumonía e infecciones cardiovasculares (Klein et al., 2007). *S. aureus* es uno de los principales patógenos en las infecciones nosocomiales (intrahospitalarias) y comunitarias (Guo et al., 2020). Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto

en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente (Humphreys, 2012).

S. aureus se considera además como una causa importante de transmisión zoonótica entre animales y humanos a través del contacto cercano o el consumo de alimentos infectados de origen animal (Kotb & Gafer, 2015).

El peligro de patogenicidad de *S. aureus* se asocia en gran medida con una combinación de capacidad invasiva, virulencia mediada por toxinas y resistencia a los antibióticos. Contiene un gran número de genes que codifican toxinas, como enterotoxinas, toxinas del síndrome de choque tóxico y toxinas exfoliativas (Guo et al., 2020).

Las infecciones por *S. aureus* son especialmente difíciles de tratar debido a la evolución de la resistencia a los fármacos antimicrobianos (Klein et al., 2007). Con el uso generalizado de la penicilina en la década de 1950, aparecieron las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina (Klein et al., 2007). Luego, con el uso generalizado de antibióticos ha insidido cada vez más su resistencia frente a antibióticos y apareciendo cepas de *S. aureus* resistentes a múltiples fármacos, que se ha considerado un problema de salud primordial (Totté et al., 2017).

El *S. aureus* resistente a la meticilina se encuentra en todo el mundo, y se ha convertido en uno de los patógenos más importantes en las infecciones nosocomiales y comunales. Las tasas de mortalidad asociadas con esta infección llegan hasta el 63,1% y las infecciones nosocomiales representan 60-80% de los casos. El *S. aureus* resistente a la meticilina ha desarrollado, además, resistencia a los desinfectantes convencionalmente utilizados en hospitales (D. Wang et al., 2018).

Dado que la resistencia contra los antibióticos clásicos está surgiendo rápidamente, se necesitan desesperadamente opciones de tratamiento alternativas (Totté et al., 2017).

2.5.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es una bacteria gramnegativa, aeróbica y ubicua perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* que es capaz de sobrevivir en una amplia gama de ambientes (Silby et al., 2011). Se encuentra presente en múltiples nichos ecológicos, prospera en hábitats acuáticos y terrestres debido a su versatilidad metabólica y puede colonizar seres vivos, causando infecciones tanto en seres humanos como en plantas y animales (Botelho et al., 2019).

Se le ha reconocido como un patógeno oportunista. Es la bacteria más común asociada con las infecciones nosocomiales y la neumonía asociada al ventilador (Barbier et al., 2013). Afecta principalmente a individuos inmunodeprimidos, causando alta morbilidad y mortalidad (Sadikot et al., 2005). Se le asocia con una gama cada vez más grande de infecciones agudas y crónicas potencialmente mortales, que incluyen fibrosis quística, infecciones del tracto urinario, otitis externa, infecciones en heridas y quemaduras, infecciones de huesos y articulaciones. bacteriemia e infecciones sistémicas (Botelho et al., 2019). *P. aeruginosa* representa más del 5% de las exacerbaciones infecciosas en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y se ha asociado con un aumento de la mortalidad de estos pacientes (Murphy, 2009).

P. aeruginosa ha desarrollado múltiples mecanismos para resistir a los agentes antimicrobianos. Su resistencia se puede dividir en resistencia intrínseca, resistencia adquirida y resistencia adaptativa. Dada la presencia de modos de resistencia tanto intrínsecos como adquiridos en *P. aeruginosa*, es sumamente difícil curar las infecciones resultantes (Smith, 2017). Algunas cepas de *P. aeruginosa* son resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos disponibles, desde el

carbapenem hasta las cefalosporinas de tercera generación, que son las opciones preferidas para tratar la resistencia a múltiples fármacos (Azam & Khan, 2019).

P. aeruginosa se encuentra en la categoría "crítica" de la lista de prioridades de patógenos bacterianos de la Organización Mundial de la Salud para los que se requiere con urgencia la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos (Tacconelli et al., 2018).

CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Se obtendrán tres diferentes sistemas nanoparticulados conformados por nanopartículas de magnetita recubiertas por un polímero (quitosano, polivinilpirrolidona y polietilenglicol) los cuáles presentarán distintas propiedades superficiales que serán aprovechadas para combatir bacterias tanto grampositivo como gramnegativo.

2.6. Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nanomateriales conformados por nanopartículas de magnetita con recubrimientos poliméricos y evaluar su potencial efecto antibacteriano.

3.3. Objetivos específicos

- Sintetizar por vía electroquímica nanopartículas de magnetita aplicando pulsos de potencial asimétricos.
- Obtener mediante modificación superficial, nanopartículas de magnetita recubiertas con diferentes polímeros: quitosano, polietilenglicol y polivinilpirrolidona.
- Realizar la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de magnetita sin y con modificación superficial mediante las técnicas de difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Evaluar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de magnetita

sintetizadas y modificadas con polímeros in vitro sobre el crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* mediante estudios de cinética de crecimiento microbiano y conteo de colonias en placa.

- Comparando los resultados obtenidos, determinar qué material a base de nanopartículas es más conveniente para su uso como agente antibacteriano frente a las bacterias estudiadas, considerando el efecto de la concentración.

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

4.1. Síntesis electroquímica de nanopartículas de magnetita

La síntesis de nanopartículas de magnetita se llevó a cabo mediante el método electroquímico de pulsos de potencial asimétricos, propuesto por Rodríguez y cols. (2012).

Se empleó un vaso de precipitados de 50ml como celda de vidrio. Se adaptó una configuración de dos barras de hierro de alta pureza separadas 1cm de distancia entre sí, que funcionaron como electrodo de trabajo y electrodo auxiliar (Fig. 2.a). Se sumergió 1cm² de su área geométrica en el medio electrolítico, correspondiente a una solución 0.5 M de cloruro de potasio (KCl) grado reactivo y de la marca J.T. Baker, en agua destilada.

Para la realización de algunas pruebas electroquímicas y selección de potenciales, se empleó una configuración de 3 electrodos (Fig. 2.b), usando un electrodo de plata (Ag | AgCl) como electrodo de referencia.

Ambas configuraciones se conectaron a un equipo potenciostato Gamry Reference 3000, con la ayuda del cual se realizaron estudios electroquímicos y se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas.

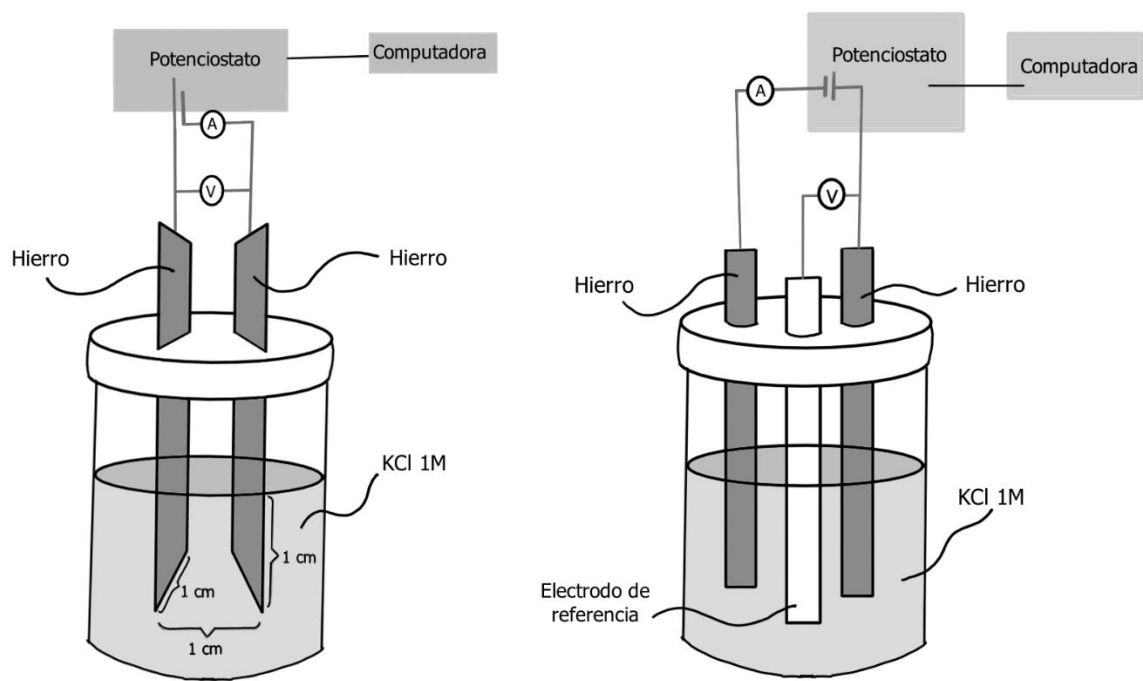


Figura 2. Diseño experimental: a) configuración de 2 electrodos y b) configuración de 3 electrodos, izquierda y derecha respectivamente

4.1.1. Selección de pulsos

Con la configuración de 3 electrodos, se obtuvo primeramente el potencial de circuito abierto del sistema. El valor obtenido, es decir, cuando el potencial se estabilizó, se empleó en las pruebas posteriores.

Para identificar y seleccionar los potenciales (pulso 1 y 2) de reducción y oxidación de los iones de hierro, se realizaron estudios de voltamperometría lineal en sentido anódico (desde potencial de circuito abierto hasta -0.1 V Ag | AgCl) y catódico (desde -1.5 V Ag | AgCl hasta el potencial de circuito abierto). Con ayuda de la literatura, se analizaron estos potenciales y se establecieron los potenciales anódico y catódico más convenientes a emplear en la síntesis por pulsos asimétricos.

Posteriormente, se realizaron estudios por cronoamperometría empleando los potenciales seleccionados previamente durante un tiempo de 30 s y la configuración de 2 electrodos, para así poder seleccionar el tiempo de duración de los pulsos idóneos para la síntesis.

4.1.2. Síntesis electroquímica

Una vez obtenidos los potenciales anódico y catódico y sus periodos de duración, se procedió a llevar a cabo la síntesis. Para ello, usando la configuración de 2 electrodos de hierro en la celda, se realizó una voltamperometría diferencial de pulsos, empleando dichos pulsos durante un lapso de 2 horas. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y presión atmosférica.

4.1.3. Obtención de polvos de nanopartículas de magnetita

Al finalizar las 2 horas, se desconectó la celda y se retiraron los electrodos. Luego se procedió a separar del medio las nanopartículas de magnetita formadas. Para ello, primero se extrajo y descartó el sobrenadante rojizo formado en la superficie, puesto que esa coloración indica la formación de una especie de hierro intermedia generada durante la síntesis, lo cual no es de interés para este trabajo. El resto del contenido de la celda fue sometido a centrifugación a 900 rcf durante 15 min, para posteriormente retirar el sobrenadante y realizar dos lavados más usando agua destilada y un último lavado con alcohol isopropílico.

Al terminar el lavado, las muestras se mantuvieron en refrigeración a -18°C y después se liofilizaron por 48 h a una temperatura de -52.5°C y una presión de 0.25 mbar empleando una liofilizadora Benchtop (LABCONCO). Los polvos obtenidos se almacenaron en tubos Eppendorf.

4.2. Modificación superficial con polímeros

Para obtener nanopartículas de magnetita recubiertas con polímeros, se siguió el método propuesto por Zhu y cols. (Zhu et al., 2008). Siguiendo esta metodología, se prepararon 100 ml una solución 1 M de ácido acético en agua destilada, en la que se disolvieron 20 mg de polímero surfactante (quitosano, polivinilpirrolidona o polietilenglicol) y se sometió a un baño ultrasónico durante 10 min con el fin de disolver perfectamente el polímero. En seguida se suspendieron 20 mg de nanopartículas de magnetita en la solución y se mantuvieron en agitación magnética a temperatura ambiente durante 18 h. Luego, se centrifugó la solución a 1000 rcf durante 45 min y el sedimento se lavó dos veces con agua desionizada para eliminar restos de ácido acético y el exceso de polímero. Se secó en una estufa durante 16 h a 65°C.

4.3. Caracterización fisicoquímica

4.3.1. Difracción de rayos X (XRD)

La difracción de rayos X es una de las herramientas clave más utilizadas para caracterizar nanopartículas metálicas. La técnica de difracción de rayos X proporciona información detallada sobre las fases, los parámetros de red, el tamaño de grano cristalino y las estructuras cristalinas. La composición, las estructuras cristalinas y la naturaleza de las fases se pueden determinar comparando la posición y la intensidad de los picos de rayos X con la base de datos de referencia disponible, mientras que el tamaño de grano cristalino se puede calcular mediante la ampliación de los picos (Kouhpanji & Stadler, 2020).

Para el estudio de las fases cristalinas presentes, se realizó un análisis de difracción de rayos X de los materiales en polvo, usando un equipo de difracción Bruker D8 Advanced con un tubo de sellado de cobre que genera radiación de Cu K α ($\lambda=1.5406$ Å) dentro de los ángulos de Bragg $10 < 2\theta < 80^\circ$ en pasos de 0.01° . Se hizo una comparación de los picos de reflexión obtenidos en los difractogramas con los

patrones de magnetita, maghemita, hierro metálico obtenidos mediante bases de datos, para de esta manera poder confirmar la formación exitosa de magnetita.

Los resultados obtenidos con este estudio fueron de utilidad también para estimar el parámetro de red y el tamaño de partícula.

4.4. Estudios microbiológicos

4.4.1. Cinética de crecimiento bacteriano

Para estudiar el efecto antimicrobiano de los materiales sintetizados con respecto del tiempo, se realizó un estudio de cinética bacteriana. Con este fin se prepararon 15 matraces estériles con 100 mL de medio agar LB líquido. Todos los estudios se realizaron por triplicado, entonces, 3 matraces control se mantuvieron únicamente con medio, mientras que a los 12 matraces restantes se les aplicaron tratamientos de 2mg/L de las nanopartículas sintetizadas: magnetita, M-Q, M-PVP y M-PEG.

Esta concentración se seleccionó para su estudio puesto que trabajos similares con nanopartículas de óxido de hierro modificadas con polímeros han reportado bajas concentraciones para la inhibición del crecimiento sobre ésta y otras bacterias, como lo son el trabajo de Arakha y cols. (2015) que reportaron una actividad bacteriostática a una concentración de 2 mg/L de nanopartículas de magnetita modificadas con quitosano frente a *E. coli*. Javanbakht y cols. (2016) reportaron un efecto bacteriostático frente a *S. mutants* bajo concentraciones de 1 a 3 mg/L de nanopartículas de magnetita modificadas con TEPSA. y cols. (2021) igualmente reportaron actividad bacteriostática de nanopartículas de magnetita modificadas con PEG a una concentración 1 mg/L frente a *S.aureus*.

A las nanopartículas previamente se les añadió 1 ml de agua destilada, luego se sometieron a sonicación durante 10 minutos hasta suspenderse y se esterilizaron bajo luz ultravioleta durante 2 horas.

Se tomaron alícuotas del control y de los matraces con tratamientos de nanopartículas, los cuales más tarde sirvieron como muestra blanco en los estudios de espectroscopía.

Cada matraz se inoculó con dos colonias de *P. aeruginosa* y se llevó a incubación a 37°C por 24 h con agitación continua. A lo largo de este tiempo se tomaron alícuotas de 1 mL de cada recipiente en intervalos de tiempo de 2 h. Estas alícuotas fueron analizadas a través de un espectrofotómetro UV-vis (Thermo Scientific Genesis 10S), a una longitud de onda de 600 nm para determinar la turbidez del sistema.

De acuerdo a la Organización Internacional de Normalización (ISO 7027), la turbidez se define como la disminución de la transparencia de un líquido causada por la presencia de partículas de un material distinto al propio líquido. Es entonces un indicador de apariencia óptica y solo puede ser medido usando técnicas ópticas. De acuerdo a la ley de Lambert-Beer, la turbidez es proporcional a la concentración de partículas.

Un haz de radiación monocromática paralelo con intensidad I_0 llega al medio absorbente perpendicular a la superficie; luego pasa a través de la longitud X del medio, que contiene partículas absorbentes que bloquearán la transmisión de la luz (átomos, iones o moléculas), la intensidad del haz disminuye a como resultado de la absorción y la dispersión.

Cuando el haz de luz atraviesa el fluido de la muestra, los sólidos suspendidos dispersan la luz en todas direcciones. La reducción de la intensidad del haz de luz se debe a la difusión del haz por dichos sólidos suspendidos en el medio. Así es como la turbidez es un indicador de crecimiento bacteriano

Esta misma prueba se realizó con la bacteria *S. aureus*, así que, de la misma manera, se emplearon 15 matraces con medio LB líquido, se aplicaron los tratamientos con nanopartículas, se inocularon 2 colonias en cada matraz, se incubaron por 24 horas tomando alícuotas cada 2 horas y se realizó el análisis UV-vis de cada muestra.

Cabe mencionar que la bacteria *S. aureus* con la que se trabajó fue aislada empleando un medio de cultivo selectivo y diferencial: agar manitol salado. Son muy pocas las bacterias capaces de crecer en un medio como este debido a su alta concentración de sal. Especialmente el *S. aureus* puede crecer en medios salinos, además de ser capaz de fermentar el manitol produciendo ácidos que modifican el pH del medio, el cual originalmente tiene un color rojo, pero debido a este cambio se torna color amarillo, formando pequeñas colonias, rodeadas por un área pigmentada amarilla (Sharp & Searcy, 2006).

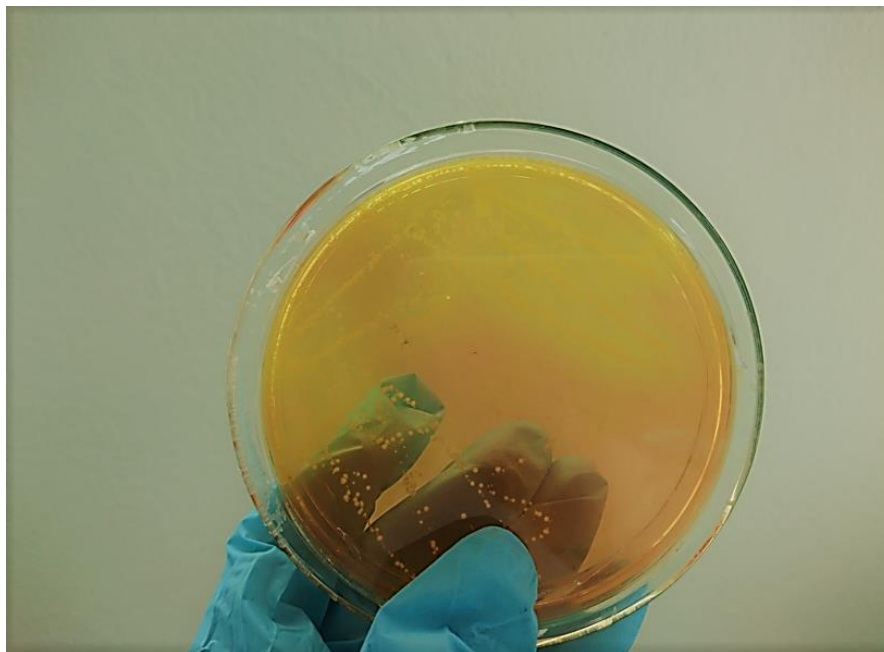


Figura 3. Cepa de S. aureus aislada en medio manitol-sal

Entonces, se tomaron muestras de la superficie de la piel de nariz humana con ayuda de un hisopo estéril y se inoculó en dicho medio de cultivo. Esto debido a que

aproximadamente el 30% de los adultos humanos presentan esta bacteria en esa zona de la piel sin causarles problema alguno (Humphreys, 2012). En la figura 3 se aprecia una fotografía de una de las placas donde se aisló la bacteria *S. aureus* y se observa cómo las colonias formadas efectivamente tienen un diámetro pequeño, color amarillo y que a su vez la región del medio que rodea a estas colonias se tornó de un tono rojizo a uno amarillento.

4.4.2. Conteo bacteriano en placa

Este estudio se realizó para evaluar el efecto antibacteriano de los materiales sintetizados de acuerdo a su concentración. Para ello se prepararon 27 cajas Petri con medio agar LB y tratamientos con nanopartículas. Todo se esterilizó previamente, las placas y el medio en autoclave y las nanopartículas con luz UV.

De la misma manera que en el estudio de cinética de crecimiento, todas las pruebas se realizaron por triplicado, es decir, se prepararon 3 placas con cada una de las concentraciones de cada material (magnetita, M-Q, M-PVP y M-PEG). Las concentraciones de material estudiadas fueron 0, 2 y 4 mg/L para las pruebas sobre *P. aeruginosa* y el experimento se repitió para *S. aureus* ahora con concentraciones de 0, 5 y 10 mg/L. En cada caja se inocularon alícuotas de 100 µL de una solución con la bacteria a una dilución de 1:1,000,000 y se extendieron perfectamente sobre la superficie del gel solidificado con la ayuda de un asa bacteriológica estéril.

Las diferentes placas se incubaron a 37°C durante 48 horas y luego se realizó el conteo de las colonias obtenidas, así como un análisis de imagen digital mediante el software ImageJ.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Síntesis de nanopartículas

Antes de comenzar las pruebas electroquímicas y la síntesis de nanopartículas, se obtuvo el potencial de circuito abierto del sistema, con un valor de -606mV vs Ag | AgCl, como se observa en la Figura 4, donde el potencial se mantiene prácticamente estable a partir del segundo 200. El potencial de circuito abierto se define como la diferencia de potencial entre las terminales de una celda electroquímica cuando no fluye corriente a través de ésta, por lo que también se le conoce como potencial de equilibrio. Al aplicar un potencial mayor al potencial de circuito abierto se facilitará un proceso de oxidación, lo mismo que un proceso de reducción con un potencial menor (Del Olmo et al., 2021). Es por ello que fue de suma importancia para este trabajo conocer este valor de potencial, para así poder realizar los estudios electroquímicos posteriores, como los de voltamperometría lineal, y conocer los potenciales en sentido anódico y catódico.

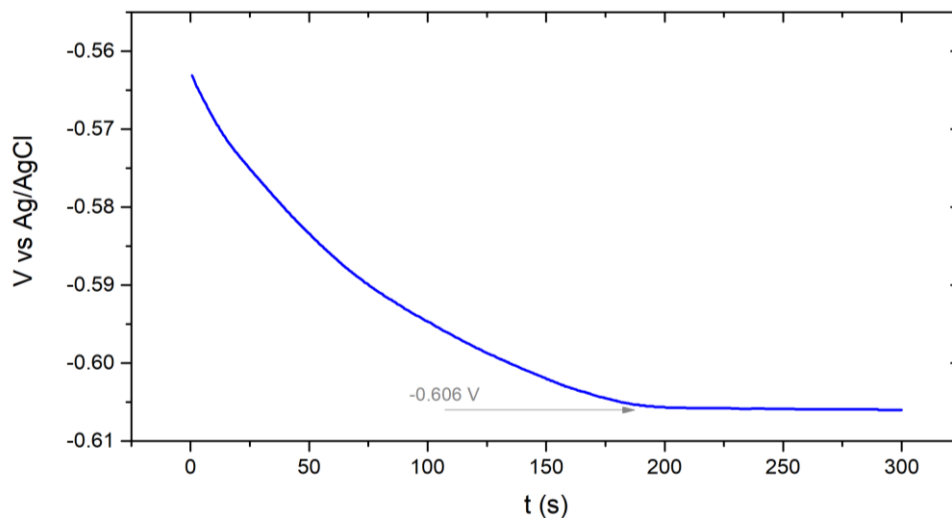


Figura 4. Potencial de circuito abierto

5.1.1. Selección de pulsos y potenciales

5.1.1.1. Voltamperometría lineal

Para la selección de los potenciales, se realizaron estudios de voltamperometría lineal en sentido catódico (Fig. 5) y anódico (Fig. 7), esto con el fin de establecer los potenciales a emplear en la síntesis por pulsos asimétricos.

La voltamperometría en sentido catódico se realizó desde el potencial de circuito abierto (-0.606 mV vs Ag | AgCl) hasta -1.5 V Ag | AgCl, aplicando una velocidad de barrido de 20 mV/s. En la Figura 5 es posible observar que la curva presenta un ligero cambio de pendiente a -1.1 V, aproximadamente, lo que se puede atribuir a la reducción del ion férrico (Fe^{3+}) a ion ferroso (Fe^{2+}) (Periasamy et al., 1996). Además de un segundo cambio de pendiente a -0.75 V Ag | AgCl, que suele atribuirse a la reducción del ion ferroso a hierro metálico (Ying et al. 2002).

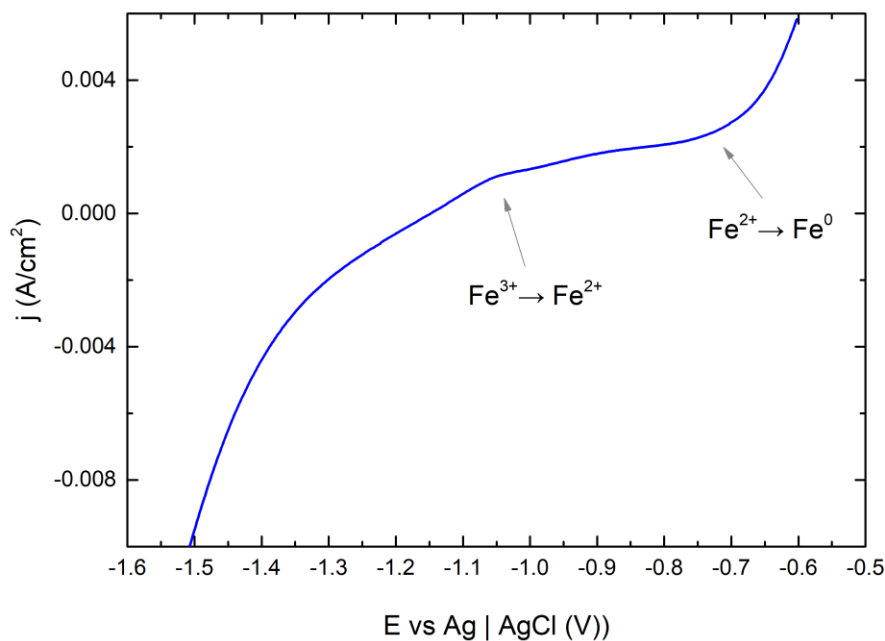


Figura 5. Voltamperograma en sentido catódico

La aparición de ambas señales en el voltamperograma en sentido catódico indica que el medio electrolítico (KCl 1M) oxida ligeramente al hierro metálico de los electrodos. Cabe mencionar entonces que el medio electrolítico influye en los estudios electroquímicos y la síntesis, así como el pH de la solución (Cabrera et al., 2008; Rodríguez-López et al., 2012). En la Figura 6 se muestra un diagrama que relaciona el potencial aplicado y el pH de la solución con las posibles fases de iones u óxidos de hierro a obtener. Para la formación de magnetita se requieren potenciales menores a 0 V y un pH alcalino.

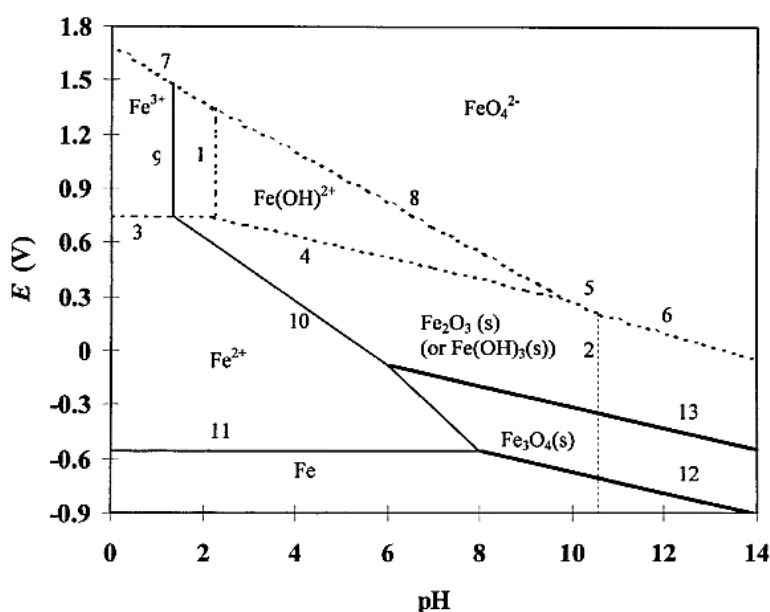


Figura 6. Diagrama de Pourbaix para el sistema Fe-H₂O a 25°C (Ying et al. 2002).

Con base en los resultados, se seleccionó como potencial catódico un valor situado entre las dos señales descritas previamente, con lo cual se pueden obtener tanto iones férricos como ferrosos sin presencia de hierro metálico, lo que favorece a la formación de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4 = \text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$). El potencial seleccionado para este estudio fue de -0.9 V vs Ag | AgCl.

En el estudio de voltamperometría lineal en sentido anódico, realizado desde el potencial de circuito abierto hasta -0.1 V Ag | AgCl, no fue posible observar algún pico de oxidación (Fig. 7) pero sí un cambio de pendiente alrededor de -0.3 V Ag |

AgCl, comportamiento que puede atribuirse a un cambio en el proceso de oxidación. De acuerdo a lo reportado por Rodríguez-López y cols. (2012), las nanopartículas sintetizadas empleando un potencial anódico menor a este valor presentan la coexistencia de las fases magnetita (Fe_3O_4) y maghemita (Fe_2O_3), mientras que un potencial anódico mayor al cambio de pendiente favorece a la formación únicamente de magnetita, que es el objetivo de este trabajo. Por ello, el potencial anódico que se seleccionó fue de $-0.25 \text{ V Ag | AgCl}$, al ser un valor que se posiciona después del cambio de pendiente.

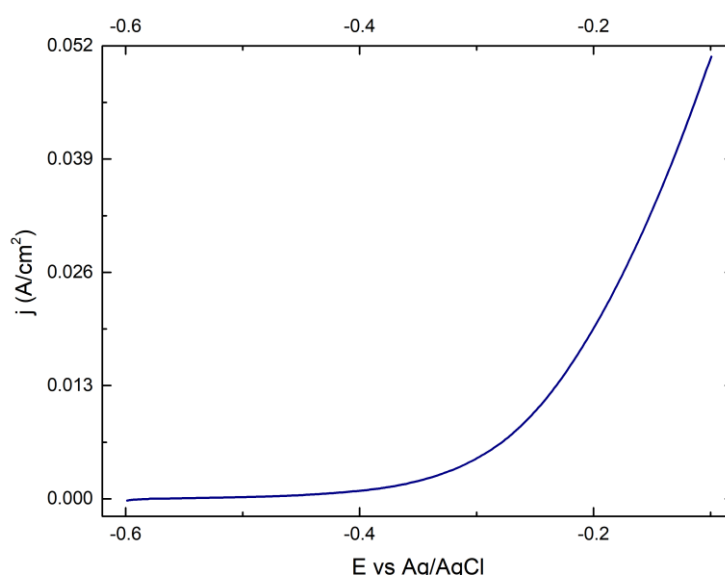


Figura 7. Voltamperograma en sentido anódico

5.1.1.2. Cronoamperometría

Se realizaron estudios por cronoamperometría utilizando los potenciales seleccionados previamente durante un tiempo de 25 s, para seleccionar el periodo de duración de los pulsos más conveniente para emplear en la síntesis electroquímica.

El cronoamperograma obtenido al aplicar el potencial catódico (-0.9 V Ag | AgCl) se muestra en la Figura 8. Inicialmente, la corriente presenta un incremento y luego disminuye abruptamente de -0.05 a -0.02 A/cm^2 . Entonces se observa un aumento

continuo de la corriente hasta el segundo 6 para posteriormente mantenerse estable.

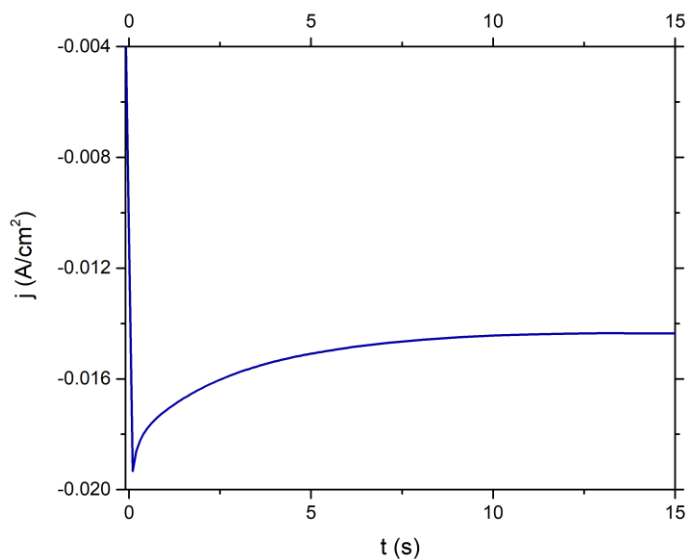


Figura 8. Cronoamperograma en sentido catódico

La estabilidad de la corriente indica que el proceso se está llevando a cabo mediante difusión, por lo cual se eligió un periodo de 3 segundos para el pulso catódico, tiempo en el que todavía no se estabiliza la corriente, lo que favorece una síntesis electroquímica controlada por transferencia de carga (Rodríguez-López et al., 2012)

Para la selección del periodo del pulso anódico, igualmente se realizó un estudio de cronoamperometría, pero esta vez a un potencial de -0.25 V Ag | AgCl. En la Figura 9 se puede apreciar un incremento de corriente que inmediatamente disminuye hasta el segundo 7, cuando la corriente comienza a estabilizarse (proceso mediado por difusión). De esta manera se seleccionó un tiempo de 5 segundos para la aplicación del pulso anódico.

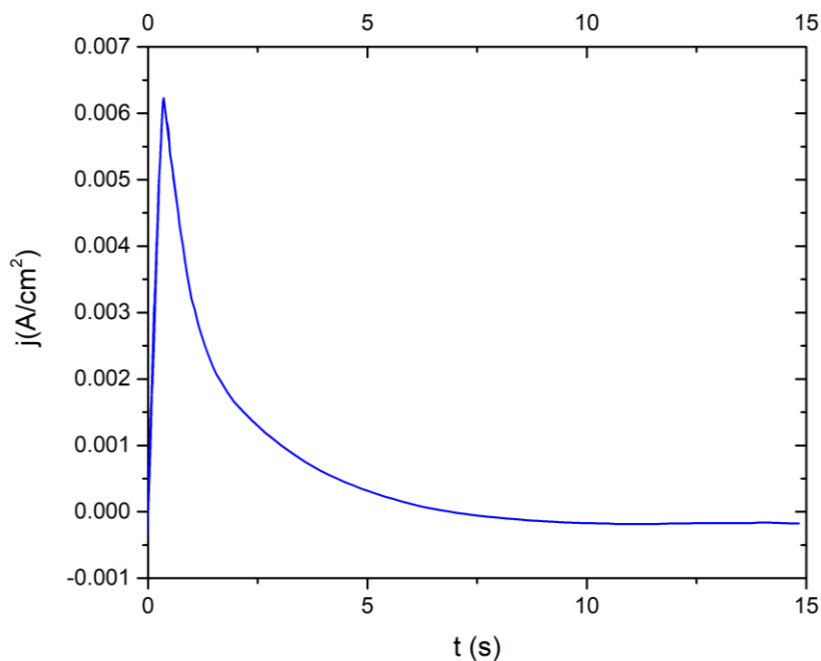


Figura 9. Cronoamperograma en sentido anódico

5.1.2. Pulsos asimétricos

Para la síntesis electroquímica de nanopartículas de magnetita por pulsos de potencial asimétricos, se aplicaron los pulsos seleccionados en los estudios mencionados anteriormente, puesto que favorecen la producción de las especies férricas necesarias para la formación de magnetita. De esta manera, el pulso catódico aplicado fue de -0.9 V Ag | AgCl durante 5 segundos y el anódico, de -0.25 V Ag | AgCl durante 3 segundos. Estos pulsos se aplicaron alternadamente durante 2 horas.

El pH de la solución electrolítica se midió antes y después de llevar a cabo la síntesis y se obtuvo un incremento de 6.1 a 9.9 unidades de pH, lo cual es un indicativo de que la formación de magnetita se vio favorecida. El incremento de pH es atribuido a la formación de los iones hidroxilo generados mediante la hidrólisis del agua. De

acuerdo a Andrade y cols. (2010), quienes estudiaron el efecto del pH en la síntesis de nanopartículas magnetita, las síntesis que se llevan a cabo bajo un pH entre 9.7 a 10.6 tienden a producir magnetita pura o con cantidades despreciables de otros óxidos de hierro.

En la Figura 10 se observa el comportamiento de la corriente durante la síntesis electroquímica con respecto al tiempo. Se pueden apreciar los pulsos catódicos y anódicos en el primer minuto. El primer pulso (anódico) comienza con una corriente alta que después disminuye con el pulso catódico, para luego aumentar en el siguiente pulso, después incrementar nuevamente y así sucesivamente durante 2 horas.

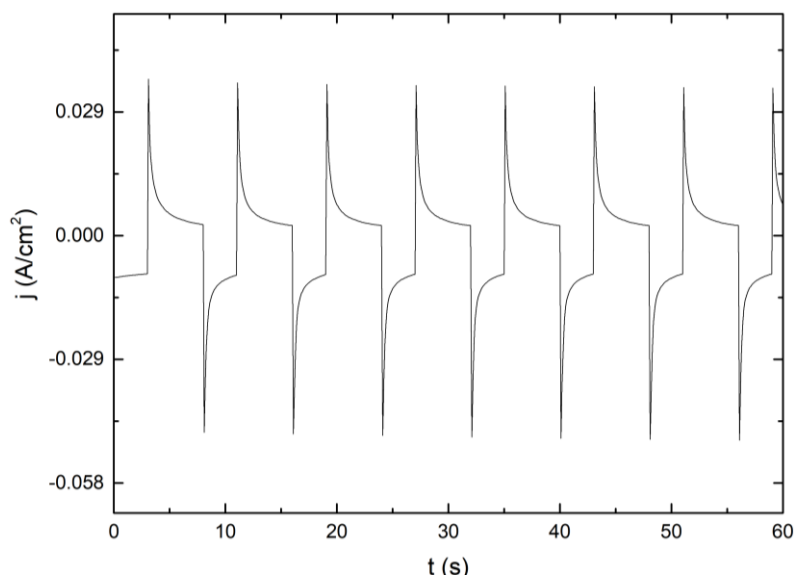


Figura 10. Primer minuto de síntesis de magnetita por pulsos de potencial asimétricos

El comportamiento de la corriente de salida respecto al tiempo al cabo de 2 horas se representa en la Figura 11. La corriente de los pulsos catódicos disminuyó después de 20 minutos para luego estabilizarse, mientras que la corriente de los pulsos anódicos incrementó hasta el minuto 33, lo que puede significar que al inicio

del experimento hay poca materia disponible para oxidar y por tanto la corriente es baja, pero conforme pasa el tiempo se forman partículas susceptibles de oxidarse electroquímicamente cerca de la interfase, necesitando aparentemente mayor cantidad de corriente, y posteriormente también se mantuvo estable. Finalmente, la intensidad de corriente catódica también se estabilizó hasta el final de la síntesis. La estabilidad de corriente tanto anódica como catódica se puede atribuir a un equilibrio entre la formación de especies intermedias, partículas en las superficies de los electrodos y partículas precipitadas al fondo.

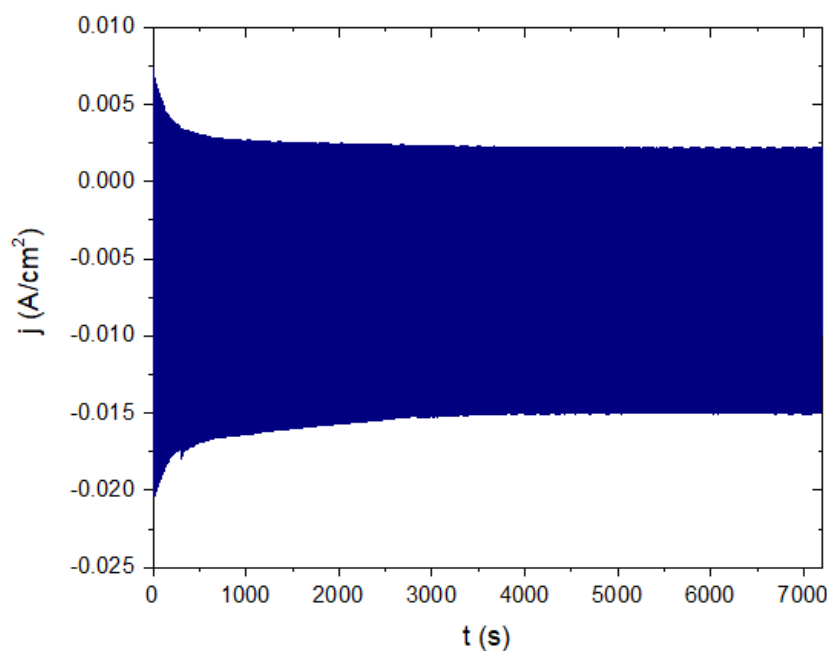


Figura 11. Comportamiento de la corriente durante la síntesis electroquímica de magnetita por pulsos de potencial asimétricos en KCl 0.5M

En la Figura 12.a) se observa una fotografía de la celda electrolítica al inicio de la síntesis de magnetita. Se aprecia el sistema de dos electrodos de hierro en una solución incolora, con una ligera tonalidad amarillenta en la interfase electrodo-

electrodo, que indica el comienzo de la reacción. Este color es atribuible a la formación de hidróxido ferroso ($\text{Fe}(\text{OH})_2$), una especie precursora necesaria para la síntesis (Fajaroh et al., 2012; Montoya et al., 2017; Reséndiz-Ramírez et al., 2022). También es probable que esa tonalidad indique la presencia de iones Fe^{3+} que, en solución acuosa, genera tonos amarillos y rojizos.

La Figura 12.b) muestra la celda después de 10 minutos de síntesis, donde es presente un poco de precipitado en tonalidades verdosas y oscuras. De acuerdo a Lozano y cols. (2017), ese color verde se debe también a la formación de $\text{Fe}(\text{OH})_2$, aunque también podría deberse a la coloración verdosa de los iones Fe^{2+} en solución. Al mismo tiempo se observa una ligera tonalidad color café que puede atribuirse a iones Fe^{3+} . Cabe recalcar, que de acuerdo a Reséndiz-Ramírez y cols. (2022), los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} reaccionan entre sí para formar magnetita.

La Figura 12.c) es una fotografía de la celda al finalizar la síntesis, donde se observa que la solución de trabajo se tornó de un color café rojizo, que es posible que indique la presencia de oxihidróxido férrico, el cual tiene un color característico anaranjado oscuro (Cornell et. al., 2003) y un precipitado color negro, característico de la magnetita.



Figura 12. a) Celda electroquímica al inicio de la síntesis, b) después de 10 min y c) al finalizar las 2 horas

Al finalizar la síntesis, se procedió a realizar lavados del material negro formado en el precipitado, descartando el sobrenadante color café-rojizo. En la Figura 13 se muestra una fotografía de las nanopartículas obtenidas suspendidas en agua destilada para realizar los lavados. En evidente el color negro intenso característico de la magnetita.



Figura 13. Nanopartículas de magnetita en solución

5.2. Modificación superficial

Se empleó el método de modificación superficial de nanopartículas propuesto por Zhu y cols., (2008). Aunque esta metodología ha sido ampliamente utilizada para modificar nanopartículas de óxido de hierro con quitosano, en este trabajo se

empleó igualmente para recubrir nanopartículas de magnetita con PEG y PVP. Siguiendo esta metodología se disolvieron 20 mg de polímero en 100 mL de solución de ácido acético 1 M y se sometió a sonicación durante 10 min con el fin de disolver perfectamente el polímero. Posteriormente, se suspendieron 70 mg de las nanopartículas en la solución de quitosano previamente preparada. Se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante 18h y se observó un ligero cambio de color de la solución de negro a café, como indicativo de la adsorción de las moléculas de polímero sobre la superficie de las nanopartículas de magnetita.

En la Figura 14 se muestra una comparación de los materiales obtenidos. Las nanopartículas de magnetita presentan un color negro, mientras que las nanopartículas modificadas presentan un color negro también con tonalidades cafés.



Figura 14. Izquierda: Solución de ácido acético, PVP y nanopartículas de magnetita en el minuto 1. Derecha: Solución después de 20 horas

Diversos autores han sugerido que la ruta más favorable para la estabilización de las nanopartículas de hierro es quizás la unión directa al grupo Fe-OH que se encuentra presente en la superficie de las nanopartículas de magnetita (Fig. 15).

Esta unión puede ser covalente o de tipo electrostática y se requiere de un grupo reactivo que tenga afinidad por el Fe-OH (Barrow 2015).

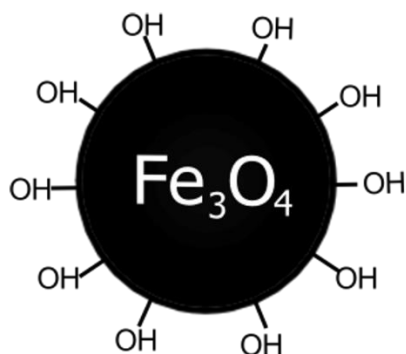


Figura 15. Representación de nanopartícula de magnetita

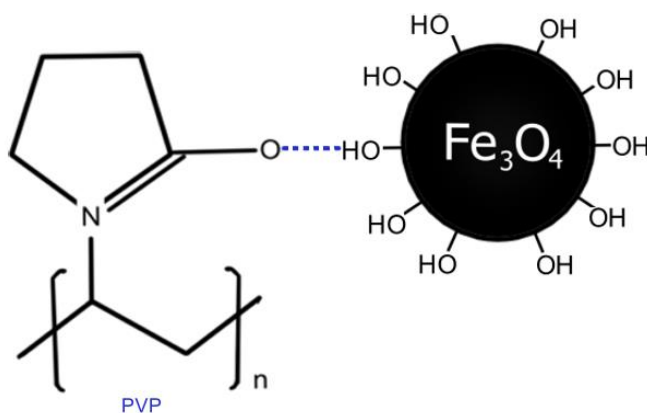


Figura 16. Modificación superficial de las nanopartículas de magnetita con PVP mediante enlaces puente de hidrógeno

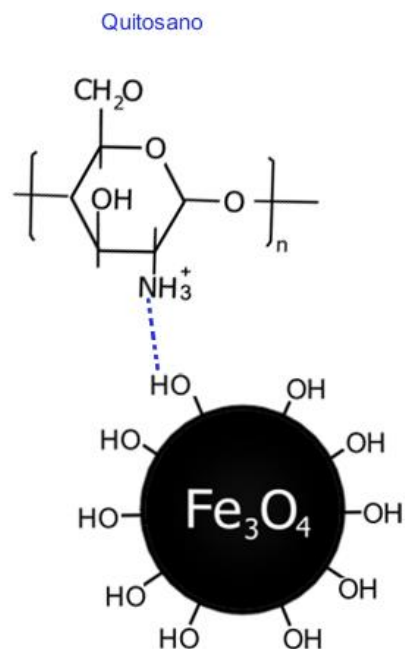


Figura 17. Modificación superficial de las nanopartículas de magnetita con quitosano mediante enlaces puente de hidrógeno

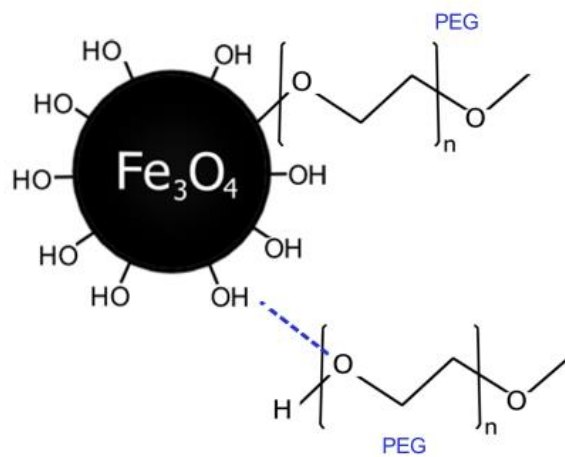


Figura 18. Modificación superficial de las nanopartículas de magnetita con quitosano mediante enlaces puente de hidrógeno y enlaces covalentes

En las Figuras 16, 17 y 18 se muestran los mecanismos de unión de los polímeros a las nanopartículas de magnetita propuestos con base en la literatura. Los grupos funcionales de los polímeros, carbonilo para PVP, amino para quitosano e hidroxilo para PEG se atraen principalmente de manera electrostática a la superficie de las nanopartículas. En este trabajo no fue posible determinar la carga superficial de las nanopartículas con y sin modificación, pero en estudios posteriores sería de utilidad determinar esta propiedad, para lo cual se puede utilizar la técnica de Potencial Z.

El cambio de coloración de la magnetita se puede atribuir a que la modificación superficial con polímeros se llevó a cabo en medio ácido al tratarse de una solución de ácido acético. También se atribuye a la oxidación de la magnetita durante la formación del recubrimiento, mediante las uniones covalentes de los polímeros con el grupo hidroxilo del óxido en la superficie de la partícula.



Figura 19. Polvos de a) nanopartículas de magnetita desnudas, b) M-PEG, c) M-Q y d) M-PVP

5.3. Difracción de rayos X (XRD)

En la Figura 20 se muestran los resultados de las pruebas de difracción de rayos X correspondientes a las nanopartículas de magnetita desnudas y modificadas con

polímeros. Se incluye también un difractograma correspondiente a magnetita obtenido de la base de datos RRUFF, el cuál es útil para comparar los resultados experimentales con magnetita pura, y así poder determinar si efectivamente se obtuvo el material deseado o si se encuentra presente junto con alguna otra fase.

La magnetita desnuda presenta 6 picos de refracción bien definidos a 30.263° , 35.524° , 43.358° , 53.080° , 57.155° y 62.583° , correspondientes a los planos (220), (331), (400), (422), (511) y (440), característicos de la estructura cúbica tipo espinela inversa de la magnetita. Las difracciones de las nanopartículas forman picos de mayor amplitud en comparación con el patrón referencia, correspondiente a la magnetita en bulto. Esto es algo que suele suceder en las nanopartículas metálicas e indica dominios de dispersión coherentes en la nanoescala (Permien et al., 2013).

Las nanopartículas de magnetita modificadas superficialmente con los diferentes polímeros demostraron presentar también los mismos planos que las nanopartículas de magnetita desnudas, lo que significa que la modificación no afectó a la estructura cristalina de la magnetita.

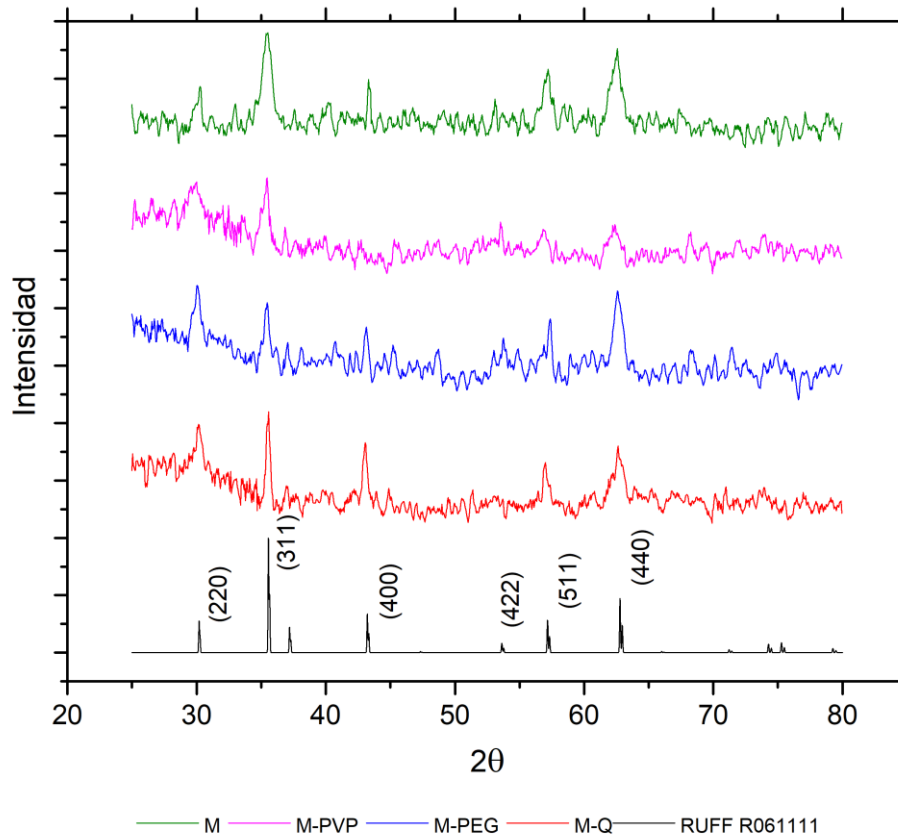


Figura 20. Difractogramas de los materiales sintetizados. Nota: Intensidad en unidades arbitrarias

Los difractogramas correspondientes a las nanopartículas de magnetita recubiertas muestran un aumento de la línea base a ángulos bajos, que se puede apreciar de 25 a 35°, lo que puede ser atribuido a la naturaleza amorfa de los recubrimientos poliméricos, evidenciando entonces el éxito de la modificación superficial de las nanopartículas de magnetita. Este comportamiento ha sido reportado previamente en otros estudios con nanopartículas de óxido de hierro recubiertas por polímeros (Samrot 2018; Arista 2019; Gervits 2019).

Se realizó un análisis más detallado del pico de difracción característico, correspondiente al plano (311) de las nanopartículas de magnetita sintetizadas

(Figura 21) comparado con las reflexiones de Bragg correspondientes a ese mismo plano obtenidas de los patrones XRD estándar para magnetita y maghemita (Cornell & Schwertmann, 2003). Se puede observar que el valor 2θ máximo en el pico del material sintetizado corresponde únicamente con la fase de magnetita, sin presentar la fase maghemita. Lo que es un indicador de la obtención de magnetita de alta pureza.

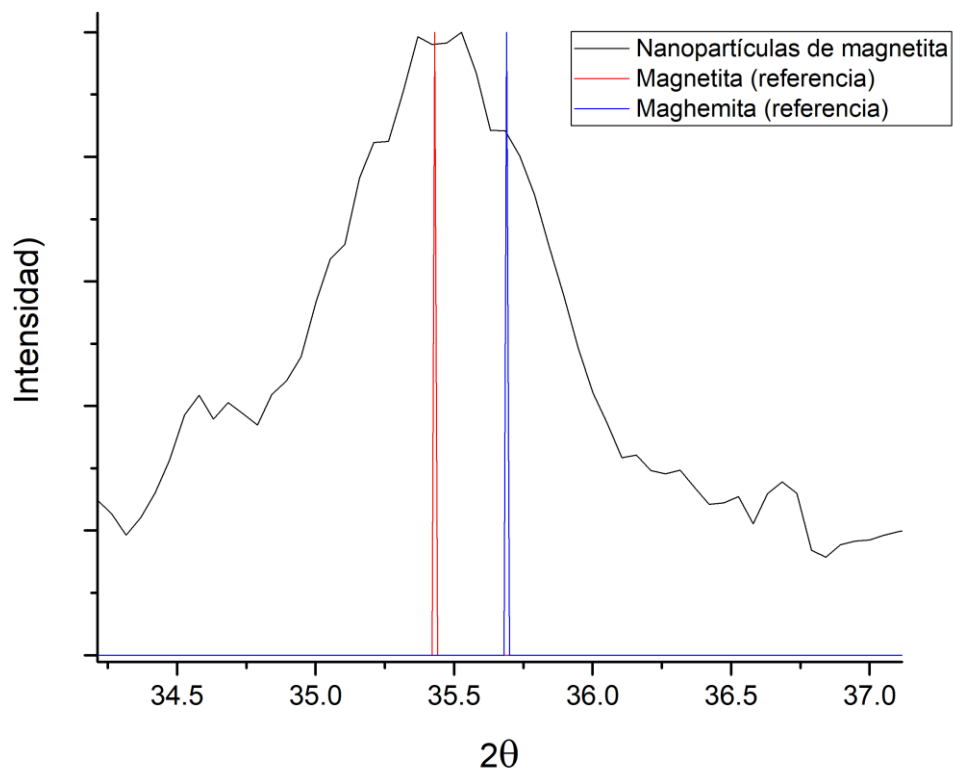


Figura 21. Pico característico (311) de las nanopartículas de magnetita sintetizadas comparado con magnetita y maghemita (Cornell & Schwertmann, 2003)

Para corroborar la obtención de magnetita, se utilizaron los patrones de XRD de cada material sintetizado para calcular el parámetro de red. El valor para la magnetita en bulto es 8.39 Å. Los valores obtenidos para la magnetita sintetizada se encuentran ligeramente por debajo de este valor, lo que significa también una

contracción en el volumen de celda unitaria. Este efecto se puede explicar en términos del número de átomos en la superficie de las nanopartículas, que es grande en proporción con la cantidad de los átomos que constituyen el núcleo de las nanopartículas. A medida que disminuye el tamaño de las nanopartículas, la cantidad de átomos de la superficie es considerablemente más grande y la minimización de la energía de la superficie requiere la contracción de la red, lo que resulta en una menor distancia de celda unitaria o parámetro de red (Gholizadeh, 2017).

La amplitud de los picos de difracción se utilizó para calcular el tamaño de las partículas mediante la ecuación de Scherrer:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

En esta ecuación, θ es el ángulo del pico, β es el ancho total a la mitad del máximo del pico de difracción respectivo, k es una constante que se relaciona con la forma de la partícula (0.89 para partículas esféricas) y λ es la longitud de onda de la radiación de rayos X, que en este estudio fue de 1.541 Å. Se calculó el tamaño de partícula de cada material considerando 3 planos principales, (311), (511) y (440), y se promediaron los resultados. Los tamaños estimados se indican en la Tabla 4.

Cabe destacar que la ecuación de Scherrer es una herramienta originalmente propuesta para calcular el tamaño de cristalito. No obstante, se han reportado varios trabajos que sugieren que esta ecuación es también útil y relativamente confiable para calcular particularmente el tamaño de nanopartículas de magnetita (Gholizadeh, 2017; Rodríguez-López et al., 2012; Schwaminger et al., 2020; Takai et al., 2019).

En general, el ensanchamiento de los picos de Bragg de la magnetita sintetizada es un indicativo de la formación de nanopartículas (Pham et al., 2016). El tamaño medio calculado de los cristalitos de las nanopartículas de magnetita desnudas fue de 9.22 nm, mientras que para los materiales con modificación superficial se calculó

un tamaño de 11.83, 15.51 y 13.95 nm, para M-PVP, M-PEG y M-Q respectivamente, con lo que se puede corroborar la obtención de nanopartículas, al estar dentro del rango de la nanoescala. Sin embargo, para el caso de las nanopartículas recubiertas, no se puede considerar el tamaño calculado mediante esta técnica como el tamaño de partícula total, pues solo se está considerando a la parte cristalina que es la magnetita, pero no la contribución de los polímeros al tamaño de partícula. Por ello, sería conveniente realizar estudios posteriores para calcular la distribución de tamaños de partícula, como puede ser la técnica de dispersión dinámica de luz o DLS por sus siglas en inglés.

Rodríguez y cols. (2012) llevaron a cabo una serie de estudios para sintetizar nanopartículas de magnetita por pulsos de potencial asimétricos empleando diferentes potenciales anódicos y catódicos y diferentes tiempos de pulso, demostrando que el tamaño de las nanopartículas es dependiente de dichos valores. No se ha reportado previamente en la literatura una síntesis electroquímica por este método empleando un potencial catódico de -0.9 V durante 5 segundos y uno anódico de -0.25 V durante 3 segundos.

Tabla 4. Cálculos a partir de los resultados XRD. Nota: Los valores son el promedio de 3 cálculos para 3 diferentes picos de difracción y s corresponde a la desviación estándar

Material	Tamaño (nm)	s	Parámetro de red (Å)	s
M	9.22	0.7937	8.3678	0.0215
M-PVP	11.83	2.2219	8.3712	0.0087
M-PEG	15.51	3.5229	8.3746	0.0231
M-Q	13.95	4.9008	8.3618	0.0147

5.4. Cinética microbiana

Con la finalidad de evaluar el efecto antimicrobiano de los materiales sintetizados, es decir, las nanopartículas de magnetita desnudas y modificadas, se realizaron estudios de cinética de crecimiento microbiano. Los estudios se realizaron en un periodo de 24 horas, haciendo mediciones cada 2 horas.

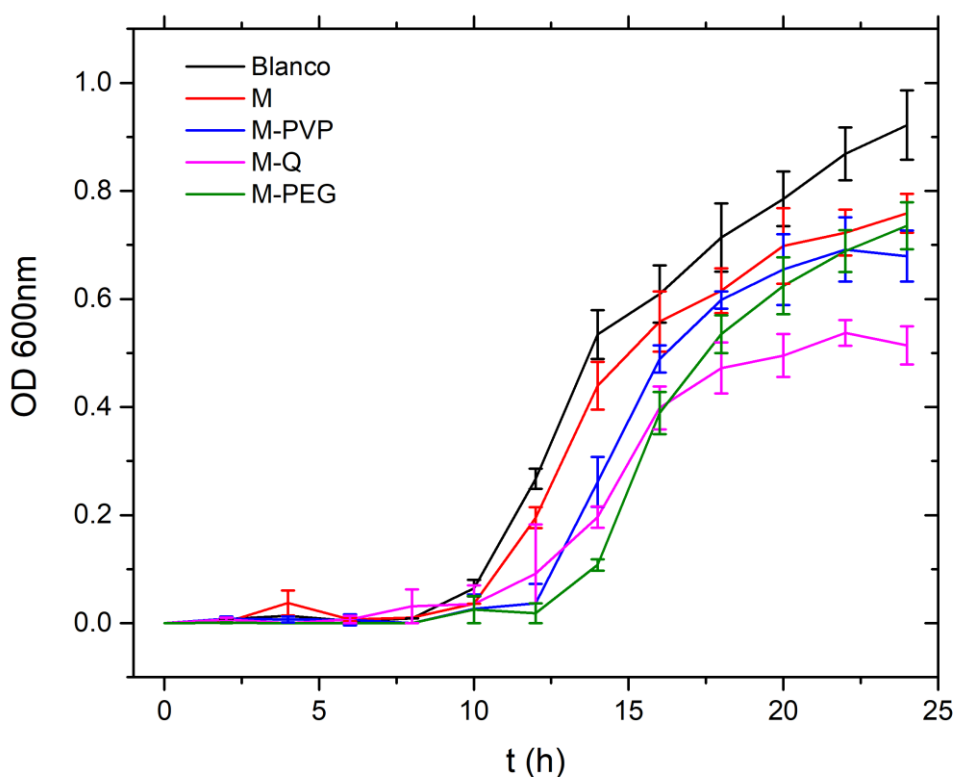


Figura 22. Curvas de cinética de crecimiento durante 24 horas de *S. aureus* con tratamientos de nanopartículas de magnetita desnudas y modificadas

Las curvas obtenidas de las pruebas realizadas con *S. aureus* se muestran en la Figura 22. La cinética de crecimiento para las muestras control (sin tratamientos con nanopartículas) presentó dos fases: durante las primeras 8 horas se mantuvo en

fase de latencia, lo que significa que los microorganismos se encuentran en un proceso de adaptación al medio y por ello no hay crecimiento celular; y después comenzó la fase exponencial, donde las bacterias comenzaron a multiplicarse aceleradamente.

La curva de crecimiento de *S. aureus* con un tratamiento de 2 mg/L de nanopartículas de magnetita desnudas presentó un comportamiento similar a las pruebas control, mostrando una fase de latencia durante las primeras 10 horas y después una fase exponencial, en la que el crecimiento se dio a gran velocidad, aunque ligeramente por debajo de la curva control. Tal es así que al cabo de 24 horas, la densidad óptica medida para el control fue de 0.9 mientras que para la muestra con magnetita resultó de 0.7, lo que indica que el material inhibió un 22% el crecimiento de *S. aureus*, y es muy probable que este efecto se vea mejorado a mayores concentraciones, pues la concentración mínima inhibitoria para nanopartículas de magnetita reportada es generalmente más grande. Por ejemplo, Amutha y Sridhar (2015) reportan una actividad bacteriostática para nanopartículas de magnetita obtenidas mediante síntesis verde a 30 mg/mL para *S. aureus* mientras que W. Li y cols. (2020) sintetizaron nanopartículas de magnetita mediante una síntesis hidrotermal y reportaron que el efecto bactericida de éstas frente a *S. aureus* sólo se observaba a partir de una concentración de 1 g/L.

Las pruebas con M-PVP y M-PEG arrojaron resultados muy similares, presentando una fase de latencia durante 12 horas, para después comenzar la fase exponencial. El tratamiento con M-PVP mostró un efecto inhibitorio que es evidente al comparar su curva de cinética contra la del control. Es probable que en las últimas 4 horas la bacteria entró en la tercera fase de su crecimiento, la fase estacionaria.

El mejor efecto inhibitorio frente a *S. aureus* se observó en los tratamientos con nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano. Para las bacterias tratadas con este material, a fase estacionaria se llevó a cabo durante las primeras 10 horas y en seguida inició la fase exponencial, con un crecimiento más lento que el de la muestra control. Al cabo de 18 horas, las bacterias entraron en la fase estacionaria,

con un crecimiento celular lento y despreciable, y manteniéndose así hasta completar las 24 horas. La densidad óptica final fue de 0.5 que, comparada con la del control de 0.9, indica una inhibición de crecimiento del 44%, lo cual es considerable. De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que el material bajo la concentración estudiada (2 mg/L) ejerce un efecto antibacteriano de tipo bacteriostático contra *S. aureus*. Cabe mencionar que en el 80% de los estudios reportados en la literatura, las nanopartículas de óxido de hierro han mostrado tener una acción antibacteriana de tipo bacteriostática (Gudkov et al., 2021).

Es destacable observar el comportamiento de las curvas de cinética de crecimiento bacteriano durante las primeras 12 horas (Fig. 23). M-PVP y M-PEG se mantienen en valores cercanos a 0 (sin crecimiento microbiano), mientras que el resto de los materiales evaluados y el control muestran crecimiento. Esto significa que M-PVP y M-PEG tienen una excelente actividad antimicrobiana durante 12 horas.

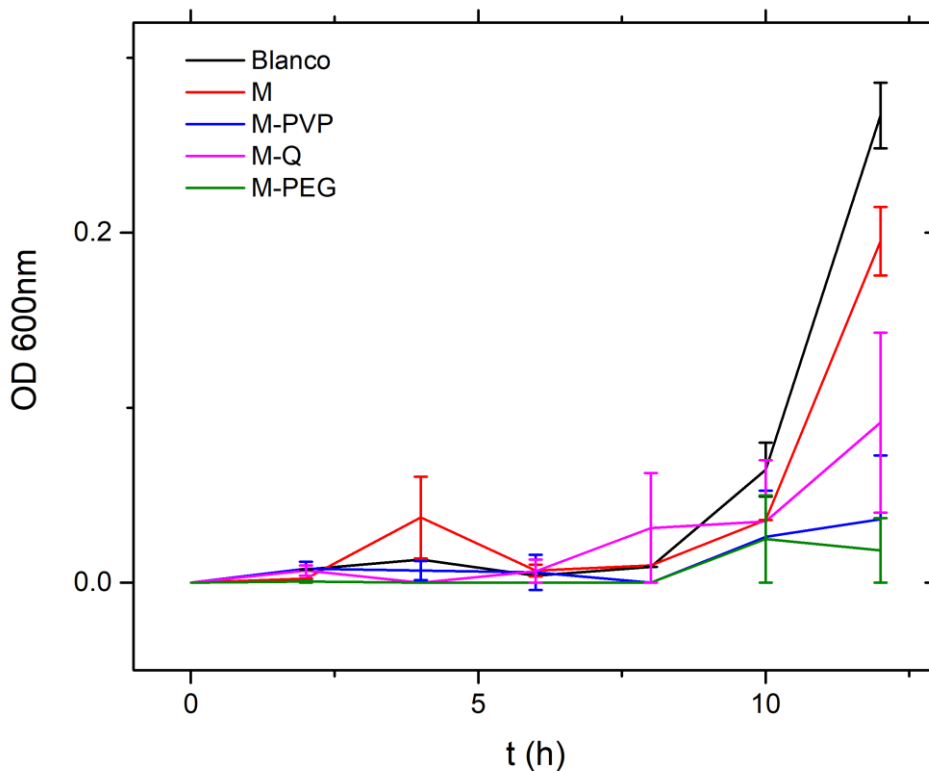


Figura 23. Curvas de cinética de crecimiento durante 12 horas de *S. aureus* con tratamientos de nanopartículas de magnetita desnudas y modificadas

Los mecanismos de acción antimicrobiana de las nanopartículas de magnetita se han sugerido en varios estudios en función de su tamaño y son comunes para otros tipos de nanopartículas de óxido metálico. Para las nanopartículas de magnetita, se han propuesto diversos mecanismos, siendo uno de los principales la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales tienen una acción genotóxica, dañando las moléculas de ADN. Los iones metálicos como Fe^{2+} y Fe^{3+} pueden unirse a los grupos de proteínas mecapto ($-SH$), amino ($-NH$) y carboxilo ($-COOH$) de dichas las enzimas, lo que conduce a una inactivación o inhibición enzimática parcial. Una disminución en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (SOD, catalasa y glutatión reductasa) puede ocasionar un aumento en la concentración de ROS (Gudkov et. al., 2021). Además, las nanopartículas de hierro, entre ellas las de magnetita, han demostrado la capacidad de dañar la integridad de la pared celular bacteriana. Otros mecanismos sugieren que las nanopartículas de magnetita pueden penetrar en el citoplasma, concentrarse allí dentro y ocasionar la formación de vacuolas y la consiguiente disrupción de la pared celular (Gabrielyan 2019).

Sin embargo, los mecanismos de acción de las nanopartículas de magnetita con recubrimientos como quitosano, PEG y PVP han sido poco estudiados, por lo que se requieren más estudios al respecto. Y en el caso de este trabajo no es posible determinar el mecanismo por el cual el crecimiento bacteriano se ve inhibido. Lo que es evidente es que la modificación superficial mejora la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de magnetita y es probable que esto se deba a que el recubrimiento les confiere a las partículas una mejor estabilidad y, en este caso que las pruebas se realizaron en medio líquido, una mejor solubilidad, lo que implica una menor tendencia a formar aglomerados o precipitarse. También, se sugiere que este efecto puede ser temporal y que con el paso del tiempo los recubrimientos, principalmente PEG y PVP se fueron perdiendo en las superficies de las nanopartículas.

Para evaluar el efecto antimicrobiano de los materiales contra la bacteria *P. aeruginosa* se llevó a cabo un estudio semejante de cinética de crecimiento. En la Figura 24 se observan los resultados de las curvas de cinética del control, y las muestras tratadas con nanopartículas de magnetita desnudas y recubiertas a una concentración de 2 mg/L.

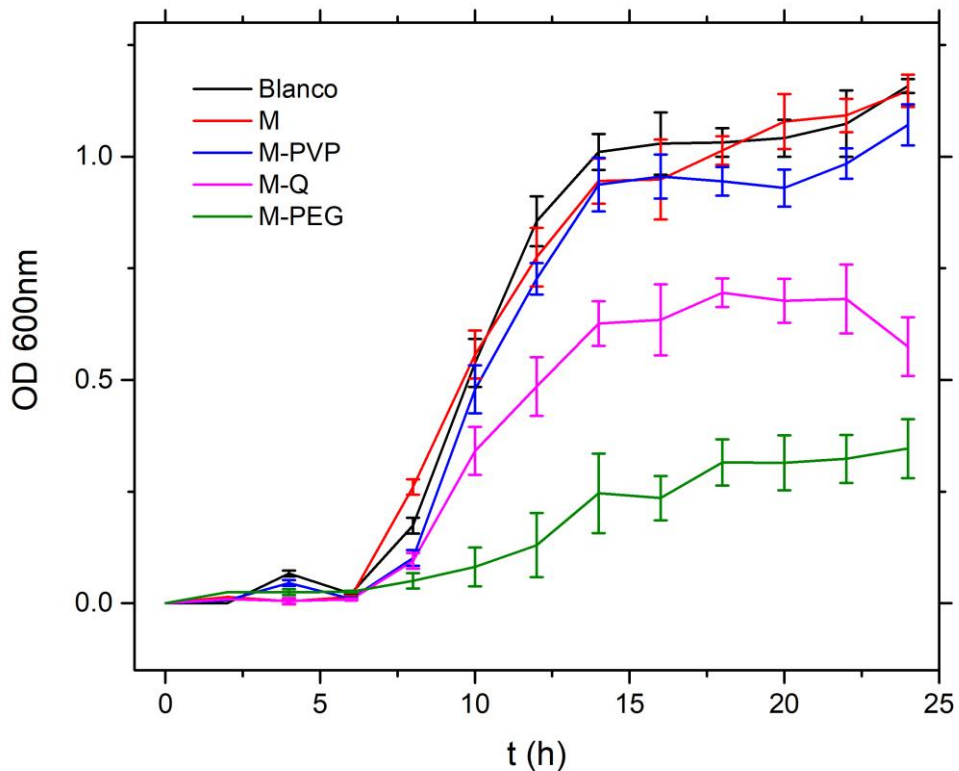


Figura 24. Curvas de cinética de crecimiento durante 24 horas de *P. aeruginosa* con tratamientos de nanopartículas de magnetita desnudas y modificadas

Las curvas para las bacterias control y tratadas con magnetita y M-PVP mostraron un comportamiento muy similar entre sí. Las primeras 6 horas corresponden a la fase de latencia, luego la fase exponencial se observa con un crecimiento rápido

hasta la hora 18 y después se sigue dando un crecimiento celular relativamente más lento.

Las bacterias tratadas con nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano presentaron su fase estacionaria de las 14 a las 22 horas. Y para la hora 24 se observa una caída considerable en la densidad óptica, lo que sugiere el inicio de la fase de muerte celular. Al comparar esta muestra con la muestra control se observa una diferencia significativa en las mediciones de densidad óptica, siendo 0.7 el mayor valor alcanzado por las bacterias tratadas con M-Q (hora 18) y 1.15 para el control (hora 24).

El material que presentó un mejor efecto antibacteriano en esta prueba fue el M-PEG. La curva correspondiente a las bacterias tratadas con este material muestra un crecimiento bacteriano muy lento y controlado, observándose un claro efecto bacteriostático. El crecimiento fue muy bajo en comparación con la muestra control ($OD_{600\text{ nm}}$ de 1.15), siendo apenas 0.35% el valor máximo de densidad óptica medida en esta prueba.

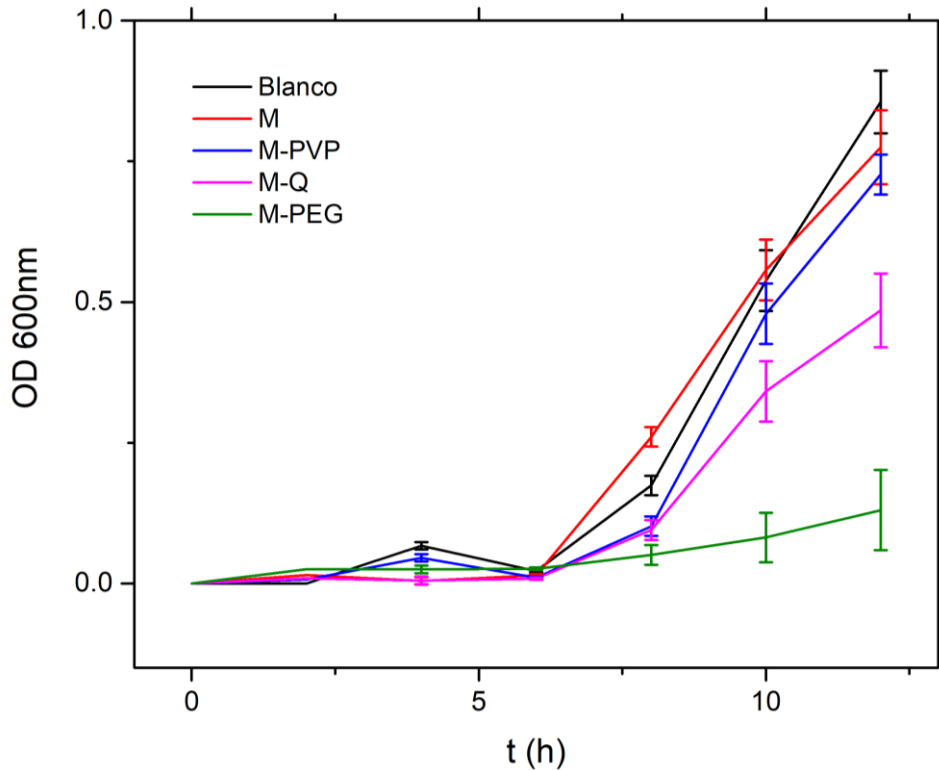


Figura 25. Curvas de cinética de crecimiento durante 12 horas de *P. aeruginosa*

Analizando las primeras 12 horas (Fig. 25), el material M-PEG es aún el más efectivo en cuanto a su actividad bacteriostática, presentando una fase de latencia de 6 horas, al igual que el resto de materiales analizados y el control, pero después un crecimiento en fase exponencial a muy baja velocidad.

Los resultados obtenidos en las curvas de cinética para *S. aureus* y *P. aeruginosa* fueron distintos. Las diferencias en los efectos de las nanopartículas de magnetita sobre bacterias grampositivas y gramnegativas puede estar relacionada a las diferencias en su estructura celular y metabolismo. Las nanopartículas de magnetita afectan a las membranas bacterianas probablemente cambiando su estructura y permeabilidad. Algunos componentes de la pared celular bacteriana, como los lipopolisacáridos, pueden regular la adhesión de las nanopartículas y los flujos de iones a través de la membrana bacteriana. La FOF1-ATPasa es una enzima que juega un papel clave en la respiración y metabolismo de las células bacterianas. Las

nanopartículas pueden afectar directamente esta enzima los complejos FHL (Fig. 26) asociados a la membrana celular, que son únicos de las bacterias tipo gramnegativo. Y esto confiere a las nanopartículas de magnetita una mejor actividad antimicrobiana contra las bacterias gramnegativas (Gabrielyan 2019).

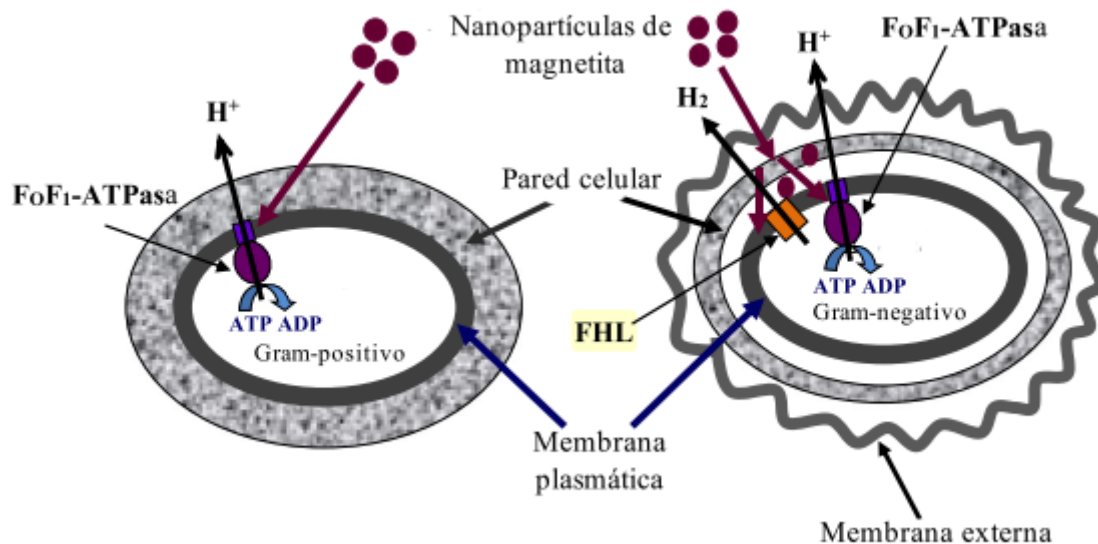


Figura 26. Diferencias estructurales en las bacterias grampositivo y gramnegativo

Cabe destacar que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de magnetita modificadas con polímero es debida a las propiedades intrínsecas del material compuesto y no por la actividad antimicrobiana del polímero por sí solo; ya que estos compuestos no presentan actividad antimicrobiana a las concentraciones empleadas en el presente estudio (Arakha et al., 2015). Entonces, los recubrimientos poliméricos brindan estabilidad en solución a las nanopartículas de magnetita, además de evitar la oxidación y agregación de las partículas. Es posible que la carga superficial inducida por la presencia de los polímeros en la superficie de las nanopartículas de magnetita favorezca la atracción electrostática entre las nanopartículas y la membrana del microorganismo, incrementando así la

producción de ROS y causando un efecto antimicrobiano (Mashjoor y cols., 2018; Kloster y cols., 2015; Morales y cols., 2013).

5.5. Conteo en placa

La actividad antibacteriana de los materiales sintetizados contra *S. aureus* y *P. aeruginosa* se evaluó mediante el método de conteo de colonias en placa, en medio agar enriquecido con LB, durante un lapso de 48 horas de incubación a 37°C.

En la Figura 27 se muestran fotografías de las pruebas realizadas contra la bacteria *S. aureus*. Se evaluaron dos concentraciones de nanopartículas diferentes, 5 y 10 mg/L. Se seleccionaron estas cantidades puesto que los estudios de cinética de crecimiento en *S. aureus* demostraron una baja efectividad para una concentración de 2mg/L. Para el caso de las nanopartículas de magnetita desnudas, las pruebas se realizaron únicamente usando la concentración de 10 mg/L, pues de la misma manera, las pruebas de cinética demostraron su pobre actividad antibacteriana en comparación con las nanopartículas modificadas con polímeros.

En las imágenes se observa que todos los materiales evaluados presentaron un efecto inhibitorio, en comparación con el control. En la fotografía de la prueba control, se aprecia un excesivo crecimiento de colonias, cubriendo éstas prácticamente toda la superficie del gel agar en la caja Petri. Por tanto el número de colonias se consideró incontable (Tabla 5).

Las pruebas con nanopartículas de magnetita desnudas dieron resultados visiblemente distintos a las muestras control, puesto que se pueden distinguir fácilmente las colonias unas de otras. No obstante, hay presencia de una gran cantidad de colonias distribuidas por toda la placa. Entonces, es evidente que las nanopartículas de magnetita sintetizadas, por sí mismas tienen un cierto efecto antibacteriano, sin embargo, se requerirían de concentraciones muy grandes para lograr eliminar el total de bacterias tipo *S. aureus*.

Las nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano, PEG y PVP demostraron tener un buen efecto antibacteriano a una concentración de 10 mg/L, con la cual, después de 48 horas de incubación se formaron solo unas cuantas colonias. Los resultados del conteo de colonias se muestran en la Tabla 5. Las

fotografías se analizaron con la ayuda del software de procesamiento de imagen digital ImageJ, con lo que fue posible calcular el área de la placa cubierta por colonias de bacterias y así poder calcular un porcentaje de eficacia antibacteriana de cada uno de los materiales a diferentes concentraciones. Se asumió un porcentaje del 100% para la superficie cubierta por bacterias en la muestra control.

De acuerdo a este cálculo, las nanopartículas de magnetita recubiertas por cualquiera de los 3 polímeros a una concentración de 10 mg/L presentaron una eficacia de más del 99%. Con la concentración de 5 mg/L se obtuvo una inhibición del 97.47, 90.42 y 96.95, M-Q, M-PVP y M-PEG respectivamente, siendo el recubrimiento con quitosano el que presentó un efecto ligeramente superior, lo cual coincide con los resultados observados en la cinética de crecimiento microbiano, donde el material que presentó una mayor inhibición fue M-Q. El-Khawaga y cols. (2021) reportaron que las nanopartículas de M-Q de 8 a 17 nm presentaron una concentración mínima inhibitoria de 10 mg/L para *S. aureus*.

Para el caso de M-PEG, los resultados obtenidos fueron alentadores, ya que estudios previos reportados, como el de Janani y cols. (2021) donde se sintetizaron nanopartículas M-PEG de 26 nm mediante co-precipitación, reportaron una efectividad frente *S. aureus* del 100% a una concentración de 100 mg/L. Por otra parte, Darwish y cols. (2015) reportaron una concentración de 259 mg/L de M-PEG para a penas para conseguir el 10% de inhibición en *S. aureus*

Figura 27. Fotografías de las pruebas de conteo en placa contra la bacteria *S. aureus*

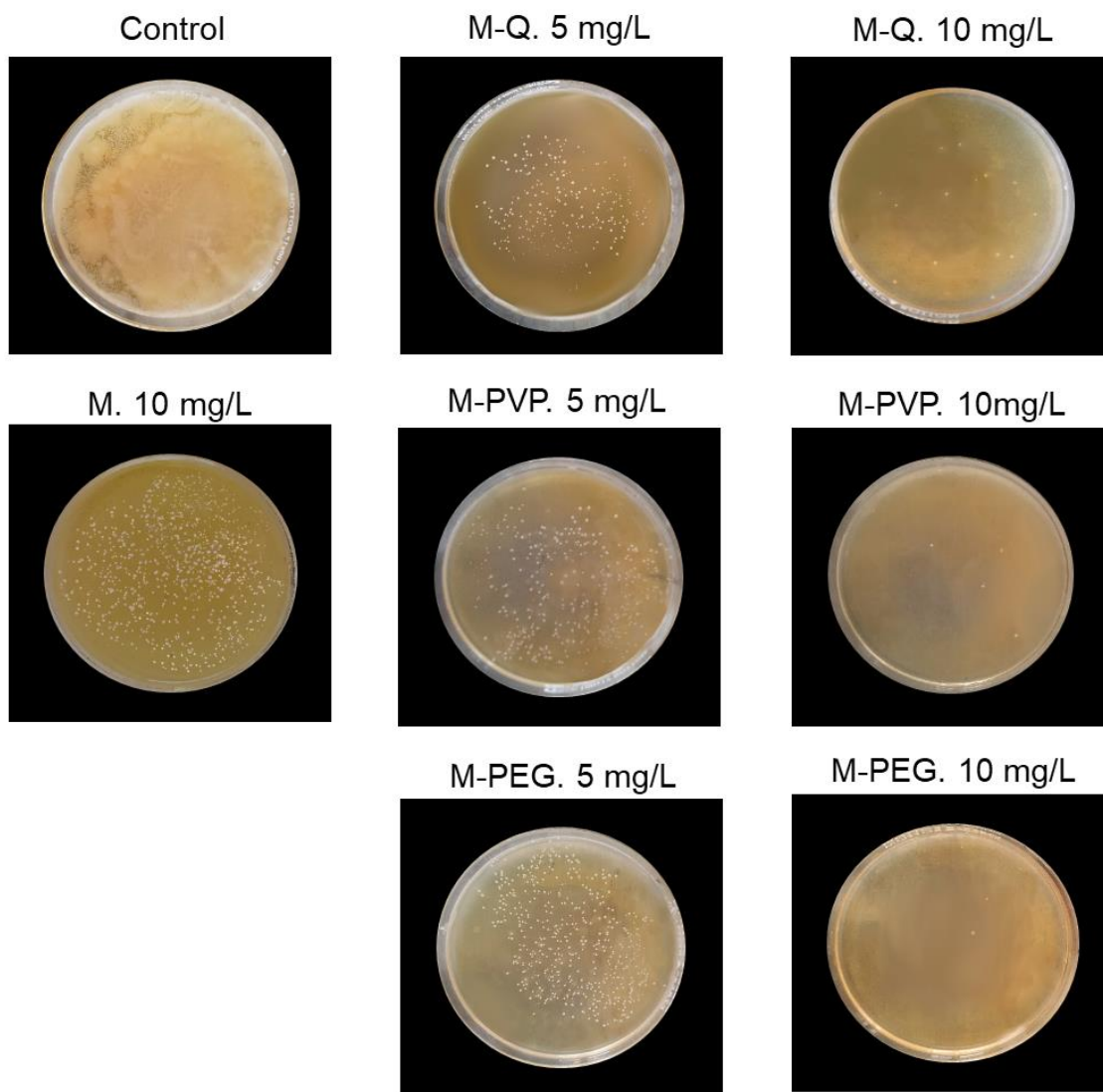


Tabla 5. Cálculos a partir de las pruebas de conteo en placa contra *S. aureus*

Prueba	Número de colonias de <i>S. aureus</i>	% Área ocupada por colonias	% Eficacia antibacteriana (considerando el área)
Control	NA	100	NA
M (10 mg/L)	595	9.57	90.43
M-Q (5 mg/L)	191	2.53	97.47
M-Q (10 mg/L)	14	0.13	99.87
M-PVP (5 mg/L)	273	9.58	90.42
M-PVP (10 mg/L)	19	0.21	99.79
M-PEG (5 mg/L)	416	3.05	96.95
M-PEG (10 mg/L)	16	0.17	99.83

De la misma manera, se estudió el efecto antibacteriano de los materiales sintetizados contra la bacteria *P. aeruginosa* mediante la técnica de conteo en placa. Las concentraciones de nanopartículas que se evaluaron en estas pruebas fueron más bajas que en el estudio descrito anteriormente frente a *S. aureus*, puesto que en las pruebas de cinética de crecimiento para esta bacteria se observó un buen efecto inhibitorio de las nanopartículas de magnetita recubiertas por PEG y quitosano a una concentración de mg/L. Así que las concentraciones seleccionadas para ésta técnica fueron de 2 y 4 mg/L.

En la Figura 28 se muestran los resultados de las pruebas realizadas. Es evidente el gran número de colonias presentes en la prueba control, sin embargo, las colonias se encuentran bien definidas y es posible distinguir una de otra y realizar el conteo, donde se obtuvieron un promedio de 445 colonias (Tabla 6)

Las pruebas para las nanopartículas de magnetita sin recubrir se realizaron solamente a la concentración de 4 mg/L. Se observa un ligero efecto de inhibición, pero este es muy pobre en comparación con el de las nanopartículas recubiertas con polímeros, dentro de esa misma concentración. Así que nuevamente es evidente que las nanopartículas de magnetita que se sintetizaron tienen un efecto antibacteriano a altas concentraciones, pero este se ve extraordinariamente mejorado cuando las partículas son modificadas con polímeros.

Esto coincide con lo reportado en la literatura, donde se han reportado altos valores para la concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de magnetita frente a *P. aeruginosa*. Al-Shabib y cols. (2018) reportaron un efecto antibacteriano de nanopartículas de magnetita de entre 6 y 9 nm sintetizadas por el método de coprecipitación sobre *P. aeruginosa*, siendo 128 µg/mL la concentración mínima inhibitoria. Así mismo, otro estudio (Mousavi et al., 2020) reportó una concentración mínima inhibitoria de 250 µg/mL de nanopartículas de magnetita de 30 a 50 nm tanto para *S. aureus* como para *P. aeruginosa*.

La actividad antibacteriana de las nanopartículas modificadas se puede observar de manera cualitativa en las fotografías (Fig. 23), donde también se aprecia cómo la concentración del tratamiento se relaciona con el efecto inhibitorio de los materiales, teniendo un mejor desempeño a 4 mg/L.

Cabe destacar que es evidente un cambio en la morfología de las colonias entre las pruebas tratadas con 2 y 4 mg/L. Con la primera concentración se observan colonias de gran tamaño, en comparación con las que crecieron a 4 mg/L. Así mismo, las pruebas control y con nanopartículas de magnetita desnudas presentaron colonias grandes. Mientras que M-Q, M-PVP y M-PEG a 4 mg/L inhibieron la formación de colonias grandes, fenómeno que también se observa en M-PEG a 2mg/L.

Las imágenes también se analizaron mediante ImageJ, para calcular la superficie de las placas ocupada por colonias bacterianas, lo cual fue significativo para esta prueba debido al efecto de la concentración y el material en el tamaño de las colonias. Luego se calculó el porcentaje de área cubierta por bacterias y la

efectividad de los tratamientos con respecto a este porcentaje (Tabla 6). Así mismo, se llevó a cabo el conteo de colonias y se calculó el efecto antibacteriano de los materiales comparando el número de colonias con el control. Debido a las diferencias en cuanto a tamaños de colonias, el cálculo del efecto antibacteriano calculado considerando la superficie arrojó resultados mayores a los del porcentaje de efectividad basado en el conteo.

De cualquier manera, la actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa* presentada por PEG fue levemente superior a la presentada por M-Q y M-PVP

De acuerdo a este cálculo, las nanopartículas de magnetita recubiertas por cualquiera de los 3 polímeros a una concentración de 10 mg/L presentaron una eficacia de más del 99%. Con la concentración de 5 mg/L se obtuvo una inhibición del 97.47, 90.42 y 96.95, M-Q, M-PVP y M-PEG respectivamente, siendo el recubrimiento con quitosano el que presentó un efecto ligeramente superior, lo cual coincide con los resultados observados en la cinética de crecimiento microbiano, donde el material que presentó una mayor inhibición fue M-Q.

Esto coincide con lo reportado por El-Khawaga y cols. (2021), reportaron una concentración mínima inhibitoria de 10mg/L para *P. aeruginosa* empleando nanopartículas de M-Q de 8 a 17 nm.

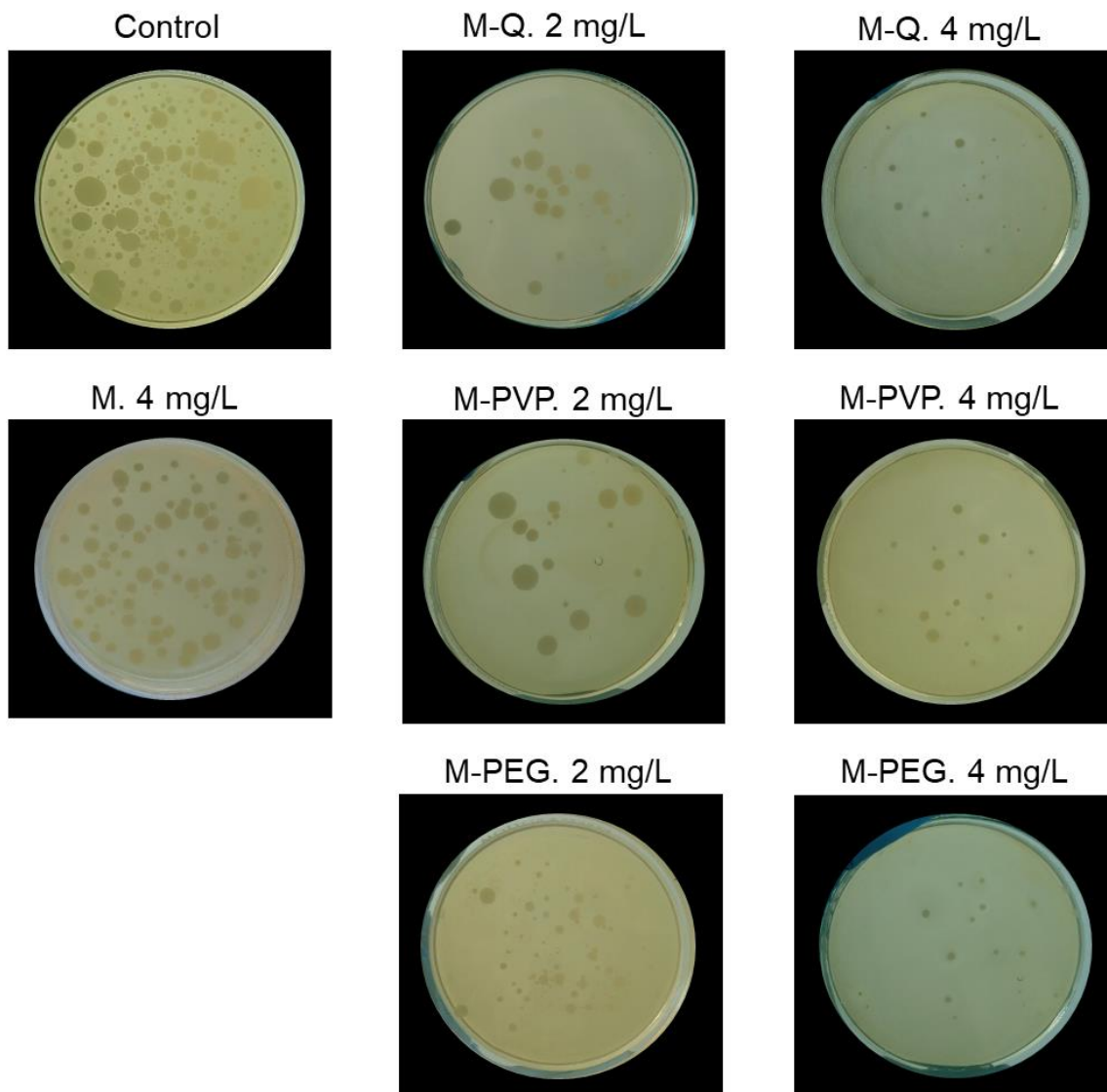


Figura 28. Fotografías de las pruebas de conteo en placa contra la bacteria *P. aeruginosa*

Tabla 6. Cálculos a partir de las pruebas de conteo en placa contra *P. aeruginosa*

Prueba	Número de colonias de <i>P. aeruginosa</i>	% Eficacia antibacteriana (considerando conteo)	% Área ocupada por colonias	% Eficacia antibacteriana (considerando el área)
Control	405	NA	75.68	NA
M (4 mg/L)	97	76.05	22.06	70.85
M-Q (2 mg/L)	23	94.32	5.96	92.12
M-Q (4 mg/L)	19	95.31	0.62	99.18
M-PVP (2 mg/L)	34	91.60	7.82	89.67
M-PVP (4 mg/L)	20	95.06	1.40	98.15
M-PEG (2 mg/L)	69	82.96	2.61	96.55
M-PEG (4 mg/L)	17	95.80	0.48	99.36

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

- Mediante el método electroquímico de pulsos de potencial asimétricos fue posible sintetizar nanopartículas de magnetita con un tamaño estimado de $9 \text{ nm} \pm 0.7937$. El éxito de la síntesis se puede atribuir a la buena selección de pulsos y potenciales.
- Gracias a la caracterización por difracción de rayos X se corroboró la pureza de la magnetita sintetizada. Además que se hicieron evidentes las modificaciones superficiales con polímeros y fue posible calcular el parámetro de red y estimar el tamaño de partícula mediante la ecuación de Scherrer.
- Las nanopartículas de magnetita obtenidas presentaron una pobre actividad antimicrobiana a bajas concentraciones frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*.
- El efecto bacteriostático de las nanopartículas de magnetita se vio mejorado gracias a las modificaciones superficiales con polímeros.
- Tanto en las pruebas de cinética de crecimiento microbiano como en las de conteo en placa se observó que las nanopartículas recubiertas con quitosano presentaron la mejor actividad antibacteriana respecto al resto de los materiales frente a la bacteria grampositivo *S. aureus*; observándose un efecto del 45% de inhibición después de 24 horas bajo una concentración de tan solo 2 mg/L. Mientras que las nanopartículas recubiertas con PEG y PVP mostraron una buena inhibición al crecimiento de la bacteria durante las primeras 12 horas únicamente.
- Los resultados de las pruebas de conteo en placa fueron muy similares para las nanopartículas de M-Q, M-PEG y M-PVP al aplicar tratamientos de 10 mg/L en geles agar, alcanzando los 3 tipos de materiales una efectividad por encima del 99%.
- Contra la bacteria *P. aeruginosa* tipo gramnegativo, las nanopartículas de M-PEG fueron las que generaron un mejor efecto antibacteriano, seguidas

de las de M-Q. Se observó un comportamiento claramente bacteriostático, donde el crecimiento máximo alcanzado después de 24 horas fue 70% menor que el del control para el caso de M-PEG y 50% para M-Q.

- Las pruebas de conteo de colonias en placa contra *P. aeruginosa* sugieren que las nanopartículas de magnetita tienen un ligero efecto antibacteriano durante 48 horas a una concentración de 4 mg/L, y un buen efecto bajo esta misma concentración cuando están recubiertas tanto por PEG, Q o PVP, siendo PEG con el que se presentó el mejor efecto inhibitorio.
- En todos los estudios realizados se demostró que estos materiales tienen un buen desempeño aún a bajas concentraciones.
- De acuerdo a los resultados obtenidos contra ambas bacterias, se propone a las nanopartículas de magnetita modificadas con quitosano como un potencial material antibacteriano con posibles aplicaciones en diferentes sectores.
- El mecanismo de muerte bacteriana originado por los materiales aún se desconoce, por lo que queda abierta la posibilidad de investigarlo en trabajos futuros.
- Este trabajo abre la posibilidad de continuar estudiando las nanopartículas de magnetita recubiertas con polímeros, y probar con nuevos recubrimientos poliméricos y diferentes concentraciones en los tratamientos, así como evaluar su efecto sobre diferentes bacterias y microorganismos patógenos.
- Sería conveniente evaluar la biocompatibilidad de los materiales mediante técnicas *in vitro* e *in vivo*.

CAPÍTULO 7: REFERENCIAS

- Aisida, S. O., Akpa, P. A., Ahmad, I., Zhao, T. kai, Maaza, M., & Ezema, F. I. (2020). Bio-inspired encapsulation and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *European Polymer Journal*, 122(October), 109371. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109371>
- Amutha, S., & Sridhar, S. (2015). Green synthesis of magnetic iron oxide nanoparticle using leaves of *Glycosmis mauritiana* and their antibacterial activity against human pathogens. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences (JIPBS)*, 5(2), 22–26.
- Andrade, Â. L., Souza, D. M., Pereira, M. C., Fabris, J. D., & Domingues, R. Z. (2010). PH effect on the synthesis of magnetite nanoparticles by the chemical reduction-precipitation method. *Quimica Nova*, 33(3), 524–527. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300006>
- Ansari, S. A. M. K., Ficiarà, E., Ruffinatti, F. A., Stura, I., Argenziano, M., Abollino, O., Cavalli, R., Guiot, C., & D'Agata, F. (2019). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and functionalization for biomedical applications in the Central Nervous System. *Materials*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/ma12030465>
- Antarnusa, G., & Suharyadi, E. (2020). A synthesis of polyethylene glycol (PEG)-coated magnetite Fe₃O₄ nanoparticles and their characteristics for enhancement of biosensor. *Materials Research Express*, 7(5). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab8bef>
- Arakha, M., Pal, S., Samantarrai, D., Panigrahi, T., Mallick, B., Pramanik, K., Mallick, B., & Jha, S. (2015). Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. *Scientific Reports*, 5.

<https://doi.org/10.1038/srep14813>

Arshad, M., Alyousef, A., Ahmad, I., Khan, J. M., & Shahzad, S. A. (2018). Low temperature synthesis of superparamagnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles and their ROS mediated inhibition of biofilm formed by food-associated bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02567>

Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>

Azeredo, H. M. C. de. (2011). *Nanocomposites in Food Packaging – A Review* (L. H. C. Mattoso (Ed.); p. Ch. 4). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/14437>

Baig, N., Kammakakam, I., Falath, W., & Kammakakam, I. (2021). Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2(6), 1821–1871. <https://doi.org/10.1039/d0ma00807a>

Behera, S., Patra, J. K., Pramanik, K., Panda, N., & Thatoi, H. (2012). Characterization and Evaluation of Antibacterial Activities of Chemically Synthesized Iron Oxide Nanoparticles. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 2, 196–200. <https://doi.org/10.4236/wjnse.2012.24026>

Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*, 44(July), 100640. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2019.07.002>

Bowles, M., & Lu, J. (2014). Removing the blinders: A literature review on the potential of nanoscale technologies for the management of supply chains. *Technological Forecasting and Social Change*, 82(1), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.techfore.2013.10.017>

Cabrera, L., Gutierrez, S., Menendez, N., Morales, M. P., & Herrasti, P. (2008).

Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochimica Acta*, 53(8), 3436–3441. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.12.006>

Cornell, R. M., & Schwertmann, U. (2003). Introduction to the Iron Oxides. In *The Iron Oxides*. <https://doi.org/10.1002/3527602097.ch1>

Crawford, L., Yu, Z., Keegan, E., & Yu, T. (n.d.). A comparison of commonly used surface disinfectants. *2000, 11*(Infection Control Today), 401–405.

Cristea, C., Tertis, M., & Galatus, R. (2017). Magnetic nanoparticles for antibiotics detection. *Nanomaterials*, 7(6). <https://doi.org/10.3390/nano7060119>

Crystal Structure. (2003). In *The Iron Oxides* (pp. 9–38). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/3527602097.ch2>

Darwish, M. S. A., Nguyen, N. H. A., Ševců, A., & Stibor, I. (2015). Functionalized magnetic nanoparticles and their effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Nanomaterials*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/416012>

Del Olmo, D., Pavelka, M., & Kosek, J. (2021). Open-Circuit Voltage Comes from Non-Equilibrium Thermodynamics. *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics*, 46(1), 91–108. <https://doi.org/10.1515/jnet-2020-0070>

El-Khawaga, A. M., Farrag, A. A., Elsayed, M. A., El-Sayyad, G. S., & El-Batal, A. I. (2021). Antimicrobial and Photocatalytic Degradation Activities of Chitosan-coated Magnetite Nanocomposite. *Journal of Cluster Science*, 32(5), 1107–1119. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01869-6>

Ezealigo, U. S., Ezealigo, B. N., Aisida, S. O., & Ezema, F. I. (2021). Iron oxide nanoparticles in biological systems: Antibacterial and toxicology perspective. *JCIS Open*, 4, 100027. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jciso.2021.100027>

Fajaroh, F., Setyawan, H., Widiyastuti, W., & Winardi, S. (2012). Synthesis of

magnetite nanoparticles by surfactant-free electrochemical method in an aqueous system. *Advanced Powder Technology*, 23(3), 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2011.04.007>

Franger, S., Berthet, P., & Berthon, J. (2004). Electrochemical synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles in alkaline aqueous solutions containing complexing agents. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 8(4), 218–223. <https://doi.org/10.1007/s10008-003-0469-6>

Gholizadeh, A. (2017). A comparative study of physical properties in Fe₃O₄ nanoparticles prepared by coprecipitation and citrate methods. *Journal of the American Ceramic Society*, 100(8), 3577–3588. <https://doi.org/10.1111/jace.14896>

Gnanadhas, D. P., Marathe, S. A., & Chakravorty, D. (2013). Biocides-resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(2), 191–206. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.748035>

Gudkov, S. V., Burmistrov, D. E., Serov, D. A., Rebezov, M. B., Semenova, A. A., & Lisitsyn, A. B. (2021). Do iron oxide nanoparticles have significant antibacterial properties? *Antibiotics*, 10(7), 1–23. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070884>

Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. de, Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J., & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>

- Hemeg, H. A. (2017). Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 8211–8225. <https://doi.org/10.2147/IJN.S132163>
- Humphreys, H. (2012). *Staphylococcus aureus*: The enduring pathogen in surgery. *Surgeon*, 10(6), 357–360. <https://doi.org/10.1016/j.surge.2012.05.003>
- Janani, B., Al-Mohaimed, A. M., Raju, L. L., Al Farraj, D. A., Thomas, A. M., & Khan, S. S. (2021). Synthesis and characterizations of hybrid PEG-Fe₃O₄ nanoparticles for the efficient adsorptive removal of dye and antibacterial, and antibiofilm applications. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19(1), 389–400. <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00612-1>
- Javanbakht, T., Laurent, S., Stanicki, D., & Wilkinson, K. J. (2016). Relating the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) to Their Bactericidal Effect towards a Biofilm of *Streptococcus mutans*. *PLoS ONE*, 11(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154445>
- Kadhim, W. K. A., Nayef, U. M., & Jabir, M. S. (2019). Polyethylene glycol-functionalized magnetic (Fe₃O₄) nanoparticles: A good method for a successful antibacterial therapeutic agent via damage DNA molecule. *Surface Review and Letters*, 26(10). <https://doi.org/10.1142/S0218625X19500793>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Klein, E., Smith, D. L., & Laxminarayan, R. (2007). Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerging Infectious Diseases*, 13(12), 1840–1846. <https://doi.org/10.3201/eid1312.070629>
- Koczur, K. M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L., & Skrabalak, S. E. (2015). Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Transactions*,
-

44(41), 17883–17905. <https://doi.org/10.1039/c5dt02964c>

Kotb, E. E. Z., & Gafer, J. A. (2015). Molecular Detection of Toxins and Disinfectant Resistance Genes Among *Staphylococcus aureus* Isolated from Dairy Cattle in Egypt. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, 5(1), 35–45. <https://doi.org/10.21608/j.av.s.2020.75411>

Kouhpanji, M. R. Z., & Stadler, B. J. H. (2020). A guideline for effectively synthesizing and characterizing magnetic nanoparticles for advancing nanobiotechnology: A review. *Sensors (Switzerland)*, 20(9), 1–37. <https://doi.org/10.3390/s20092554>

Kurakula, M., & Rao, G. S. N. K. (2020). Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60(September), 102046. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102046>

Li, J., & Zhuang, S. (2020). Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. *European Polymer Journal*, 138(July), 109984. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109984>

Li, W., Wei, W., Wu, X., Zhao, Y., & Dai, H. (2020). The antibacterial and antibiofilm activities of mesoporous hollow Fe₃O₄ nanoparticles in an alternating magnetic field. *Biomaterials Science*, 8(16), 4492–4507. <https://doi.org/10.1039/d0bm00673d>

Lineback, C. B., Nkemngong, C. A., Wu, S. T., Li, X., Teska, P. J., & Oliver, H. F. (2018). Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0447-5>

Long, S. S., Pickering, L. K., & Prober, C. G. (2012). *Principles and practice of*

pediatric infectious diseases (5th ed.). Elsevier.

- Lozano, I., Casillas, N., de León, C. P., Walsh, F. C., & Herrasti, P. (2017). New Insights into the Electrochemical Formation of Magnetite Nanoparticles. *Journal of The Electrochemical Society*, 164(4), D184–D191. <https://doi.org/10.1149/2.1091704jes>
- Lu, A. H., Salabas, E. L., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(8), 1222–1244. <https://doi.org/10.1002/anie.200602866>
- Maillard, J. Y. (2012). Mechanisms of Bacterial Resistance to Microbicides. *Russell, Hugo & Ayliffe's: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 108–120. <https://doi.org/10.1002/9781118425831.ch6a>
- Martinko, J. M., Madigan, M. T., & Parker, J. (2004). *Brock, biología de los microorganismos*. (p. 1011).
- Mashjoor, S., Yousefzadi, M., Zolgharnain, H., Kamrani, E., & Alishahi, M. (2018). Organic and inorganic nano-Fe₃O₄: Alga *Ulva flexuosa*-based synthesis, antimicrobial effects and acute toxicity to briny water rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Environmental Pollution*, 237, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.036>
- Mehlhorn, H. (2016). *Nanoparticles – Definitions*. 1–14. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25292-6_1
- Mihai, A. D., Chircov, C., Grumezescu, A. M., & Holban, A. M. (2020). Magnetite nanoparticles and essential oils systems for advanced antibacterial therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms21197355>
- Moacă, E.-A., Coricovac, E. D., Soica, C. M., Pinzaru, I. A., Păcurariu, C. S., &

- Dehelean, C. A. (2018). Preclinical Aspects on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles and Their Interventions as Anticancer Agents: Enucleation, Apoptosis and Other Mechanism. *Iron Ores and Iron Oxide Materials*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74176>
- MODAN, E. M., & PLĂIAȘU, A. G. (2020). Advantages and Disadvantages of Chemical Methods in the Elaboration of Nanomaterials. *The Annals of "Dunarea de Jos" University of Galati. Fascicle IX, Metallurgy and Materials Science*, 43(1), 53–60. <https://doi.org/10.35219/mms.2020.1.08>
- Mohsen, S., Dickinson, J. A., & Somayaji, R. (2020). Update on the adverse effects of antimicrobial therapies in community practice. *Canadian Family Physician*, 66(9), 651–659.
- Montoya, P., Marín, T., Mejía, S., Arnache, O., & Calderón, J. A. (2017). Elucidation of the Mechanism of Electrochemical Formation of Magnetite Nanoparticles by In Situ Raman Spectroscopy. *Journal of The Electrochemical Society*, 164(14), D1056–D1065. <https://doi.org/10.1149/2.0181802jes>
- Moritz, M., & Geszke-Moritz, M. (2013). The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 228, 596–613. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.046>
- Motiei, M., Kashanian, S., Lucia, L. A., & Khazaei, M. (2017). Intrinsic parameters for the synthesis and tuned properties of amphiphilic chitosan drug delivery nanocarriers. *Journal of Controlled Release*, 260(June), 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.06.010>
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Zarei, M., Bahrani, S., Savardashtaki, A., Esmaeili, H., Lai, C. W., Mazraedoost, S., Abassi, M., & Ramavandi, B. (2020). Data on cytotoxic and antibacterial activity of synthesized Fe₃O₄ nanoparticles using *Malva sylvestris*. *Data in Brief*, 28, 104929. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104929>
-

- Muñoz-Écija, T., Vargas-Quesada, B., & Chinchilla-Rodríguez, Z. (2017). Identification and visualization of the intellectual structure and the main research lines in nanoscience and nanotechnology at the worldwide level. *Journal of Nanoparticle Research*, 19(2). <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3732-3>
- Natesan, S., Krishnaswami, V., Thekkila Veedu, S., Pathayappurakkal Mohanan, D., Ruckmani, K., & Palanichamy, R. (2020). Chitosan-based ocular drug delivery systems. In *Functional Chitosan: Drug Delivery and Biomedical Applications*. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7_4
- Niculescu, A. G., Chircov, C., & Grumezescu, A. M. (2021). Magnetite nanoparticles: Synthesis methods – A comparative review. *Methods*, March. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.04.018>
- Pascal, C., Pascal, J. L., Favier, F., Elidrissi Moubtassim, M. L., & Payen, C. (1999). Electrochemical Synthesis for the Control of γ -Fe₂O₃ Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. *Chemistry of Materials*, 11(1), 141–147. <https://doi.org/10.1021/cm980742f>
- Pereira, I. C., Duarte, A. S., Neto, A. S., & Ferreira, J. M. F. (2019). Chitosan and polyethylene glycol based membranes with antibacterial properties for tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 96, 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.029>
- Periasamy, P., Babu, B. R., & Iyer, S. V. (1996). Cyclic voltammetric studies of porous iron electrodes in alkaline solutions used for alkaline batteries. *Journal of Power Sources*, 58(1), 35–40. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-7753\(95\)02274-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-7753(95)02274-0)
- Permien, S., Hain, H., Scheuermann, M., Mangold, S., Mereacre, V., Powell, A. K., Indris, S., Schürmann, U., Kienle, L., Duppel, V., Harm, S., & Bensch, W. (2013). Electrochemical insertion of Li into nanocrystalline MnFe₂O₄: A study of the reaction mechanism. *RSC Advances*, 3(45), 23001–23014. <https://doi.org/10.1039/c3ra44383c>
-

- Pham, X. N., Nguyen, T. P., Pham, T. N., Tran, T. T. N., & Tran, T. V. T. (2016). Synthesis and characterization of chitosan-coated magnetite nanoparticles and their application in curcumin drug delivery. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(4), 1–9. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/4/045010>
- Prasad, R., Kumar, V., & Kumar, M. (2017). *Nanotechnology: Food and Environmental Paradigm*. Springer Singapore. <https://books.google.com.co/books?id=D4Q0DwAAQBAJ>
- Reséndiz-Ramírez, R., Rodríguez-López, A., Díaz-Real, J. A., Delgado-Arenas, H. F., Osornio-Villa, A., Hernández-Leos, R., Vivier, V., & Antaño-López, R. (2022). Reaction Mechanisms of the Electrosynthesis of Magnetite Nanoparticles Studied by Electrochemical Impedance Spectroscopy. *ACS Omega*, 7(1), 761–772. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05293>
- Rodrigues, G. R., López-Abarrategui, C., de la Serna Gómez, I., Dias, S. C., Otero-González, A. J., & Franco, O. L. (2019). Antimicrobial magnetic nanoparticles based-therapies for controlling infectious diseases. *International Journal of Pharmaceutics*, 555, 356–367. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.043>
- Rodríguez-López, A., Paredes-Arroyo, A., Mojica-Gomez, J., Estrada-Arteaga, C., Cruz-Rivera, J. J., Elías Alfaro, C. G., & Antaño-López, R. (2012). Electrochemical synthesis of magnetite and maghemite nanoparticles using dissymmetric potential pulses. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(8). <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0993-3>
- Santos, F. J., Varanda, L. C., Ferracin, L. C., & Jafellici, M. (2008). Synthesis and electrochemical behavior of single-crystal magnetite nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(14), 5301–5306. <https://doi.org/10.1021/jp0767922>
- Schwaminger, S. P., Syhr, C., & Berensmeier, S. (2020). Controlled synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles: Magnetite or maghemite? *Crystals*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/cryst10030214>
-

- Schwarz, W. (2018). *Pvp: A Critical Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinylpyrrolidone (Povidone)*.
- Seil, J. T., & Webster, T. J. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2767–2781. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24805>
- Serwecińska, L. (2020). Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: A risk to the environment and to public health. *Water (Switzerland)*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/w12123313>
- Setyawan, H., & Widiyastuti, W. (2019). Progress in the preparation of magnetite nanoparticles through the electrochemical method. *KONA Powder and Particle Journal*, 36(June), 145–155. <https://doi.org/10.14356/kona.2019011>
- Sharp, S. E., & Searcy, C. (2006). Comparison of mannitol salt agar and blood agar plates for identification and susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* in specimens from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4545–4546. <https://doi.org/10.1128/JCM.01129-06>
- Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O., & Bach, H. (2017). Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>
- Smith, M. (2017). Antibiotic Resistance Mechanisms. *Journeys in Medicine and Research on Three Continents Over 50 Years, May 2017*, 95–99. https://doi.org/10.1142/9789813209558_0015
- Staphylococcus aureus Infections. (1998). *New England Journal of Medicine*, 339(27), 2025–2027. <https://doi.org/10.1056/NEJM199812313392716>
- Su, F. C., Friesen, M. C., Humann, M., Stefaniak, A. B., Stanton, M. L., Liang, X., LeBouf, R. F., Henneberger, P. K., & Virji, M. A. (2019). Clustering asthma symptoms and cleaning and disinfecting activities and evaluating their

associations among healthcare workers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222(5), 873–883.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.04.001>

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

Taimoory, S. M., Rahdar, A., Aliahmad, M., Sadeghfar, F., Hajinezhad, M. R., Jahantigh, M., Shahbazi, P., & Trant, J. F. (2018). The synthesis and characterization of a magnetite nanoparticle with potent antibacterial activity and low mammalian toxicity. *Journal of Molecular Liquids*, 265(2017), 96–104.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.05.105>

Takai, Z. I., Mustafa, M. K., Asman, S., & Sekak, K. A. (2019). Preparation and characterization of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles by sol-gel method. *International Journal of Nanoelectronics and Materials*, 12(1), 37–46.

Tang, S., & Zheng, J. (2018). Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. *Advanced Healthcare Materials*, 7(13), 1–10.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201701503>

Tang, Y.-W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., & Schwartzman, J. (2015). *Molecular medical microbiology* (2nd editio). Academic Press.
















Totté, J. E. E., van Doorn, M. B., & Pasmans, S. G. M. A. (2017). Successful Treatment of Chronic *Staphylococcus aureus*-Related Dermatoses with the Topical Endolysin Staphefekt SA.100: A Report of 3 Cases. *Case Reports in Dermatology*, 9(2), 19–25. <https://doi.org/10.1159/000473872>










- Turner, R. (2018). *Essentials of Microbiology*. ED-Tech Press.
<https://books.google.com.mx/books?id=dPzSzQEACAAJ>
- Vaz, J. M., Pezzoli, D., Chevallier, P., Campelo, C. S., Candiani, G., & Mantovani, D. (2018). Antibacterial Coatings Based on Chitosan for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Current Pharmaceutical Design*, 24(8), 866–885.
<https://doi.org/10.2174/1381612824666180219143900>
- Wallyn, J., Anton, N., & Vandamme, T. F. (2019). Synthesis, principles, and properties of magnetite nanoparticles for in vivo imaging applications—A review. *Pharmaceutics*, 11(11), 1–29.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110601>
- Wang, D., Xie, K., Zou, D., Meng, M., & Xie, M. (2018). Inhibitory effects of silybin on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medicine Reports*, 18(1), 827–833. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9021>
- Wang, Y., Yang, Y., Shi, Y., Song, H., & Yu, C. (2020). Antibiotic-Free Antibacterial Strategies Enabled by Nanomaterials: Progress and Perspectives. *Advanced Materials*, 32(18), 1–21. <https://doi.org/10.1002/adma.201904106>
- WHO. (2020). World Health Organization (2017) Global Priority List of Antibiotic-Resistance Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Home page at: <http://www.who.int>. Accessed 4 January 2018.
International Journal of Molecular Sciences, 21(3), 1–18.
- Witte, W. (2004). International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 4(3), 187–191.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2003.12.005>
- Xu, J. K., Zhang, F. F., Sun, J. J., Sheng, J., Wang, F., & Sun, M. (2014). Bio and nanomaterials based on Fe₃O₄. *Molecules*, 19(12), 21506–21528.
<https://doi.org/10.3390/molecules191221506>

- Ying, T. Y., Yiacomini, S., & Tsouris, C. (2002). An electrochemical method for the formation of magnetite particles. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(4), 569–576. <https://doi.org/10.1081/DIS-120014025>
- Yong, C., Chen, X., Xiang, Q., Li, Q., & Xing, X. (2017). Recyclable magnetite-silver heterodimer nanocomposites with durable antibacterial performance. *Bioactive Materials*, 3(1), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.008>
- Zhelev, G. (2021). Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants – minireview. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 24(3), 307–316. <https://doi.org/10.15547/bjvm.2019-0085>
- Zhu, A., Yuan, L., & Liao, T. (2008). Suspension of Fe₃O₄ nanoparticles stabilized by chitosan and o-carboxymethylchitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, 350(1–2), 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.09.004>







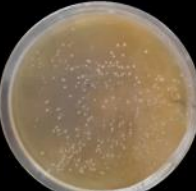
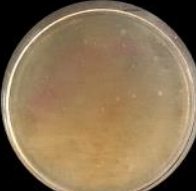


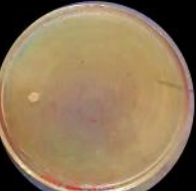




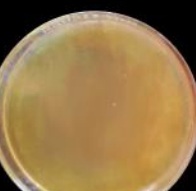

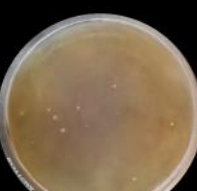
ANEXOS




Total de fotografías de las pruebas microbiológicas en placas para P. aeruginosa, realizadas por triplicado

Tratamiento	mg/L	#1	#2	#3
BLANCO	-			
M	10			
M-PVP	5			
M-PVP	10			
M-PEG	5			

Tratamiento	mg/L	#1	#2	#3
M-PEG	10			
M-Q	5			
M-Q	10			

Total de fotografías de las pruebas microbiológicas en placas para S. aureus, realizadas por triplicado

Tratamiento	mg/L	#1	#2	#3
BLANCO	-			
M	4			
M-PVP	2			
M-PVP	4			
M-PEG	2			
M-PEG	4			

Tratamiento	mg/L	#1	#2	#3
M-Q	2			
M-Q	4	