

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y  
BIOTECNOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“ELABORACIÓN DE MICROESFERAS HÍBRIDAS CONTENIENDO  
NANOPARTÍCULAS DE COBRE, QUITOSANO, GELATINA Y  
GLUTARALDEHÍDO PARA LA DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA SOBRE *ESCHERICHIA COLI* Y *ENTEROCOCCUS  
FAECALIS*”

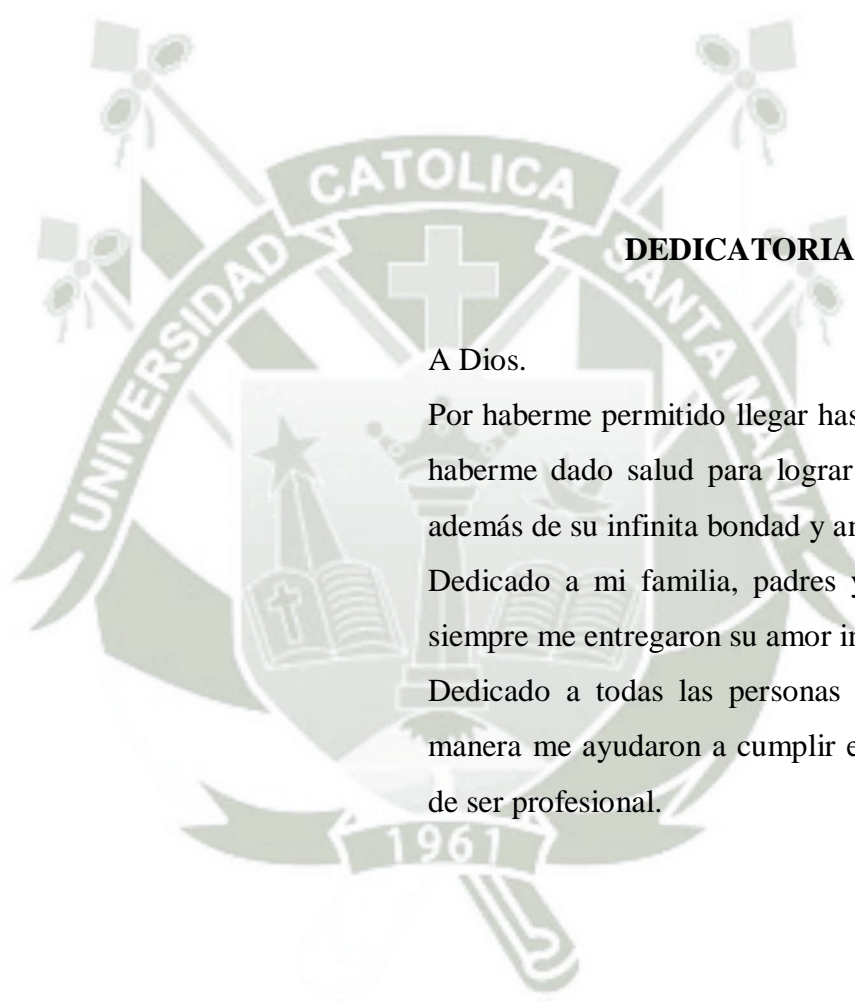
Antofagasta – Chile 2014

**TESIS PRESENTADO POR LA BACHILLER:**  
KAREN ZEGARRA RAMOS

**Para optar el Título Profesional de:**  
**Químico Farmacéutico**

**ASESORA:**  
DRA. ROXANA GUTIÉRREZ ARANÍBAR

**AREQUIPA – PERÚ**  
**2016**



## **DEDICATORIA**

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

Dedicado a mi familia, padres y hermana que siempre me entregaron su amor incondicional

Dedicado a todas las personas que de alguna manera me ayudaron a cumplir este gran sueño de ser profesional.



## AGRADECIMIENTO

A Dios por guiar día a día nuestros pasos.

A mi padre Ceferino por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mi madre Edith por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi hermana Karol por ser un ejemplo de la cual aprendí a luchar siempre antes las adversidades.

A todas las personas que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

¡Gracias a ustedes!

## ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	15
CAPITULO I:.....	16
1. Nanotecnología.....	17
2. Nanopartículas de cobre.....	17
3. Obtención de nanopartículas de cobre.....	18
4. Microesferas híbridas.....	20
4.1 Bacterias Intrahospitalarias.....	22
4.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	22
4.1.2 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	24
4.2 Antibiograma.....	25
4.2.1 Concentración inhibitoria mínima (CIM) (ug/ml).....	26
4.2.2 Concentración mínima bactericida (CMB).....	26
4.3 Polímeros de Encapsulación.....	26
4.3.1 Quitosano:.....	26
4.3.2 Gelatina.....	28
4.3.3 Glutaraldehído.....	30
CAPITULO II.....	32
1. Materiales de Vidrio.....	33

2.	Reactivos y soluciones .....	34
3.	Equipos e Instrumentos.....	34
4.	Metodología.....	35
4.1	Obtención de nanopartículas de cobre .....	35
4.2	Elaboración de las microesferas híbridas con y sin nanopartículas de cobre.....	35
4.2.1	Elaboración de quitosano al 1% .....	35
4.2.2	Elaboración de gelatina al 3% .....	35
4.2.3	Preparación de Matriz con Nanopartículas de Cobre .....	36
4.2.4	Preparación de Microesferas Híbridas.....	36
4.2.5	Características microscópicas y composición de las microesferas híbridas con nanopartículas de cobre mediante SEM DEM y FT-IR .....	36
4.3	Pruebas de sensibilidad bacteriana y su análisis.....	37
4.3.1	Ensayo de sensibilidad en medio sólido.....	37
4.3.2	Ensayo de sensibilidad en medio líquido.....	37
RESULTADOS Y CONCLUSIONES .....		38
1.	Nanopartículas de cobre a partir de nitrato de cobre hemipentahidratado...40	
2.	Microesferas híbridas (Np-Cu/Qo/Ge/Glu) y sus características mediante SEM, EDX y FT-IR. ....	41
2.1	Difracción de Rayos X.....	41
2.2	Microscopía Electrónica de barrido con microanálisis de energía dispersiva de rayos X y electrones retrodispersados (SEM-EDX)...42	
3.	Evaluación estadística de la actividad antibacteriana de las microesferas híbridas Np-Cu/Qo/Ge/Glu frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> . 45	
3.1	Resultados de <i>Escherichia coli</i> según grupos de estudio.....	46
3.2	Resultados de <i>Enterococcus Faecalis</i> según grupos de estudio.....	55

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	64
RECOMENDACIONES .....	66
BIBLIOGRAFÍA .....	67
ANEXOS.....	70



## ÍNDICE DE GRÁFICOS, TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
<b>GRÁFICOS</b>	
N° 1.- Estructura de la Matriz híbrida.....	21
N° 2.- Proceso de Microencapsulación.....	22
N° 3.- Comparación del efecto antibacteriano de las microesferas híbridas a diferentes concentraciones de cobre frente a <i>Escherichia coli</i> según sus halos de inhibición.....	47
N° 4.- Curvas de crecimiento sobre el efecto bactericida del grupo control vs matriz según su tiempo de exposición frente a <i>Escherichia coli</i> ....	53
N° 5.- Curvas de crecimiento sobre el efecto bactericida de las diferentes concentraciones de cobre vs la matriz según su tiempo de exposición frente a <i>Escherichia coli</i> .....	54
N° 6.- Comparación del efecto antibacteriano de las microesferas híbridas a diferentes concentraciones de cobre frente a <i>Enterococcus faecalis</i> según sus halos de inhibición.....	56
N° 7.- Curvas de crecimiento sobre el efecto bactericida del grupo control vs matriz según su tiempo de exposición frente a <i>Enterococcus faecalis</i> .....	62
N° 8.- Curvas de crecimiento sobre el efecto bactericida del grupo control vs matriz según su tiempo de exposición frente a <i>Enterococcus faecalis</i> .....	63

<b>TABLAS</b>	Pág.
N° 1.- Promedios de los halos de inhibición de <i>Escherichia coli</i> según grupos de estudio.....	46
N° 2.- Comparación de los halos de inhibición de <i>Escherichia coli</i> según grupos de estudio.....	48
N° 3.- Prueba de Homogeneidad de varianzas de los halos de inhibición de <i>Escherichia coli</i> según grupos de estudio.....	48
N° 4.- Comparación Múltiple de los diferentes grupos de estudio de <i>Escherichia coli</i> .....	49
N° 5.- Prueba Tukey con respecto a los promedios de los grupos de estudio de <i>Escherichia Coli</i> .....	49
N° 6.- ANOVA para determinar la diferencia en efecto antibacteriano entre las diferentes concentraciones de cobre frente a <i>Escherichia coli</i> .....	52
N° 7.- Promedios de los halos de inhibición de <i>Enterococcus faecalis</i> según grupos de estudio.....	55
N° 8.- Comparación de los halos de inhibición de <i>Enterococcus faecalis</i> según grupos de estudio.....	56
N° 9.- Prueba de Homogeneidad de varianzas de los halos de inhibición de <i>Enterococcus faecalis</i> según grupos de estudio.....	57
N° 10.- Comparación Múltiple de los diferentes grupos de estudio de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	58
N° 11.- Prueba Tukey con respecto a los promedios de los grupos de estudio de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	58
N° 12.- ANOVA para determinar la diferencia en efecto antibacteriano entre las diferentes concentraciones de cobre frente a <i>Enterococcus faecalis</i> .....	61

**FIGURAS**

	Pág.
N° 1.- Esquema de desacetilación de la quitina (Estudio de las propiedades morfológicas y reológicas de una red híbrida de polímeros sintetizada a partir de tres biopolímeros: gelatina/quitosano/dextran).	27
N° 2.- Estructura de la Gelatina (Estudio de las propiedades morfológicas y reológicas de una red híbrida de polímeros sintetizada a partir de tres biopolímeros: gelatina/quitosano/dextran).....	29
N° 3.- Síntesis de nanopartículas de cobre a partir de Nitrato de cobre hemipentahidratado.....	40
N° 4.- Patrones de XRD de: (a) desnudo Np-Cu, (b) Qo y (c) Np-Cu/Qo/Ge/Glu.....	41
N° 5.- Micrografías SEM y EDX de microesferas híbridas Np-Cu/Qo/Ge/Glu a) Entera, b) partida y c) Np-Cu en el híbrido Qo/Ge/Glu.....	42
N° 6.- EDX ( $k\alpha$ ).- Mapeo de elementos químicos de las Microesfera híbridas de Np-Cu/Qo/Ge/Glu.....	43
N° 7.- Espectro y cuantificación EDX de las microesferas híbridas de Np-Cu/Qo/Ge/Glu.....	44
N° 8.- Ensayo de sensibilidad para <i>Escherichia coli</i> con microesferas a distinta concentración de nanopartículas de cobre.....	50
N° 9.- Ensayo de sensibilidad para <i>Enterococcus faecalis</i> con microesferas a distinta concentración de nanopartículas de cobre.....	59

## ABREVIATURAS

Np-Cu: Nanopartículas de cobre.

Qo : Quitosano.

Ge : Gelatina.

Glu : Glutaraldehído.

DA : Desacetilación

SEM : Microscopia electrónica de barrido

EDX : Espectroscopía de energía dispersiva

FT-IR : Espectrometría infrarroja con transformada de fourier

RIP : Red interpenetrada de polímeros.



## RESUMEN

El principal objetivo del presente trabajo de investigación fue establecer si las microesferas híbridas conteniendo nanopartículas de cobre, quitosano, gelatina y glutaraldehído tienen efecto antibacterial sobre cepas de *Escherichia coli*. y *Enterococcus faecalis*.

Se obtuvieron las nanopartículas de cobre utilizando el método de poliol, el cual nos permitió reducir completamente el  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^0$  y obtener cobre puro, para la preparación de nanopartículas de cobre (Np-Cu), se añadió 2.3 gr de nitrato de cobre hemipentahidratado a 150 ml de etilenglicol. La mezcla se sometió a reflujo y agitación ( $180^\circ\text{C}$  de 3 a 4 horas), observándose un cambio en el color de la solución de azul a rojo oscuro en el precipitado. El producto formado se llevó a centrifugación a 4000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se lavaron las Np-Cu con agua destilada, etanol absoluto y acetona y para evitar la oxidación del cobre, el producto se almacenó en tubos falcón al vacío con exceso de nitrógeno.

Para la elaboración de quitosano, se preparó 500 ml de quitosano (Qo), del cual se pesó 5 gr; el cual se diluyó 100 ml al 5%, se agitó aproximadamente durante 6 horas hasta que se observó que el Qo se disolvió completamente, la solución resultante se filtró al vacío por dos fritas con tamaño de microporo 1 y 2, luego se conservó con un frasco con taparosca a temperatura ambiente, seguidamente, se procedió a la

elaboración de gelatina, para lo cual, se pesó 0.6 gr de gelatina pura (Ge) y se le adicionó 20 ml de agua destilada, la mezcla fue sometida a agitación con ayuda de un agitador magnético a 300 rpm con una temperatura de 45°C por 15 minutos hasta ver que la gelatina se disuelva.

La sintetización de nanopartículas de cobre (Np-Cu), se logró entonces, empleando quitosano y glutaraldehído mediante el método de poliol de emulsión por entrecruzamiento con el que se pudo evaluar sus propiedades antimicrobianas. La metodología empleada en la presente investigación fue de tipo experimental, prospectiva, laboratorial, correlacional y longitudinal y la red híbrida de polímeros (RIP) se consiguió mediante síntesis simultánea a partir de dos biopolímeros: quitosano y gelatina; con el propósito de crear un producto capaz de atrapar nanopartículas de cobre y así poder ejercer su efecto y con ayuda del glutaraldehído se concretó el entrecruzamiento obteniéndose las Np-Cu con forma esferoïdal de menos de 10 nm de diámetro.

De esta manera establecimos que, las microesferas híbridas conteniendo nanopartículas de cobre, quitosano, gelatina y glutaraldehído tienen un efecto antibacterial sobre cepas de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. El método de poliol utilizado, nos permitió obtener cobre puro y ejercer su acción antibacterial y la elaboración de microesferas híbridas nos permitió comprobar que la presencia de cobre es indispensable para ejercer el efecto antibacterial sobre *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*.

**Palabras Clave:**

Nanopartículas de cobre, biopolímeros, bactericida, ámbito nosocomial, actividad microbicida.

## ABSTRACT

The main objective of this study was to determine if the hybrid microspheres containing copper nanoparticles, chitosan, gelatin and glutaraldehyde have antibacterial effect on strains of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. copper nanoparticles were obtained using the polyol method, which allowed us to completely reduce the  $\text{Cu}^{+2}$  to  $\text{Cu}^0$ , and obtain pure copper. For the preparation of nanoparticles of copper (Np-Cu), was added 2.3 grams of copper nitrate and 150 ml of ethylene glycol. The mixture was subjected to reflux and stirring ( $180^\circ\text{C}$  for 3 to 4 hours), observing a change in color of the solution from blue to dark red in the precipitate. The formed product was subjected to centrifugation at 4000 rpm for 10 min. Subsequently, the Np-Cu washed with distilled water, absolute ethanol and acetone to prevent oxidation of the copper, the product was stored in falcón vacuum tubes with excess of nitrogen.

500 ml of chitosan (Qo) was prepared; which was weighed of this 5 grams; and diluted in 100 ml at 5%. It was stirred for about 6 hours until it was observed that the QO was completely dissolved. The resulting solution was vacuum filtered by two frits micropore size 1 and 2, then kept in a jar with screw cap at room temperature. He then proceeded to the production of gelatin; 0.6 grams of pure gelatin (Ge) was weighed and was added 20 ml of distilled water. The mixture was stirred using a

magnetic stirrer at 300 rpm with a temperature of 45°C for 15 minutes till see that the gelatin is dissolved.

Synthesizing nanoparticles of copper (Np-Cu) was achieved using chitosan and glutaraldehyde; by the method polyol emulsion by crosslinking, with which could evaluate its antimicrobial properties. The methodology used in this research was experimental, prospective, laboratory, correlational and longitudinal type and hybrid polymer network (RIP) was achieved by simultaneous synthesis from two biopolymers: chitosan and gelatin; in order to create a product capable of trapping nanoparticles of copper, and thus be able to exert its effect. Using glutaraldehyde, cross-linking was completed, obtaining the Np-Cu spheroidal form less than 10 nm in diameter.

In this way, we established that hybrid microspheres containing copper nanoparticles, chitosan, gelatin and glutaraldehyde have an antibacterial effect on strains of *Escherichia coli*. and *Enterococcus faecalis*. The method of polyol used, allowed us to obtain pure copper and exert their antibacterial action and the development of hybrid microspheres allowed us to verify that the presence of copper is essential to exercise the antibacterial effect on *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*.

**Key Words:**

Copper nanoparticles, biopolymers, bactericidal, hospital infections, microbicidal activity

## INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha tenido un amplio desarrollo en las últimas décadas en la físico-química y sus áreas afines. Es por ello que han surgido numerosas formas de obtención de nanomateriales con fines y aplicaciones en diversos campos, lo cual ha sido posible gracias al descubrimiento de que las propiedades fisicoquímicas de los materiales cambian drásticamente a medida que su tamaño se reduce hasta la escala nano. Entre los nanomateriales obtenidos, se destacan las nanopartículas de plata, debido a que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Su principal aplicación se ha centrado en el área de la salud, siendo utilizado en el recubrimiento de materiales dentales, prótesis, catéteres, injertos vasculares y tratamiento tópico de quemaduras (Dibrov et al., 2002). Además, se han utilizado en otros campos de aplicación, como monitoreo del medio ambiente, catálisis, tratamiento ambiental, electrónica, óptica, fotónica y en la detección de espectroscopia Raman mejorada por superficie (Kreibig et al., 1995; Sharma et al., 2009).

Para cada aplicación, las nanopartículas requieren unas características específicas que definirán las propiedades físicas y químicas, tales como el tamaño y distribución, forma, y carga superficial, entre otras. Uno de los desafíos en síntesis de estos materiales es la obtención de nanopartículas con forma y tamaño homogéneo. Para ello se modifican condiciones de reacción tales como concentración de reactivos, adición de agentes estabilizantes, tiempo de reacción, temperatura y agitación (Maturana, 2009).

La estandarización del proceso de síntesis de las nanopartículas es un aspecto muy importante, ya que se ha establecido que las propiedades antibacterianas están estrechamente relacionadas con el tamaño y carga superficial. Si se manejan adecuadamente estas propiedades, las nanopartículas de plata podrían tener un enorme potencial como agentes antibacterianos (Salopek-Sondi, 2004; Morones et al., 2005; Panacek et al., 2006).

La OMS anunció en el 2012 que la resistencia a los antimicrobianos compromete la prevención y el tratamiento eficaz de un número cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos. Y que a medida que pasan los años esta problemática constituye una amenaza creciente para la salud pública mundial que requiere la adopción de medidas por parte de todos los sectores gubernamentales

y de la sociedad en general. Hoy en día se conoce que la resistencia a medicamentos de primera elección ha aumentado, y es posible que en un futuro próximo sea necesario emplear medicamentos especializados de un costo mayor que provoquen que las personas de bajos recursos económicos no puedan acceder a los mismos.

En los hospitales se ha demostrado como la resistencia bacteriana a los antibióticos y/o antisépticos ha experimentado un crecimiento exponencial, trayendo como resultado enfermedades intrahospitalarias que repercuten en la salud pública, provocando a futuro epidemias o pandemias. En la mayoría de regiones del mundo, se ha evidenciado una elevada proporción de bacterias responsables de varias infecciones nosocomiales, las cuales son causadas en un alto porcentaje por bacterias muy resistentes como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) o bacterias gramnegativas multirresistentes. Es por ello que se ha visto por conveniente desarrollar nuevas alternativas de compuestos baratos y efectivos que logren erradicar dichas infecciones en los centros hospitalarios, como es el caso de combinar un metal noble con un conjunto de polímeros que produzcan un biomaterial (matriz híbrida) capaz de desempeñar un papel importante en el control de dichas bacterias. Hay varios estudios sobre los metales que se pueden utilizar para generar esta matriz híbrida, un ejemplo es el desarrollo de nanopartículas de plata y oro que tiene poder antimicrobiano pero una utilidad limitada por que solo inhibe el crecimiento mas no posee un poder bactericida; viendo este problema la investigación trató de estudiar nuevos metales como el cobre; que tiene propiedades catalíticas, son buenos conductores eléctricos y sobre todo cuentan con un potencial antimicrobiano elevado, por lo tanto el desarrollo de nanopartículas de cobre puede generar nuevos productos antisépticos, que combatan la contaminación intrahospitalarias. De la misma manera la elaboración del producto será más rentable al ser el Perú el segundo exportador a nivel mundial de cobre. Otra bondad de las nanopartículas de cobre es su baja toxicidad y versatilidad, también cabe destacar que el cobre cumple una función antiviral porque tiene una gran capacidad para inhibir su crecimiento.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Prado J. Valeria, Vidal A. Roberto, Durán T. Claudia,(2012 Octubre), Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica, Programa de Microbiología, Instituto de Ciencias.

### HIPÓTESIS

Dado que existen estudios de nanopartículas (oro y plata) que cumplen funciones antimicrobianas conjuntamente con polímeros en sus estructuras, es probable que las nanopartículas de cobre incluidas en una matriz híbrida compuesta por quitosano, gelatina y glutaraldehído tengan efecto bactericida sobre *Escherichia coli.* y *Enterococcus faecalis.*

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN

Establecer si las microesferas híbridas conteniendo nanopartículas de cobre, quitosano, gelatina y glutaraldehído tienen efecto antibacterial sobre cepas de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS DE LA INVESTIGACIÓN

1. Obtener nanopartículas de cobre a partir de nitrato de cobre hemipentahidratado mediante el método de poliol.
2. Elaborar microesferas híbridas (quitosano, gelatina y glutaraldehído) con y sin nanopartículas de cobre y caracterizar sus propiedades por SEM, EDX y FT-IR.
3. Evaluar y analizar la actividad antimicrobiana de la matriz híbrida (con y sin nanopartículas de cobre) sobre *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*,
4. Determinar la concentración inhibitoria mínima y la concentración mínima bactericida de la microesfera.



# **CAPITULO I: MARCO TEÓRICO**

## MARCO TEÓRICO

### 1. Nanotecnología

La nanotecnología se define como el «desarrollo de ciencia y tecnología a niveles atómicos y moleculares, en la escala de aproximadamente 1-100 nm, para obtener una comprensión fundamental de fenómenos y materiales en dicha escala nanométrica y para crear y usar estructuras, dispositivos y sistemas que tengan nuevas propiedades y funciones debido a su tamaño». Nanómetro significa la milmillonésima parte de 1 metro.<sup>2</sup>

Las nanopartículas existieron en el planeta por siglos, algunos ejemplos son las partículas de humo y las partículas dentro de bacterias, pero es sin duda las nanopartículas metálicas las que poseen diversas propiedades en el área de la tecnología. Más adelante, en algunas civilizaciones antiguas como la egipcia que se empleó las nanopartículas de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y hoy en día se utiliza para tratar la artritis.

En el año 1857 Faraday realizó el primer estudio sistémico de nanopartículas presentando un estudio de la síntesis y sus cualidades coloidales del oro; y es desde esa época hasta la fecha, grandes avances se han logrado en conocimiento de las nanopartículas metálicas desarrollando diversos métodos, con la finalidad de poder diseñar sus dimensiones, forma, composición y así poder controlar su comportamiento frente a diversos estímulos.<sup>3</sup>

### 2. Nanopartículas de cobre

Son partículas invisibles al ojo humano, pero pueden generar cambios a gran escala. En 2008 el cobre fue reconocido como el primer metal con propiedades antimicrobianas. En contacto con superficies de cobre o sus aleaciones, el 99% de los principales gérmenes causantes de infecciones intrahospitalarias mueren al cabo de dos horas.

---

<sup>2</sup>Lechuga Laura M., (2011 Mayo), Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud, Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología (CIN2). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Grupo de Nanobiosensores y Aplicaciones Bioanalíticas., (9a edición del curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana).

<sup>3</sup>Gutiérrez Wing Claudia E., (2004), Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial: ¿Por qué el interés en los materiales? ¿Qué aplicaciones tienen?, El ININ hoy – Contacto nuclear (24 – 29).

Desde entonces las aplicaciones del metal se han multiplicado en superficies de pabellones y salas de hospitales, pasamanos de escaleras, manillas y sistemas de aire acondicionado.

Empleando nanotecnología — disciplina que trabaja con materiales que miden la millonésima parte de un milímetro — lograron desarrollar nanopartículas de cobre que se agregan como aditivo al proceso productivo de cualquier objeto fabricado con polímeros.

En laboratorio han determinado que la capacidad microbicida de las nanopartículas de cobre es hasta 100 veces mayor que la de una partícula convencional, como las que se emplean en textiles.<sup>4</sup>

### 3. Obtención de nanopartículas de cobre

Si bien en la literatura existen antecedentes que muestran la factibilidad de obtener nanopartículas de cobre de diferentes tamaños y formas, para el uso en aplicaciones biológicas, se requiere incrementar el conocimiento existente sobre la naturaleza de la superficie de las partículas de manera de modular sus propiedades de acuerdo a las necesidades de cada aplicación en particular.

El cobre es un elemento presente en la mayoría de las bacterias. Sin embargo a altas concentraciones, es tóxico.

Este metal es capaz de catalizar la formación de radicales libres de peróxido de hidrógeno, con consecuencias de daño a lípidos, proteínas, ADN y otras biomoléculas presentes en la estructura celular de la bacteria. La eficacia bactericida de las nanopartículas de cobre se debe, tanto a la fácil liberación de iones por la alta reactividad de las partículas nanométricas, así como la gran área superficial de las mismas que permite la interacción con la membrana bacteriana.

El estudio de nanopartículas de cobre que se propone tendría una gran relevancia para el ámbito de medicina, por la capacidad de éstas para actuar como un antiséptico. Ello considerando entre otros, la importancia actual de los biocidas concerniente a resolver problemas tecnológicos relevantes, por ejemplo, en enfermedades asociadas a la higiene, en contagios intrahospitalarios o en empaque.

---

<sup>4</sup>Colegio de Ingenieros Agrónomos de Chile, (2014 Setiembre), Fabrican en Chile súper materiales con nanopartículas de cobre y celulosa, Recuperado de <http://ingenierosagronomos.cl/pcomciac/archives/4293>.

de alimentos.<sup>5</sup>

En la vida cotidiana son conocidas y apreciadas algunas características del cobre que facilitan el funcionamiento de las sociedades modernas, entre ellas la capacidad de ser un buen conductor eléctrico y térmico; por ello este metal tiene un amplio uso en áreas industriales relacionadas con la fabricación de automóviles, climatización, informática telecomunicaciones. El uso y demanda del cobre es un buen indicador del nivel de crecimiento y desarrollo de los países y las estadísticas indican que en época de crisis económicas su consumo decrece.

Otras aplicaciones son:

- Actividad antibacteriana del cobre:

El mecanismo por el cual el cobre ejerce su efecto antibacteriano no está dilucidado en su totalidad, pero se postula que como este metal tiene la capacidad de ceder y captar electrones de manera continua, se dice que el a concentraciones elevadas logra un efecto toxico sobre las bacterias debido a la liberación de radicales libres, los iones de cobre potencialmente podrían sustituir algunos iones esenciales para el metabolismo bacteriano como el hierro, interfiriendo inicialmente con la función de la membrana celular y luego a nivel de citoplasma provocando la síntesis de proteínas disfuncionales, lo que se traducirá en una alteración de enzimas que son esenciales para el metabolismo bacteriano.<sup>6</sup>

- Actividad antiviral del cobre:

El cobre también ha demostrado una gran capacidad para destruir virus de gran importancia médica entre ellos, el virus de la influenza A, VIH a concentraciones bajas. La elaboración de filtros de óxido de cobre ha permitido eliminar en forma eficiente la transmisión de VIH a través de fluidos. Los mecanismos involucrados son la inactivación de una enzima proteasa que es importante en la replicación viral y daño de la envoltura fosfolipídica.<sup>7</sup>

---

<sup>5</sup> Valencial E., Lopez Z., Gonzalez G.,(2006;2009), Síntesis y Caracterización de Nanopartículas con Potenciales Usos Medicinales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile. 2Centro para el Desarrollo de Nanociencia y Nanotecnología CEDENNA, Santiago Chile.

<sup>6</sup> AS Gordon, Howell LD, Harwood V,(1994 Febrero 18), Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations, Department of Biology and Chemistry - Liberty University.

<sup>7</sup>Prado J Valeria, Vidal A Roberto, Durán T Claudia, (2012 Setiembre 4), Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica, Revista médica de Chile, volumen 140 no.10.

- Actividad antifúngica del cobre:  
Diferentes especies de hongos entre ellas candida albicans, patógeno importante en pacientes inmunocomprometidos, son inhibidas en su crecimiento y luego destruidas, en contacto con superficies de cobre. Estudios indican que la actividad antifúngica ocurre mediante un proceso denominado “muerte por contacto” en el cual se produce un daño al igual que en las bacterias en la membrana citoplasmática la cual se despolariza; no está claro si el daño afecta a proteínas como en el caso de las bacterias, o lípidos de la membrana. Esto permite la entrada de cobre a la célula amplificando el daño y secundariamente se produce aumento en el estrés oxidativo, sin apreciar daño aparente del ADN celular.<sup>8</sup>

#### 4. Microesferas híbridas

La Microencapsulación de compuestos de actividad biológica (ADN, fármacos, proteínas, probióticos, enzimas, etc.), desde el punto de vista tecnológico, podría definirse como el proceso de recubrimiento de dichos compuestos, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. Uno de los polímeros naturales más utilizados para la producción de microesferas es el quitosano. Diversos métodos han sido propuestos para la producción de microcápsulas, divididos en tres grupos: procesos físicos, procesos químicos y procesos físico-químicos.<sup>9</sup> El esquema de la matriz híbrida y Microencapsulación se puede observar en los cuadros sinópticos 1 y 2.

Recientemente han resultado útiles para formulaciones de liberación controlada de uso parenteral los sistemas de liberación consistentes en polímeros biodegradables, debido a sus posibilidades de controlar la liberación del fármaco de forma efectiva.

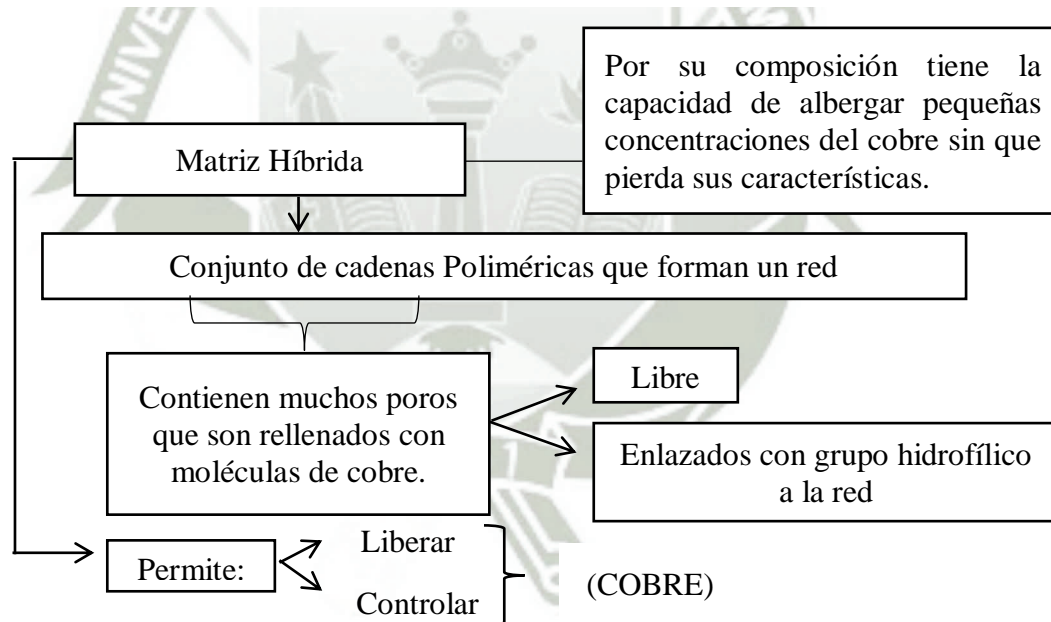
---

<sup>8</sup> Quaranta D, Krans T, Espirito Santo C, Elowsky C G, Domaille DW, Chang CJ, Grass G. Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 416-26.

<sup>9</sup> Lopretti Mary, Barriero Filomena, Fernandes Isabel, Damboriarena Agustin, Ottati Carolina, Olivera Alvaro,(2007), Microencapsulación de compuestos de actividad biológica, Revista del laboratorio tecnológico de Uruguay – INNOTECH, Edición (2).

Dentro de estas formulaciones se encuentran las microesferas que se han utilizado exitosamente para encapsular una amplia variedad de principios activos, incluyendo citostáticos, antiinflamatorios, péptidos y hormonas, entre otros. Estas microesferas son partículas esféricas análogas de las microcápsulas pero sin una distinción clara entre núcleo y pared. Tiene una estructura monolítica preparada a partir de materiales biodegradables y con un gran espectro de velocidad de cesión y propiedades degradativas, donde el principio activo o agente terapéutico está distribuido a través de la matriz como una dispersión molecular o de partículas. Se han usado varios métodos para la preparación de microesferas de diferentes polímeros biodegradables, incluyendo polímeros naturales y sintéticos. La selección de un método de preparación adecuado depende de las propiedades del polímero y el principio activo que se utilice y puede afectar las características de las microesferas.<sup>10</sup>

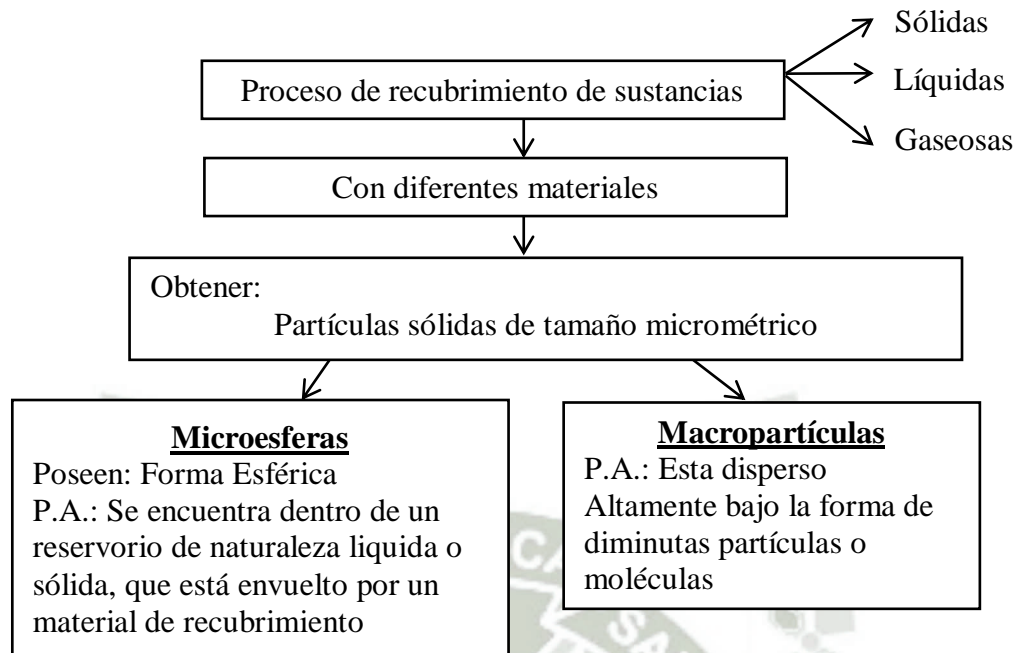
**Gráfico N° 1: Estructura de la matriz híbrida.**



Fuente: Elaboración propia.

<sup>10</sup> Ramos Picos Diana, Gómez Carril Martha y Fernández Mena Dianelis, (2001,31 de Enero), Métodos de obtención de microesferas biodegradables, Revista Cubana de Farmacia, volumen 35 n.2 Ciudad de la Habana.

**Gráfico N° 2: Proceso de Microencapsulación.**



Fuente: Elaboración propia

#### 4.1 Bacterias Intrahospitalarias

##### 4.1.1 *Escherichia coli*

Es el organismo procarionta más estudiado por el ser humano “*Escherichia coli*” también conocida por la abreviación de su nombre, *Escherichia coli*, es una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, pero se lo puede encontrar en todos lados, dado que es un organismo ubicuo. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser

patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.

Se caracteriza por:

- Bacilo recto de 1.1-1.5 x 2.0-6.0  $\mu\text{m}$ , individuales o en pares.
- Su temperatura óptima es 37°C, con un rango que va de los 15°C a los 45°C, el pH óptimo es de 7, tolerando grandes variaciones.
- Bacilos Gram negativos
- Anaerobios facultativos
- Tamaño varía entre 0.3-1.0 x 1.0-6.0  $\mu\text{m}$ .
- Móviles por medio de flagelos peritricos o inmóviles.
- Capsulados o no capsulados.
- No forman esporas.

Presentan buen desarrollo en medios de cultivo tipo básicos como agar MacConkey y Muller Hinton suelen ser necesarias de 18 a 24 horas de incubación para su crecimiento en diversos medios selectivos y no selectivos.

Producen ácido a partir de la fermentación de la glucosa, en donde puede o no haber producción de gas.

- Son catalasa positiva,
- Oxidasa negativa.<sup>11</sup>
- La mayoría de las infecciones por *Escherichia coli* provienen de:
  - Comer carne de res molida poco cocida (la parte interna es de color rosa).
  - Beber agua contaminada (impura).
  - Beber leche sin pasteurizar (cruda).
  - Trabajar con ganado.

Comer alimentos contaminados con heces de animales (como verduras).

Es posible que el ganado lechero y de carne saludable tenga el germen de la *Escherichia coli* en los intestinos. La carne puede contaminarse

---

<sup>11</sup>Rodríguez-Angeles Guadalupe, (2002), Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, Salud Pública de México, volumen.44 no.5 Cuernavaca.

con el germen durante el proceso de carneado. Al moler la carne de res, los gérmenes de la *Escherichia coli* se mezclan por toda la carne. La forma más común de contraer esta infección es comiendo alimentos contaminados. Usted puede contraer el germen de *Escherichia coli* si no usa alta temperatura para cocinar la carne de res o si no la cocina el tiempo suficiente. Cuando usted come carne de res poco cocida, los gérmenes entran al estómago y a los intestinos. El germen también puede transmitirse de una persona a otra en guarderías y hogares para ancianos. Si tiene esta infección y no se lava bien las manos con jabón después de ir al baño, puede transmitir el germen a otras personas cuando toca alguna cosa, en especial alimentos. Las personas que tienen infección por *Escherichia coli* pueden transmitirla con facilidad. Los niños no deben asistir a una guardería hasta tener 2 cultivos de heces negativos (prueba de que la infección ha desaparecido). Las personas mayores en hogares para ancianos deben quedarse en la cama hasta obtener 2 cultivos de heces negativos.<sup>12</sup>

#### 4.1.2 *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus* es una bacteria causante de infecciones intrahospitalarias de difícil tratamiento debido a la resistencia que presenta a los antimicrobianos.

*Enterococcus* son miembros de la flora normal del tracto gastrointestinal y del tracto genital femenino; sobreviven en las manos del personal del hospital. Se han convertido en importantes patógenos nosocomiales y sus infecciones parecen originarse en la flora endógena de los pacientes.

- Bacteria Gram Positiva Comensal
- Inmóvil
- Anaerobia Facultativa

---

<sup>12</sup>Lange Ignacio (2010 Septiembre), Estudio sobre la conservación térmica de la carne fresca y la leche ultrapasteurizada en supermercados y almacenes ubicados en Capital Federal y Gran Buenos Aires, Universidad de Belgrano – Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Licenciatura en Tecnología de Alimentos.

- Fermenta glucosa sin producir gas.
- No presenta una reacción con la catalasa en presencia del peróxido de hidrógeno.
- Si se cultiva en agar sangre, produce una catalasa pseudocatalasa.
- Vive en ambientes extremos que incluye pH altamente alcalino de 9.6 y elevadas concentraciones de sal.
- Es resistente a condiciones adversas (congelación, desecación, tratamiento térmico)

Causa infecciones comprometidas con humanos (endocarditis, infecciones de vejiga, próstata y epidídimo), porque tiene la habilidad de adquirir resistencia a prácticamente todos los antibióticos como:

- Aminoglicósidos
- Cefalosporina
- Clindamicina
- Penicilina semisintéticas (amoxicilinas, trimetopin + sulfametoxazol, oxacilina, nafcilina).<sup>13</sup>

#### 4.2 Antibiograma

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad in vitro es uno de los requisitos previos para la eficacia in vivo de un tratamiento antibiótico. También es importante para realizar estudios sobre la evolución de las resistencias bacterianas que permite revisar los protocolos de la antibioticoterapia empírica.

El antibiograma permite definir para cada antibiótico si la bacteria es:

- Sensible (antibiótico eficaz)
- Intermedio (antibiótico eficaz en ciertas condiciones)
- Resistente (antibiótico ineficaz).

---

<sup>13</sup>Guevara D. José, Guevara G. Juan, Valencia Esther, Alcalá Hércules, Guevara G. José, (1997), Enterococcus en la Rutina del Trabajo Microbiológico, Revistas de investigación UNMSM, Vol. (58, Núm. 4).

El antibiograma permite medir la capacidad de un antibiótico a inhibir el crecimiento bacteriano. Permite evaluar la eficacia de un antibiótico sobre una bacteria.<sup>14</sup>

#### **4.2.1 Concentración inhibitoria mínima (CIM) (ug/ml)**

Es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10<sup>5</sup> bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 h de incubación. Se clasifica la sensibilidad de un germen frente a un antibiótico en función de sus respectivas CMI.<sup>15</sup>

#### **4.2.2 Concentración mínima bactericida (CMB)**

Es la menor concentración capaz de destruir o matar 10<sup>5</sup> bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 h de incubación.

### **4.3 Polímeros de Encapsulación**

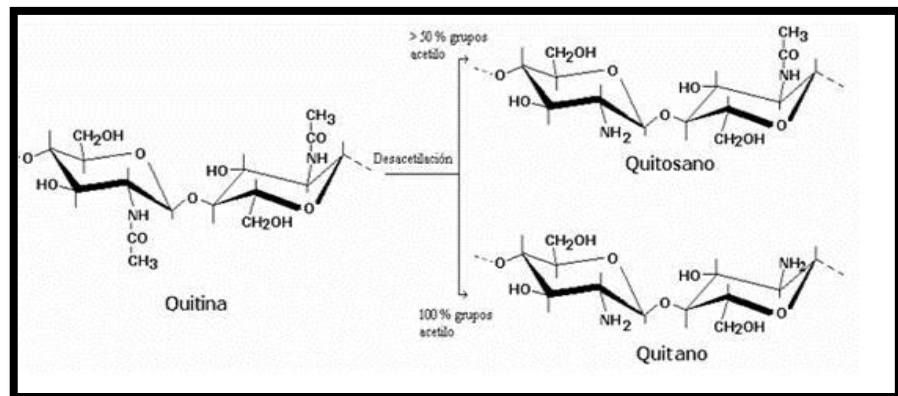
#### **4.3.1 Quitosano:**

El quitosano es un polisacárido que se encuentra en estado natural, formado por más de 5.000 unidades de glucosamina (2-amido-2 deoxy- $\beta$ -D-glucano) unidas por enlaces glicosídicos  $\beta$  1-4, está ubicado principalmente en la pared celular de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de obtención es por medio de la desacetilación de la quitina en medio alcalino como se puede ver en la figura N° 1, usualmente hidróxido de sodio, que se usa a altas temperaturas.

---

<sup>14</sup>Picazo Juan J, (2000), Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, Procedimientos en Microbiología Clínica, Volumen (11).

<sup>15</sup>Palavecino Rosales Elizabeth,(1997), Interpretación de los estudios de Susceptibilidad antimicrobiana, Boletín de la escuela de Medicina – Pontificia Universidad Católica de Chile, Volumen (26), No.3.



**Figura N° 1: Esquema de desacetilación de la quitina (Estudio de las propiedades morfológicas y reológicas de una red híbrida de polímeros sintetizada a partir de tres biopolímeros: gelatina/quitosano/dextran).<sup>16</sup>**

Se produce mediante desacetilación de la quitina, que es un elemento que se encuentra en gran cantidad en el exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, langostas, etc.) El grado de desacetilación (DA) puede ser determinado por espectroscopía NMR, o por espectroscopía infrarroja. El grupo amino en el quitosano tiene un valor pKa que ronda los 6.5, razón por la cual posee una ligera carga positiva y es soluble en medios ácidos o en soluciones neutras con dependencia del valor de su desacetilación. Esto quiere decir que es un bioadhesivo y puede ligarse a las superficies cargadas negativamente tales como las membranas mucosas. Debido a esta propiedad física, permite el transporte de principios activos polares a través de superficies, siendo además biocompatible y biodegradable.

La carga positiva que inducen los grupos amino, da al quitosano la capacidad de atrapar sustancias como macromoléculas, proteínas, lípidos, metales, etc. Estas propiedades hacen que el quitosano tenga un gran potencial para diferentes usos. La estructura molecular del quitosano posibilita también que actúe como liberador de sustancias de una manera controlada, pudiéndose utilizar para incluir aditivos o ingredientes funcionales en los recubrimientos y películas.

<sup>16</sup>García Chávez Ricardo y Mendoza Martínez Ana María, (2010 Marzo), los polímeros sintetizados son tres biopolímeros: gelatina/quitosano/dextran, Revista Iberoamericana de Polímeros, Volumen 11 (2).

#### Aplicaciones del quitosano

- En la química analítica: aplicaciones cromatográficas, intercambiadores de iones, absorción de iones de metales pesados y absorción de ácidos, fabricación de electrodos específicos para metales, etc.
- En la biomedicina: membrana de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de la piel, agente cicatrizante en quemaduras, sistemas liberadores de fármacos, liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del sida.
- En la agricultura y ganadería: recubrimiento de semillas para su conservación durante el almacenamiento.
- En la industria cosmética: espumas de afeitar, cremas para la piel y el cuerpo. En productos dietéticos: adelgazantes, como polímero atrapador de grasas en el estómago. En la industria: del papel, textil, alimentaria (soporte para inmovilización de enzimas en la producción de maltosa, espesante en alimentos, agente de oxidación controlada, agente perseverante).<sup>17</sup>

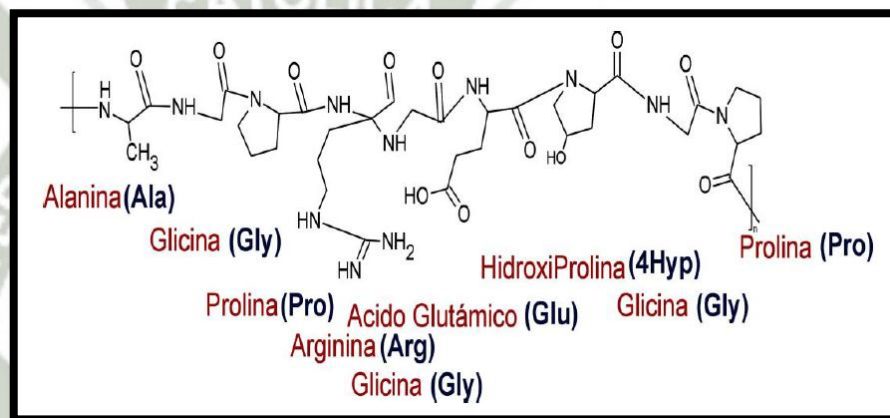
#### 4.3.2 Gelatina

La gelatina es una sustancia derivada del colágeno, una sustancia que constituye gran parte del tejido conectivo en los seres vivos. El colágeno es una molécula de naturaleza proteica, es decir que está formada en base a aminoácidos. Está formada por 3 cadenas de aminoácidos, también llamados monómeros de tropocolágeno enlazados en forma de hélice. Esto debido a los enlaces de hidrogeno que se encuentran dentro de las cadenas. Debido a la forma de esta molécula, estas fibras se disponen de manera ordenada y unida unas a otras. Brindando resistencia y flexibilidad principalmente al tejido conectivo de los animales. La gelatina contiene un gran número de aminoácidos tales como: alanina, glicina, prolina, 4-hidroxiprolina,

---

<sup>17</sup>Majeti N.V. Kumar Ravi (2000) A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers* 46:1–27.

etc. Una estructura común de la gelatina es –Ala-Gly-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro- (figura N° 2). La gelatina puede ser fácilmente entrecruzada, además de ser biodegradable. El entrecruzamiento puede llevarse a cabo por medio de varias técnicas química, incluyendo glutaraldehído, isocinatos, entre otros químicos. Generalmente la distribución de peso molecular de la gelatina es de 15000 a 250000 g/mol. La gelatina contiene grupos carboxilos en sus cadenas principales y tienen el potencial de establecer interacciones asociativas con quitosano debido a su capacidad para la formación de puentes de hidrogeno con este, dando lugar a una estructura de hidrogel reversible que se denomina red polimérica híbrida.



**Figura N° 2: Estructura de la Gelatina (Estudio de las propiedades morfológicas y reológicas de una red híbrida de polímeros sintetizada a partir de tres biopolímeros: gelatina/quitosano/dextran).<sup>18</sup>**

Aplicaciones de la gelatina:

- Gelatina para la Industria alimentaria

La gelatina es una proteína de primera calidad que reúne, como alimento, numerosas propiedades positivas necesarias para una alimentación sana.

- Gelatina para la Industria farmacéutica

<sup>18</sup>García Chávez Ricardo y Mendoza Martínez Ana María, (2010 Marzo), los polímeros sintetizados son tres biopolímeros: gelatina/quitosan/dextran, Revista Iberoamericana de Polímeros, Volumen 11 (2).

La gelatina recubre y protege los medicamentos. Se utiliza en las cápsulas en las que normalmente se presentan los medicamentos.

- Gelatina para la Industria fotográfica

Gracias a la gelatina pueden fabricarse las películas para aficionados, papel de color, películas gráficas y películas de rayos X en cantidades industriales.<sup>19</sup>

### 4.3.3 Glutaraldehído

Compuesto químico de la familia de los aldehídos. Sus sinónimos son: Dialdehído glutárico, glutaralum, 1.3-diformilpropano, glutaral, pentanodial, pentano-1.5-dial, GTA.

Sus propiedades físico-químicas son:

- Líquido oleaginoso generalmente sin color o ligeramente amarillento y con un olor acre.
- Es un compuesto estable sin riesgo de polimerización.
- Soluble en agua y solventes orgánicos (etanol, benceno y éter).
- En agua es ligeramente ácido (pH 3-4) y polimeriza a una forma vítrea; en destilación al vacío se regenera el dialdehído.
- Emanar vapores tóxicos

Es alquilante de grupos sulfhidrilo, hidroxilo, carbonilo y amino, alterando así la síntesis de DNA, RNA y proteínas. La célula es incapaz de llevar a cabo sus funciones esenciales. Causa también disrupción de la pared de esporas e inhibe la esporulación y germinación.

Las soluciones deben estar activadas: el pH óptimo de actuación es entre 7.5-8.5.

Menos tóxico y más potente que el formaldehído.

---

<sup>19</sup>Vásconez Cabezas Paulina Alexandra. 2005. Optimización de la gestión de procesos productivos de Gelatinas Ecuatorianas GELEC S.A. Memoria de Ingeniero Industrial. Ambato: Universidad técnica de Ambato. 229p.

Aplicaciones:

- Desinfección de endoscopios e instrumentos dentales: solución acuosa de glutaraldehído al 2% a pH 8. Las soluciones son ligeramente ácidas y deben alcalinizarse con bicarbonato sódico al 0.3% para activarlas. La inmersión de endoscopios flexibles en solución de glutaraldehído al 2% durante 20 minutos a 20°C después de su limpieza a fondo se considera el patrón de desinfección en endoscopia digestiva.
- Material de plástico o goma que no es esterilizable por calor: equipos de terapia respiratoria, broncoscopios, cistoscopios, artroscopios, conexión de ambú y bolsa de ambú, palas laringo, nebulizadores, dializadores, equipos de anestesia y de terapia respiratoria, tubos de espirometría y hemodiálisis.<sup>20</sup>

---

<sup>20</sup> Sociedad Catalana de Farmacia Clínica ,(2003 Setiembre), Solución de Glutaraldehído, Recuperado de: <http://www.scfarmclin.org/docs/higiene/part4/4332.pdf>



# **CAPITULO II**

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales de Vidrio

- 20 Tubos de ensayo con tapa rosca
- 6 Tubos de ensayo
- 20 Tubos falcón
- 8 Vasos de precipitado x 25 ml
- 20 Vasos de precipitado x 125 ml
- 20 Vasos de precipitado x 600 ml
- Frascos con tapa de 500 ml
- 15 Jeringas de 3 ml
- 15 Agujas de diámetro 25 – 26 galgas (0.45 – 0.5 mm)
- Matraces de 320 ml
- 30 Tubos Eppendorf
- Matraces Erlenmeyer x 500 ml
- 15 Matraces Erlenmeyer x 250 ml
- 30 Matraces Erlenmeyer x 10 ml
- 4 Pipetas x 5 ml
- 4 Pipetas x 1 ml
- 4 Espátulas
- 1 Matraz de Kitasato
- 1 Embudo Buchner
- Picetas
- Gradilla de Tubos de ensayo
- Matraces de fondo plano
- Matraces de fondo redondo
- Pinzas de bureta
- Probetas de 250 ml
- 35 Placas Petri de plástico
- 25 Placas Petri de vidrio
- 1 Vidrio de reloj
- 1 Escobillón para tubos de ensayo
- 1 Escobillón para matraces

- Algodón
- Tapones para matraces
- Papel Kraft
- 2 Fritas con tamaño de microporo de 1 y 2.

## 2. Reactivos y soluciones

- Nitrato de Cobre hemipentahidratado (Sigma-Aldrich 99.2%)
- Etilenglicol (Merck, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, 99.5%)
- Agua Destilada
- Etanol absoluto (Merck, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)
- Acetona (Merck, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, 99.6%)
- Quitosano (Aldrich al 1%)
- Ácido fórmico (HCOOH) al 5%
- Gelatina pura
- Glutaraldehído (Glu) al 0.01%
- Hexano
- Aceite de Oliva Extra virgen – Jumbo
- Sorbitol 1%
- Agar Mueller Hinton (MERCK)
- Caldo Mueller Hinton (MERCK)

## 3. Equipos e Instrumentos

- Equipo de reflujo – Liebigo o recto (Tubo de refrigerante)
- Agitador Magnético
- Plancha Calefactora
- Centrífuga
- Refrigerante de reflujo x 250 ml
- Microscopio electrónico de barrido
- Autoclave
- 1 Mechero de Bunsen
- 1 Soporte
- Espectrómetro UV (Shimatzu 1700)
- FIR

## 4. Metodología

### 4.1 Obtención de nanopartículas de cobre

En un típico procedimiento del método de poliol para la preparación de nanopartículas de cobre (Np-Cu), donde se añadió 2.3 gr de nitrato de cobre hemipentahidratado (Sigma-Aldrich 99.2%) a 150 ml de etilenglicol (Merck, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, 99.5%). La mezcla se somete a reflujo y agitación (180°C de 3 a 4 horas), observándose un cambio en el color de la solución de azul a rojo oscuro en el precipitado.

El producto formado se llevó a centrifugación a 4000 rpm durante 10 min. Posteriormente se lavan las Np-Cu con agua destilada, etanol absoluto y acetona.

Para finalizar y evitar la oxidación del cobre, se almacena en tubos falcón al vacío con exceso de nitrógeno.

### 4.2 Elaboración de las microesferas híbridas con y sin nanopartículas de cobre

#### 4.2.1 Elaboración de quitosano al 1%

Se preparó 500 ml de quitosano (Qo) Aldrich ( $M_w = 3.5 \cdot 10^5$ ), del cual se pesó 5 gr (PM: 336.329 g/mol); el cual se diluyó 100 ml al 5%. Se agitó aproximadamente durante 6 horas hasta que se observó que el Qo se disolvió completamente.

Las solución resultante se filtró al vacío por dos fritas con tamaño de microporo 1 y 2, luego se conservó con un frasco con taparosca a temperatura ambiente.

#### 4.2.2 Elaboración de gelatina al 3%

Se pesó 0.6 gr de gelatina pura (Ge) y se le adicionó 20 ml de agua destilada. Se somete a agitación con ayuda de un agitador magnético a 300 rpm con una temperatura de 45°C por 15 minutos hasta ver que la gelatina se disuelva.

#### 4.2.3 Preparación de Matriz con Nanopartículas de Cobre

Las soluciones de (Qo:Ge:Glu) se mezclan en un tubo con tapa rosca (4:1:0.9), después se añadió las diferentes concentraciones de Np-Cu (0.0017, 0.0030, 0.0035, 0.0040 mg). Luego se sometió por un periodo de 80 min a 37°C.

#### 4.2.4 Preparación de Microesferas Híbridas

Para la producción de microesferas se utilizó el método de emulsión por entrecruzamiento donde en un vaso de precipitado se agrega 50 ml de aceite de oliva extra virgen, se agitó a 300 rpm a 45°C durante 15 min con ayuda de un agitador magnético. Transcurrido el tiempo se añadieron 2 gotas de sorbitol al 1% y se dejó por 15 min más. Con ello queremos asegurar que la solución esté a 45°C que es la temperatura adecuada para que el aceite forme las microesferas. Transcurrido el tiempo se baja a 180 rpm. A continuación, con una jeringa de 3 ml y una aguja de diámetro de 25-26 galgas (0.45 a 0.50 mm).

De la matriz obtenida (Np-Cu/Qo/Ge/Glu) se tomó 3 ml y se adiciona gota a gota la matriz que estaba en la jeringa sobre el aceite.

Después de 1 minuto de agitación, se añadió 1 ml de Glu y se divide en 4 porciones iguales: 1; 3; 8 y 12 min respectivamente.

El mezclado se agitó a 180 rpm durante 24 horas.

Con el tiempo las microesferas se recolectaron, se lavaron con hexano varias veces para eliminar el aceite y se secaron a temperatura ambiente.

#### 4.2.5 Características microscópicas y composición de las microesferas híbridas con nanopartículas de cobre mediante SEM DEM y FT-IR

Esta metodología se llevaron a cabo en:

Instituto Catalán de Nanotecnología CIN2 (ICN- CSIC) Phononic and Photonic Nanostructures Group (P2N) Campus de la UAB - Edificio ICN2, 08193 Bellaterra (Barcelona), España. Y los cuales serán analizados e interpretados.

### 4.3 Pruebas de sensibilidad bacteriana y su análisis.

#### 4.3.1 Ensayo de sensibilidad en medio sólido.

En un tubo con caldo peptonado, se agrega alícuotas de 1ml de solución madre de *Escherichia coli* o *Enterococcus faecalis* (dependiendo del cultivo bacteriano) hasta alcanzar una concentración de 0.5 McFarland, luego se humedeció con una torunda de algodón tipo hisopo para sembrar en césped.

En una placa con agar Mueller-Hinton, se dividió la placa en dos y a cada lado se colocaron 4 microesferas de nanopartículas de cobre de: Control, Matriz y las diferentes concentraciones de cobre.

Posteriormente las placas se incubaron por 24 horas a 37°C. Para observar los halos de inhibición que tiene el cobre y así comprobar sus poder antibacterial.

#### 4.3.2 Ensayo de sensibilidad en medio líquido.

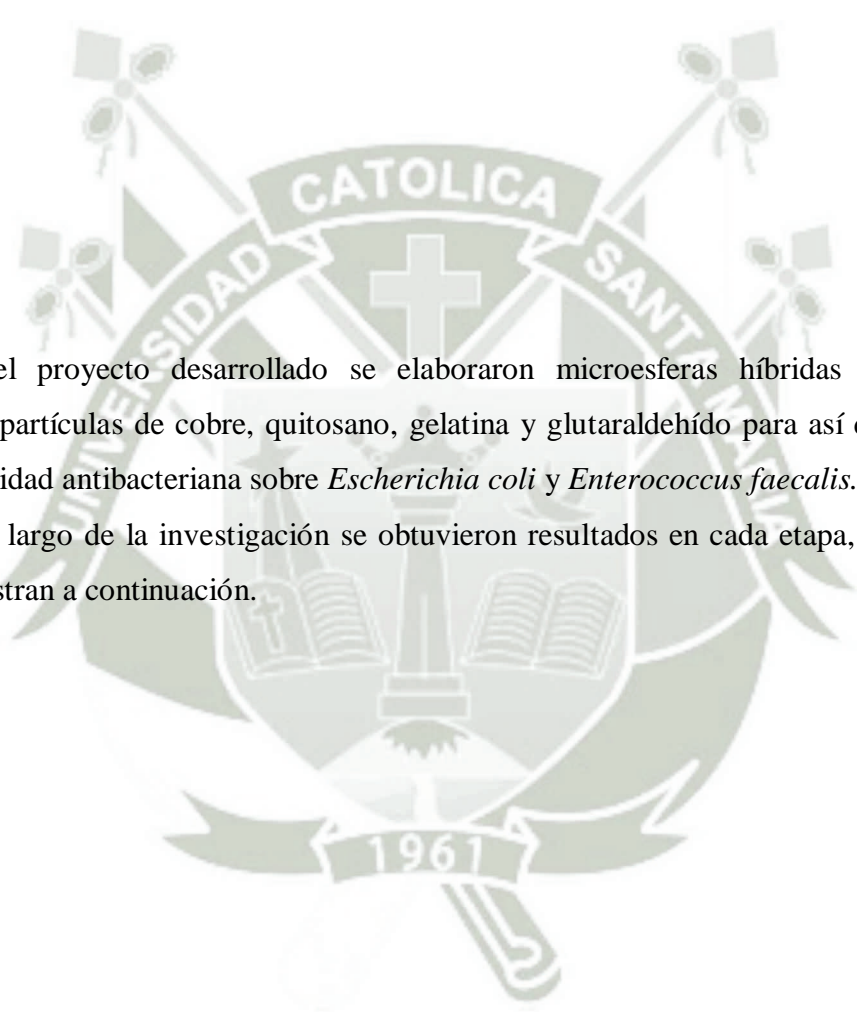
En un tubo con caldo peptonado, se agregaron 1ml de *Escherichia coli* u *Enterococcus faecalis* (dependiendo del cultivo bacteriano) OD 0.5 McFarland solución concentrada y se dejó crecer por 24 horas a 37°C, luego se tomó una alícuota de 1ml y se inocularon en matraz con caldo Mueller Hinton de 250 ml y se incubó por 1 hora a 37°C hasta llegar 0.5 McFarland.

Transcurrido este tiempo se retiró del matraz que estaba con la bacteria y el medio 10 ml y se preparó cinco matraces de 25 ml, los cuales se les adicionó cuatro microesferas de nanopartículas de cobre cada uno, con distintas concentraciones del agente inhibidor del crecimiento bacteriano para realizar los ensayos de sensibilidad.

Se les evaluó el crecimiento bacteriano midiendo las absorbancia de cada tubo de la serie preparada, utilizando un espectrómetro UV (Shimadzu1700) a 600 nm de longitud de onda.



# **RESULTADOS Y CONCLUSIONES**



En el proyecto desarrollado se elaboraron microesferas híbridas que incluían nanopartículas de cobre, quitosano, gelatina y glutaraldehído para así determinar su actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. A lo largo de la investigación se obtuvieron resultados en cada etapa, los cuales se muestran a continuación.

## RESULTADOS

### 1. Nanopartículas de cobre a partir de nitrato de cobre hemipentahidratado.

Las nanopartículas de cobre fueron obtenidas exitosamente y se pueden apreciar en la Figura N° 3.



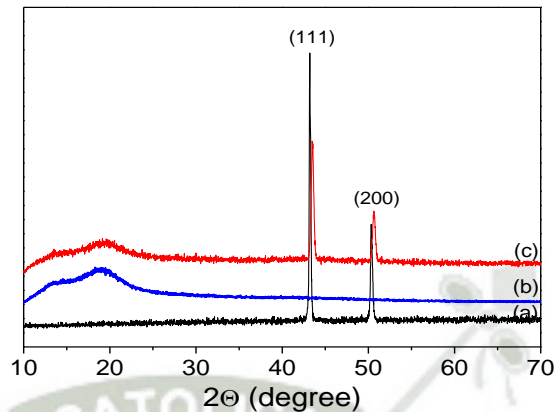
**Figura N° 3: Síntesis de nanopartículas de cobre a partir de Nitrato de cobre hemipentahidratado.**

Fuente: Elaboración propia.

En la elaboración de las nanopartículas de cobre se observó un viraje de color, de azul a celeste, a verde, a naranja y a rojo marrón, porque el Cu cambia de valencia de +2 a +0 (cobre molecular) lo cual indicaba una buena obtención de nanopartículas. Dicho resultado también fue obtenido por Jinhe Sun en el 2005, en su experimento utiliza sulfato de cobre y por una reacción de etilenglicol hay un viraje de color de azul a verde, a amarillo, a rojo marrón y también afirma que solo con el cambio de color era fácil de identificar una buena obtención de nanopartículas de Cu.

## 2. Microesferas híbridas (Np-Cu/Qo/Ge/Glu) y sus características mediante SEM, EDX y FT-IR.

### 2.1 Difracción de Rayos X.



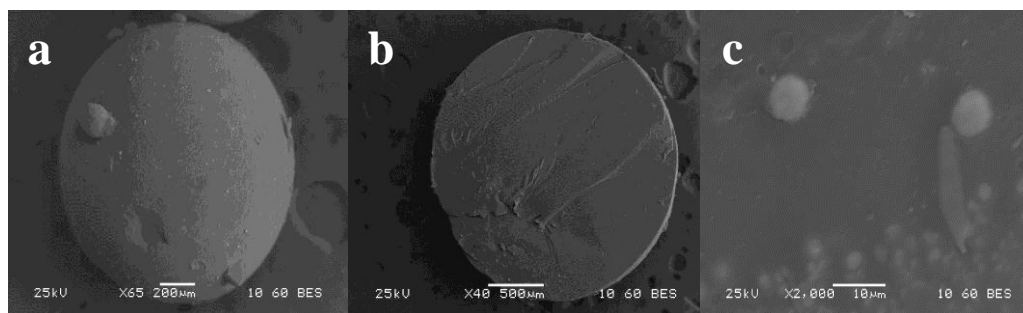
**Figura N° 4: Patrones de XRD de: (a) desnudo Np-Cu, (b) Qo y (c) Np-Cu/Qo/Ge/Glu.**

Fuente: Elaboración propia.

- En el patrón de las Np-Cu se destaca la aparición de 2 picos característicos de las nanopartículas de cobre a  $43.43^\circ$  y  $50.38^\circ$   $2\theta$ , correspondientes a los planos cristalográficos (111) y (200) respectivamente de la estructura cristalina del cobre metálico con estado de oxidación cero.
- Para el caso de las Qo/Ge/Glu pese a estar compuestas por un polímero con estructura definida, se comportaron como una estructura amorfa. Debido a esto no fue posible encontrar picos definidos y característicos del quitosano.
- En el caso del híbrido de Np-Cu/Qo/Ge/Glu también se observa dos picos coincidentemente a la misma altura de las nanopartículas de Np-Cu lo cual nos confirma la presencia de estas Np-Cu inmersas en el híbrido de Qo/Ge/Glu, teniéndose además que las intensidades de las señales coinciden entre sí.

Tómese como referencia para el estudio del grado de dispersión de las nanopartículas de cobre en el seno de la matriz del híbrido Qo/Ge/Glu el pico del difractograma con una intensidad de señal, es decir, el pico que aparece a un valor de  $43.43^\circ$   $2\theta$ , esta señal corresponde con el plano cristalográfico (111) del cobre.

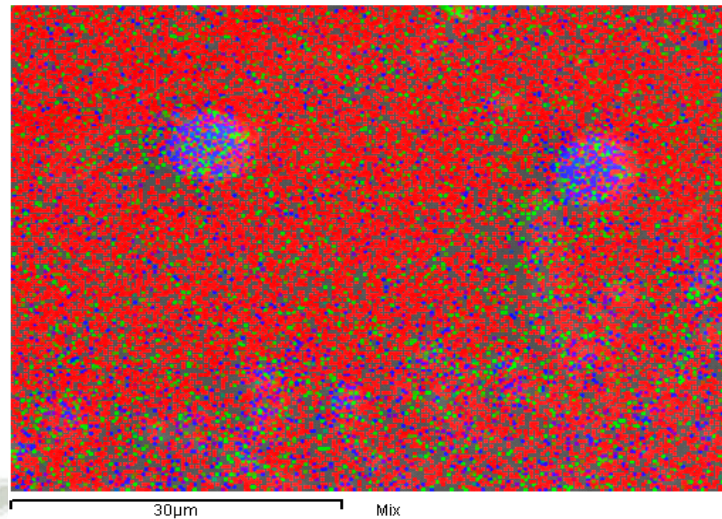
## 2.2 Microscopia Electrónica de barrido con microanálisis de energía dispersiva de rayos X y electrones retrodispersados (SEM-EDX).



**Figura N° 5: Micrografías SEM y EDX de microesferas híbridas Np-Cu/Qo/Ge/Glu a) Entera, b) partida y c) Np-Cu en el híbrido Qo/Ge/Glu.**

Fuente: Elaboración propia.

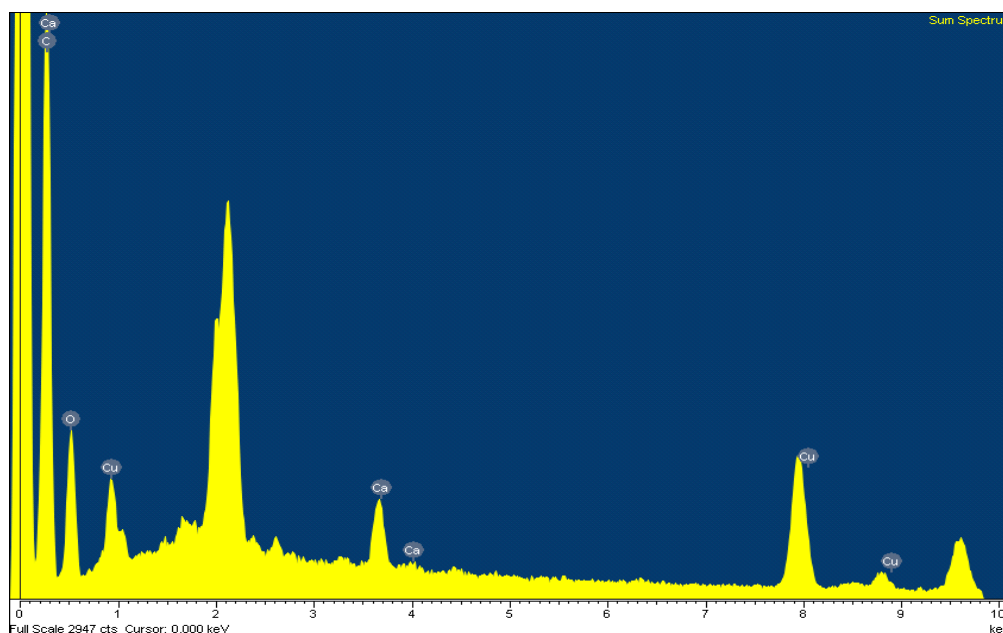
En la Figura N° 5 (a) la imagen SEM de las partículas Np-Cu/Qo/Ge/Glu y la misma imagen tomada en modo de contraste de fase (b), la cual muestra zonas de mayor densidad electrónica que se representan como áreas de color blanco difuso. y (c) SEM la cual muestra el análisis que se puede observar en la imagen las Np-Cu que presentaron una morfología ovalada a esférica y con un tamaño homogéneo entre ellas, además se determinó el tamaño promedio de las Np-Cu estableciéndose que median aproximadamente 1 a 10 nm.



**Figura N° 6: EDX ( $k\alpha$ ).- Mapeo de elementos químicos de las Microesfera híbridas de Np-Cu/Qo/Ge/Glu.**

Fuente: Elaboración propia.

Se realizó un mapeo de elementos químicos a la muestra de las microesferas híbridas, lo cual permitió identificar mediante puntos de colores la radiación ( $k\alpha$ ) emitida por los distintos elementos, determinando la disposición que tenían estos en la muestra. Es así como en la imagen SEM de la Figura N° 6 se puede detectar puntos de diversos colores, rojo para el carbono, verde para el calcio y azul para el cobre.



**Figura N° 7.- Espectro y cuantificación EDX de las microesferas híbridas de Np-Cu/Qo/Ge/Glu.**

Elaboración propia.

En la Figura N° 7 se muestra el espectro EDX de las microesferas híbridas, mediante el cual se determinó que la composición elemental de la muestra encontrándose que los elementos predominantes son: presencia de carbono y calcio en su mayor porcentaje también existe la presencia de oxígeno, se observa la presencia de cobre en un buen porcentaje y disperso con picos anchos lo que demuestra las nanopartículas distribuidas al interior del híbrido de Qo/Ge/Glu. Así mismo los resultados permiten observar claramente la presencia de las partículas de Cu, de manera independiente, a 0.9, 7.9 y 8.8 keV en concentraciones diferentes.

### 3. Evaluación estadística de la actividad antibacteriana de las microesferas híbridas Np-Cu/Qo/Ge/Glu frente a *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*.

Se realizó la evaluación de las propiedades antibacterianas de las microesferas híbridas (Np-Cu/Qo/Ge/Glu/) frente a *Escherichia coli* OD 0.5 McFarland como modelo de bacteria Gram-negativa y a *Enterococcus faecalis* OD 0.5 McFarland como modelo de bacteria Gram-positiva.

La determinación del efecto antibacteriano se llevó a cabo empleando dos diferentes métodos: en medio líquido por microdilución y por difusión de disco (método de Kirby-Bauer). A continuación, se presentan los resultados obtenidos de inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de Qo/Ge/Glu/Cu.

Tres mecanismos hipotéticos son los más aceptados y reportados en la literatura:

- Acumulación y disolución de nanopartículas metálicas en la membrana plasmática generan un cambio en su permeabilidad, con la consecuente liberación de lipopolisacáridos, proteínas de membrana y biomoléculas intracelulares (Khan S y cols., 2012).
- Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) generando daños oxidativos a las estructuras celulares como el DNA, la membrana plasmática y las proteínas de membrana (Fang J y cols., 2007).
- Adsorción de iones metálicos derivados de las nanopartículas o las mismas nanopartículas en el interior de las células, seguido por el agotamiento de la producción de ATP intracelular y la interrupción de la replicación del ADN (Lok C y cols., 2006).

Para realizar el análisis estadístico de los datos se aplicó la prueba estadística; Análisis de varianza - ANOVA y la prueba de Levene se usó para respaldar la prueba estadística post-hoc de Tukey. La significancia se reportó con un nivel de confianza del 95% ( $p=0.05$ ). Para realizar estos cálculos se empleó el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 22.0.

### 3.1 Resultados de *Escherichia coli* según grupos de estudio.

#### A. Ensayo de sensibilidad en medio sólido – Halo de inhibición.

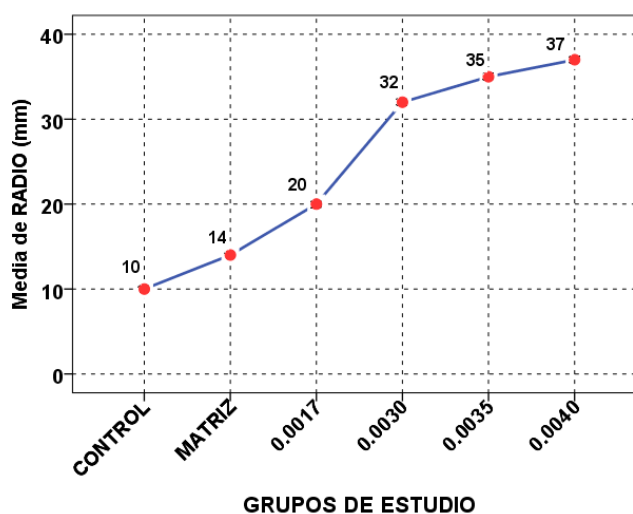
**Tabla N° 1: Promedios de los halos de inhibición de *Escherichia coli* según grupos de estudio.**

		<b>HALO DE INHIBICIÓN RADIO (mm)</b>	<b>DESVIACIÓN ESTANDAR</b>	<b>C. V. %</b>
<b>CONTROL</b>		10	0.667	6.67
<b>MATRIZ</b>		14	0.667	4.76
<b>Concentraciones de cobre (mg/l)</b>	<b>0.0017</b>	20	0.667	3.34
	<b>0.0030</b>	32	0.667	2.08
	<b>0.0035</b>	35	0.667	1.91
	<b>0.0040</b>	37	0.667	1.80

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 1, se resume el promedio (en milímetros), la desviación estándar y el coeficiente de variación (en porcentaje) de las diez placas evaluadas que corresponden al Control, Matriz y a las diferentes concentraciones de cobre (0.0017, 0.0030, 0.0035, 0.0040 mg/l); donde resalta la concentración de 0.0040 mg/l de cobre, por tener un valor elevado de halo de inhibición de 37 mm formado frente a *Escherichia coli* y un coeficiente de variación de 1.80%, en comparación con los demás; reportándonos que a esta concentración se obtuvo una mayor inhibición. Dichas mediciones están descritas en el Anexo N° 1.

**Gráfico N° 3: Comparación del efecto antibacteriano de las microesferas híbridas a diferentes concentraciones de cobre frente a *Escherichia coli* según sus halos de inhibición.**



Fuente: Elaboración propia

El gráfico N° 3 permite comparar el promedio de los halos de inhibición frente a *Escherichia coli* descritos anteriormente, es decir se observa que con el grupo de Control se logra un menor halo de inhibición en promedio, y se va incrementando con el grupo Matriz, y con el incremento de los grupos con mayor concentración de cobre.

**Tabla N° 2: Comparación de los Halos de inhibición de *Escherichia coli* según grupos de estudio.**

ANOVA (ANÁLISIS DE VARIANZA)					
Variable dependiente: RADIO (mm)					
FUENTE DE VARIACIÓN	Suma de cuadrados	Gl (Grados de libertad)	Media cuadrática	F	Sig. (p-valor)
Entre grupos (GRUPOS DE ESTUDIO)	6633.333	5	1326.667	2985.0	0.000
Dentro de grupos (ERROR)	24.000	54	0.444		
<b>Total</b>	<b>6657.333</b>	<b>59</b>			

Fuente: Elaboración propia

El cuadro anterior de análisis de varianza - ANOVA (Tabla N° 2) indican que existen diferencias significativas en la comparación de los halos de inhibición de los seis grupos de estudio (Control, Matriz, concentración al 0.0017, 0.0030, 0.0035, 0.0040) al obtener un (p-valor) menor a 0.05.

**Tabla N° 3: Prueba de Homogeneidad de varianzas de los halos de inhibición de *Escherichia coli* según grupos de estudio.**

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Variables dependientes: RADIO (mm)			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
.000	5	54	1.000

Fuente: Elaboración propia

Se puede observar según la prueba de Levene (Tabla N° 3), como el p-valor ( $1.000 > 0.05$ ) entonces se puede asumir la igualdad de varianzas en los seis grupos de estudio con respecto a los diámetros de los halos de inhibición, esto implica que podemos aplicar la prueba posterior de Tukey.

**Tabla N° 4: Comparación Múltiple de los diferentes grupos de estudio de *Escherichia Coli*.**

COMPARACIONES MÚLTIPLES		
VARIABLE DEPENDIENTE: RADIO (mm)		
PRUEBA: HSD TUKEY		
(I) Grupos de estudio	(J) Grupos de estudio	Sig.
Matriz	control	0.000
	0.0017	0.000
	0.0030	0.000
	0.0035	0.000
	0.0040	0.000
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05		

Fuente: Elaboración propia

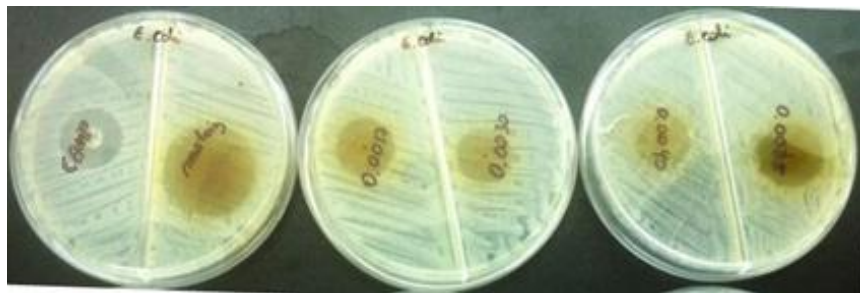
**Tabla N° 5: Prueba Tukey con respecto a los promedios de los grupos de estudio de *Escherichia Coli*.**

RADIO (mm)							
Prueba: HSD Tukey							
GRUPOS DE ESTUDIO	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
CONTROL	10	10.00					
MATRIZ	10		14.00				
0.0017	10			20.00			
0.0030	10				32.00		
0.0035	10					35.00	
0.0040	10						37.00
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Fuente: Elaboración propia

El procedimiento de Tukey, según las tablas N° 4 y N° 5 nos muestran que todos los grupos son significativamente distinto (p-valor 0.000) entre todos los halos de inhibición de los seis grupos de estudio (Control, Matriz, concentración al 0.0017, 0.0030, 0.0035, 0.0040), observándose también como todos los promedios son diferentes significativos entre sí. Infiriéndose así que a mayor concentración de cobre (0.0040 mg) mayor será su halo de inhibición.



**Figura N° 8: Ensayo de sensibilidad para *Escherichia coli* con microesferas a distinta concentración de nanopartículas de cobre.**

Fuente: Elaboración propia

En la figura se aprecia los diferentes halos de inhibición correspondiente a la tabla N° 1. En la primera placa Petri podemos observar como el grupo Control tiene un halo de inhibición mucho menor que el de la matriz y en las siguientes placas podemos observar que los halos de inhibición son directamente proporcionales a la concentración de nanopartículas de cobre.

**B. Ensayo de sensibilidad en medio líquido – Curva de Crecimiento.**

La tabla N° 6 se presentan los resultados de ANOVA para los diferentes tiempos de exposición, observándose que todos los valores críticos presentan un valor de 0.000, lo cual nos indica que si existe una diferencia estadísticamente significativa a partir de la tercera hora, acentuándose a la cuarta hora.

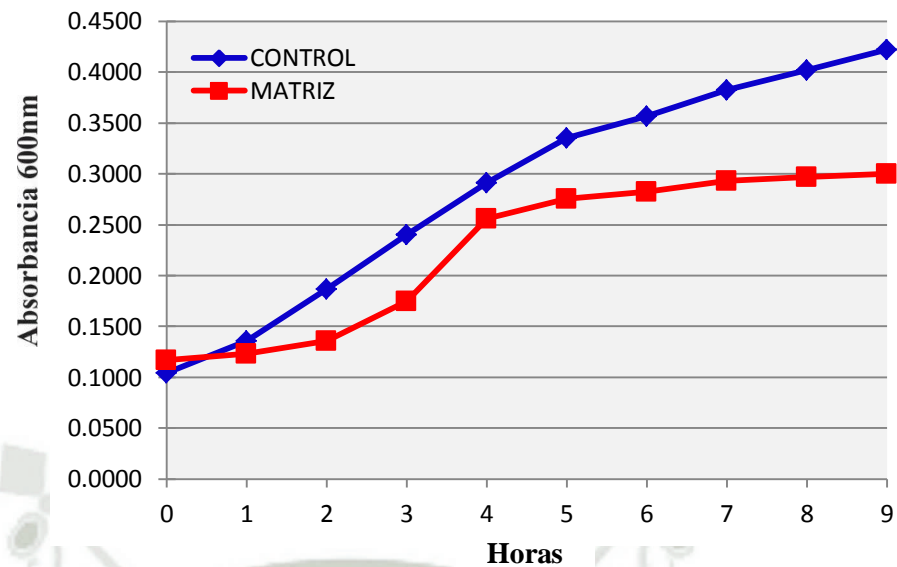
Así mismo, se observa que las concentraciones tienen un efecto significativo en la relación concentración tiempo, puesto que el valor crítico asociado al valor estadístico “p” es menor a 0.05 lo que indicaría que existen diferencias estadísticamente en la actividad antibacteriana entre las diferentes concentraciones.

Finalmente, para contrastar los resultados obtenidos, se realizó una comparación múltiple utilizando la prueba de Tukey. Para las interacciones entre matriz y las concentraciones 0.0017, 0.0030, 0.0035 mg/l no se observaron diferencias significativas en los tiempo de cero a dos horas; por el contrario, para las interacción matriz - 0.0040 mg/l si presentó un comportamiento significativo respecto al tiempo de exposición desde las cero hasta las nueve horas.

Tabla N° 6: ANOVA para determinar la diferencia en efecto antibacteriano entre las diferentes concentraciones de cobre frente a *Escherichia coli*.

GRUPO DE ESTUDIO		TIEMPO (horas)										P (ANOVA)
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
CONTROL (mm)	Media	0.1042	0.1357	0.1865	0.2400	0.2915	0.3350	0.3567	0.3822	0.4020	0.4222	<b>0.000</b> <i>(P &lt; 0.05)</i>
MATRIZ (mm)	Media	0.1172	0.1235	0.1355	0.1745	0.2562	0.2752	0.2822	0.2930	0.2972	0.3002	<b>0.000</b> <i>(P &lt; 0.05)</i>
0.0017 mg	Media	0.1140	0.1335	0.1425	0.1612	0.1812	0.1937	0.1927	0.1955	0.1985	0.2075	<b>0.000</b> <i>(P &lt; 0.05)</i>
0.0030 mg	Media	0.1166	0.1274	0.1345	0.1449	0.1632	0.1753	0.1869	0.1929	0.1937	0.1949	<b>0.000</b> <i>(P &lt; 0.05)</i>
0.0035 mg	Media	0.1171	0.1248	0.1252	0.1303	0.1433	0.1494	0.1536	0.1556	0.1642	0.1688	<b>0.000</b> <i>(P &lt; 0.05)</i>
0.0040 mg	Media	0.1075	0.1120	0.1175	0.1177	0.1195	0.1225	0.1227	0.1265	0.1317	0.1322	<b>0.000</b> <i>(P &lt; 0.05)</i>
Tukey	P <sub>(Control – Matriz)</sub>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
	P <sub>(Matriz – 0.0017)</sub>	0.474	0.759	0.184	<b>0.003</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
	P <sub>(Matriz – 0.0030)</sub>	0.999	0.420	0.999	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
	P <sub>(Matriz – 0.0035)</sub>	0.100	0.988	0.012	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
	P <sub>(Matriz – 0.0040)</sub>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	

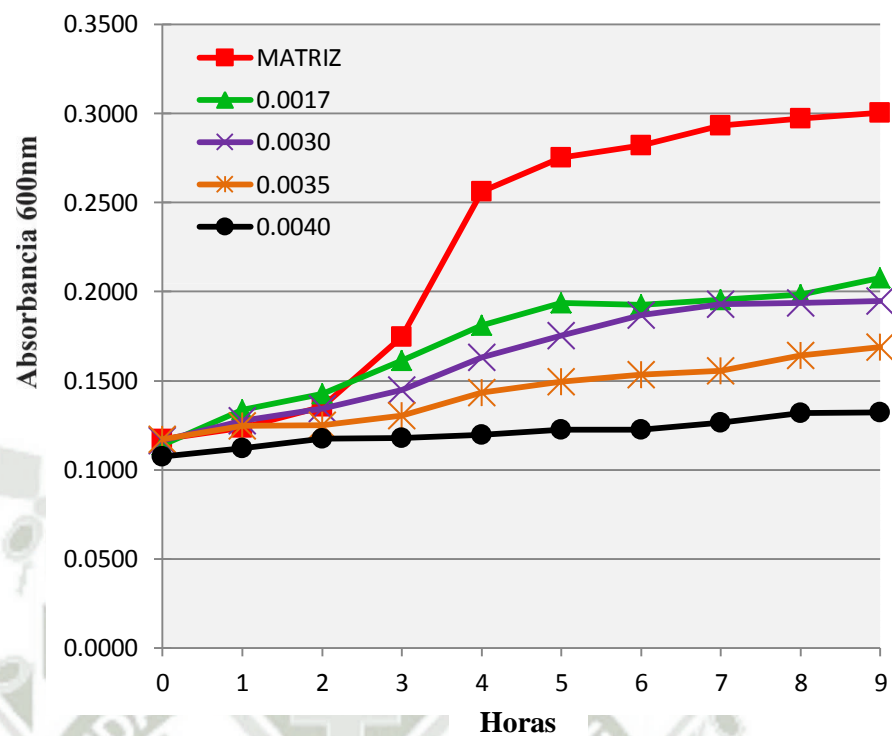
Fuente: Elaboración propia



**Gráfico N° 4: Curvas de crecimiento sobre el efecto bactericida del grupo Control vs Matriz según su tiempo de exposición frente a *Escherichia coli*.**

Fuente: Matriz de datos

En el gráfico N° 4 se puede apreciar la comparación del grupo Control vs Matriz, la cual nos indica una inhibición bacteriana significativa del grupo Matriz ante el grupo Control, así mismo se observó que el grupo Matriz tiene mayor eficacia como antibacteriano por la presencia de quitosano.



**Gráfico N° 5: Curvas de crecimiento sobre el efecto bactericida de las diferentes concentraciones de cobre vs la Matriz según su tiempo de exposición frente a *Escherichia coli*.**

Fuente: Matriz de datos

En el gráfico N° 5 se puede observar la inhibición en el crecimiento de *Escherichia coli* que se manifiesta prácticamente deteniendo su crecimiento durante las nueve horas de incubación; sin embargo se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.005$ ) entre la tercera y cuarta hora para las concentraciones de 0.0017, 0.0030 y 0.0035 mg/l de cobre. Así mismo se puede observar que la concentración de 0.0040 mg/l de cobre aumenta la inhibición sobre *Escherichia coli* a partir de la primera hora de la acción bactericida.

### 3.2 Resultados de *Enterococcus Faecalis* según grupos de estudio.

#### A. Ensayo de sensibilidad en medio sólido – Halo de inhibición.

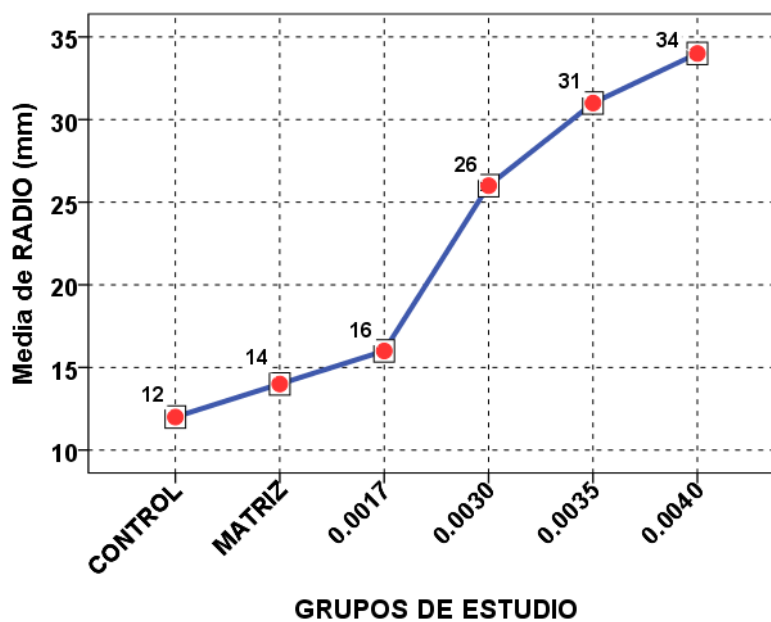
**Tabla N° 7: Promedio de los halos de inhibición de *Enterococcus faecalis* según grupos de estudio.**

		HALO DE INHIBICIÓN RADIO (mm)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	C. V. %
<b>CONTROL</b>		12	0.667	5.56
<b>MATRIZ</b>		14	0.667	4.76
<b>Concentraciones de cobre (mg)</b>	<b>0.0017</b>	16	0.667	4.17
	<b>0.0030</b>	26	0.667	2.57
	<b>0.0035</b>	31	0.667	2.15
	<b>0.0040</b>	34	0.667	1.96

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 7, se resume el promedio (en milímetros), la desviación estándar y el coeficiente de variación (en porcentaje) de las diez placas evaluadas que corresponden al Control, Matriz y a las diferentes concentraciones de cobre (0.0017, 0.0030, 0.0035, 0.0040 mg/l); donde resalta la concentración de 0.0040 mg/l de cobre, por tener un valor elevado de halo de inhibición de 34mm formado frente a *Enterococcus Faecalis* fue de 34 mm y un coeficiente de variación de 1.96%, en comparación con los demás; reportándonos que a esta concentración se obtuvo una mayor inhibición. Dichas mediciones están descritas en el Anexo N° 4.

**Gráfico N° 6: Comparación del efecto antibacteriano de las microesferas híbridas a diferentes concentraciones de cobre frente a *Enterococcus Faecalis* según sus halos de inhibición.**



Fuente: Elaboración propia

El gráfico N° 6 permite visualizar el comportamiento descrito anteriormente, es decir se observa que con el grupo de Control se logra un menor halo de inhibición en promedio, y se va incrementando con el grupo Matriz, y con el incremento de los grupos con mayor concentración de cobre.

**Tabla N° 8: Comparación de los halos de inhibición de *Enterococcus faecalis* según grupos de estudio.**

ANOVA (ANÁLISIS DE VARIANZA)					
Variable dependiente: RADIO (mm)					
FUENTE DE VARIACIÓN	Suma de cuadrados	Gl (Grados de libertad)	Media cuadrática	F	Sig. (p-valor)
<b>Entre grupos (GRUPOS DE ESTUDIO)</b>	4408.333	5	881.667	1983.8	0.000
<b>Dentro de grupos (ERROR)</b>	24.000	54	0.444		
<b>Total</b>	4432.333	59			

Fuente: Elaboración propia

El cuadro anterior de análisis de varianza - ANOVA (Tabla N° 8) indican que existen diferencias significativas en la comparación de los halos de inhibición de los seis grupos de estudio (Control, Matriz, concentración al 0.0017, 0.0030, 0.0035, 0.0040) al obtener un (p-valor) menor a 0.05.

**Tabla N° 9: Prueba de Homogeneidad de varianzas de los halos de inhibición de *Enterococcus faecalis* según grupos de estudio.**

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Variables dependientes: RADIO (mm)			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
.000	5	54	1.000

Fuente: Elaboración propia

Se puede observar según la prueba de Levene (Tabla N° 9), como el p- valor ( $1,000 > 0.05$ ) entonces se puede asumir la igualdad de varianzas en los seis grupos de estudio con respecto a los diámetros de los halos de inhibición, esto implica que podemos aplicar la prueba posterior de Tukey.

**Tabla N° 10: Comparación Múltiple de los diferentes grupos de estudio de *Enterococcus faecalis*.**

COMPARACIONES MÚLTIPLES VARIABLE DEPENDIENTE: RADIO (mm) PRUEBA: HSD TUKEY		
(I) Grupos de estudio	(J) Grupos de estudio	Sig.
<b>matriz</b>	<b>control</b>	0.000
	0.0017	0.000
	0.0030	0.000
	0.0035	0.000
	0.0040	0.000
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05		

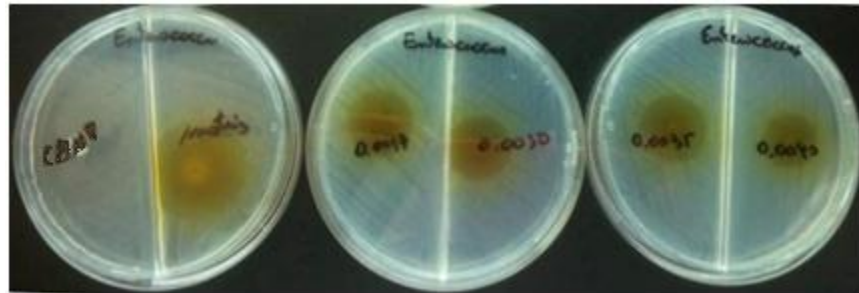
Fuente: Elaboración propia

**Tabla N° 11: Prueba Tukey con respecto a los promedios de los grupos de estudio de *Enterococcus faecalis*.**

RADIO (mm)							
Prueba: HSD Tukey							
GRUPOS DE ESTUDIO	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
CONTROL	10	12.00					
MATRIZ	10		14.00				
0.0017	10			16.00			
0.0030	10				26.00		
0.0035	10					31.00	
0.0040	10						34.00
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.							

Fuente: Elaboración propia

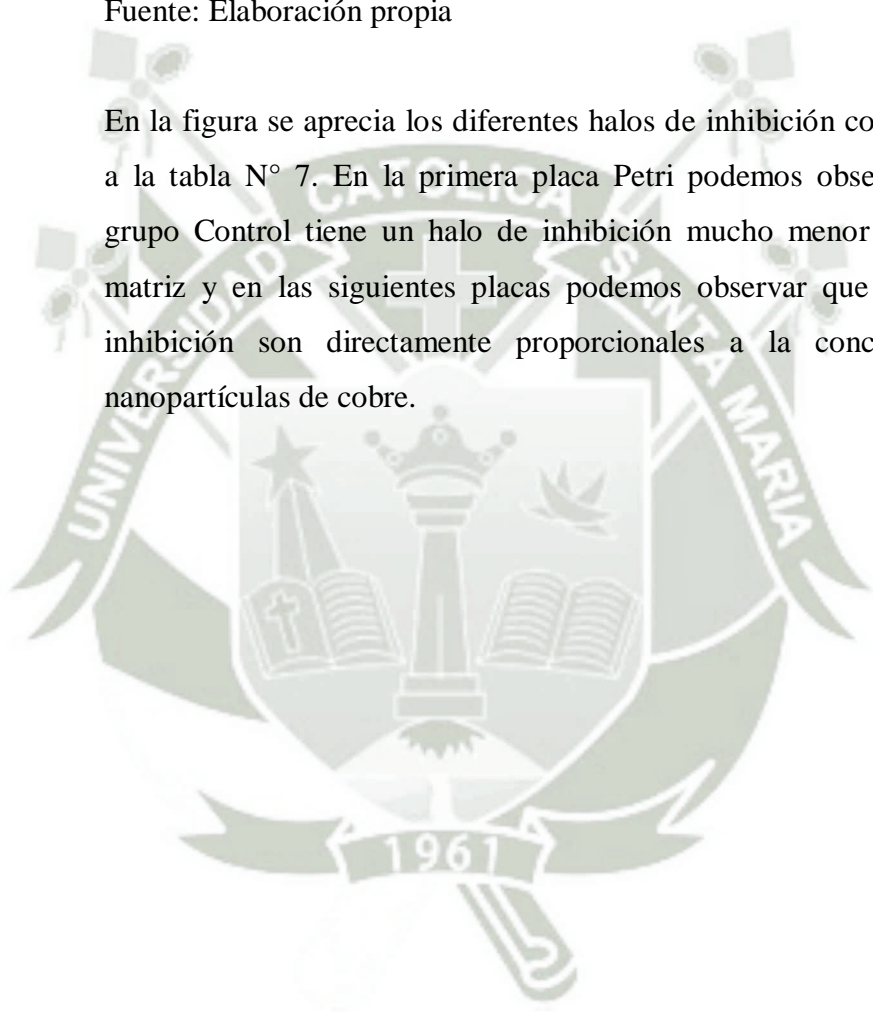
El procedimiento de Tukey, según las tablas N° 10 y N° 11 nos muestran que todos los grupos son significativamente distinto (p-valor 0.000) entre todos los halos de inhibición de los seis grupos de estudio (Control, Matriz, concentración al 0.0017, 0.0030, 0.0035, 0.0040), observándose también como todos los promedios son diferentes significativos entre sí. Infiriéndose así que a mayor concentración de cobre (0.0040 mg) tendrá un mayor halo de inhibición.



**Figura N° 9. Ensayo de sensibilidad para *Enterococcus faecalis* con microesferas a distinta concentración de nanopartículas de cobre.**

Fuente: Elaboración propia

En la figura se aprecia los diferentes halos de inhibición correspondiente a la tabla N° 7. En la primera placa Petri podemos observar como el grupo Control tiene un halo de inhibición mucho menor que el de la matriz y en las siguientes placas podemos observar que los halos de inhibición son directamente proporcionales a la concentración de nanopartículas de cobre.



**B. Ensayo de sensibilidad en medio líquido – Curva de Crecimiento.**

La tabla N° 12 se presentan los resultados de ANOVA para los diferentes tiempos de exposición, observándose que todos los valores críticos presentan un valor de 0.000, lo cual nos indica que si existe una diferencia estadísticamente significativa a partir de la sexta hora, acentuándose a la séptima hora.

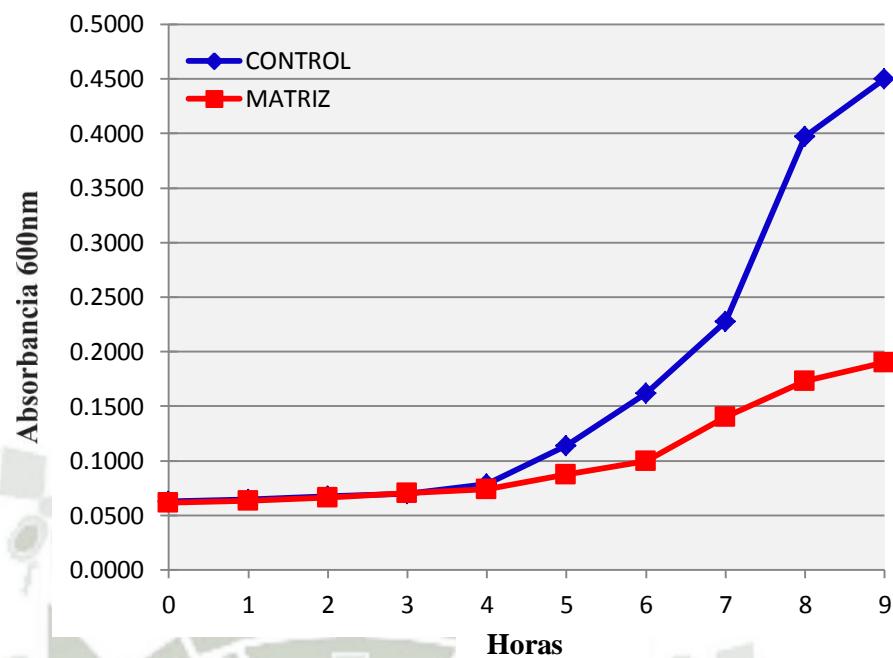
Así mismo, se observa que las concentraciones tienen un efecto significativo en la relación concentración tiempo, puesto que el valor crítico asociado al valor estadístico “p” es menor a 0.05 lo que indicaría que existen diferencias estadísticamente en la actividad antibacteriana entre las diferentes concentraciones.

Finalmente, para contrastar los resultados obtenidos, se realizó una comparación múltiple utilizando la prueba de Tukey. Para las interacciones entre Matriz - las concentraciones 0.0017, 0.0030, 0.0035 mg/l no se observaron diferencias significativas desde las cero hasta la sexta hora; por el contrario, para las interacción matriz - 0.0040 mg/l si presentó un comportamiento significativo respecto al tiempo de exposición desde la quinta hasta las nueve horas.

**Tabla N° 12: ANOVA para determinar la diferencia en efecto antibacteriano entre las diferentes concentraciones de cobre frente a *Enterococcus faecalis*.**

GRUPO DE ESTUDIO		TIEMPO (horas)										P (ANOVA)
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<b>CONTROL (mm)</b>	Media	0.0627	0.0645	0.0677	0.0702	0.0785	0.1137	0.1622	0.2275	0.3970	0.4502	<b>0.000 (P &lt; 0.05)</b>
<b>MATRIZ (mm)</b>	Media	0.0615	0.0632	0.0667	0.0705	0.0740	0.0875	0.1000	0.1402	0.1732	0.1902	<b>0.000 (P &lt; 0.05)</b>
<b>0.0017 mg</b>	Media	0.0610	0.0627	0.0657	0.0695	0.0732	0.0842	0.0942	0.1302	0.1532	0.1582	<b>0.000 (P &lt; 0.05)</b>
<b>0.0030 mg</b>	Media	0.0597	0.0620	0.0655	0.0702	0.0722	0.0785	0.0895	0.1125	0.1242	0.1355	<b>0.000 (P &lt; 0.05)</b>
<b>0.0035 mg</b>	Media	0.0577	0.0607	0.0655	0.0685	0.0705	0.0745	0.0822	0.1060	0.1165	0.1197	<b>0.000 (P &lt; 0.05)</b>
<b>0.0040 mg</b>	Media	0.0582	0.0612	0.0645	0.0677	0.0705	0.0732	0.0795	0.0915	0.0912	0.1055	<b>0.000 (P &lt; 0.05)</b>
<b>Tukey</b>	P <sub>(Control – Matriz)</sub>	0.564	0.321	0.489	0.996	0.154	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
	P <sub>(Matriz – 0.0017)</sub>	0.691	0.590	0.489	0.329	0.213	0.098	0.059	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
	P <sub>(Matriz – 0.0030)</sub>	0.179	0.419	0.205	0.507	0.626	<b>0.036</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
	P <sub>(Matriz – 0.0035)</sub>	0.109	0.120	0.211	0.094	0.114	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
	P <sub>(Matriz – 0.0040)</sub>	0.234	0.199	0.187	0.068	0.119	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	

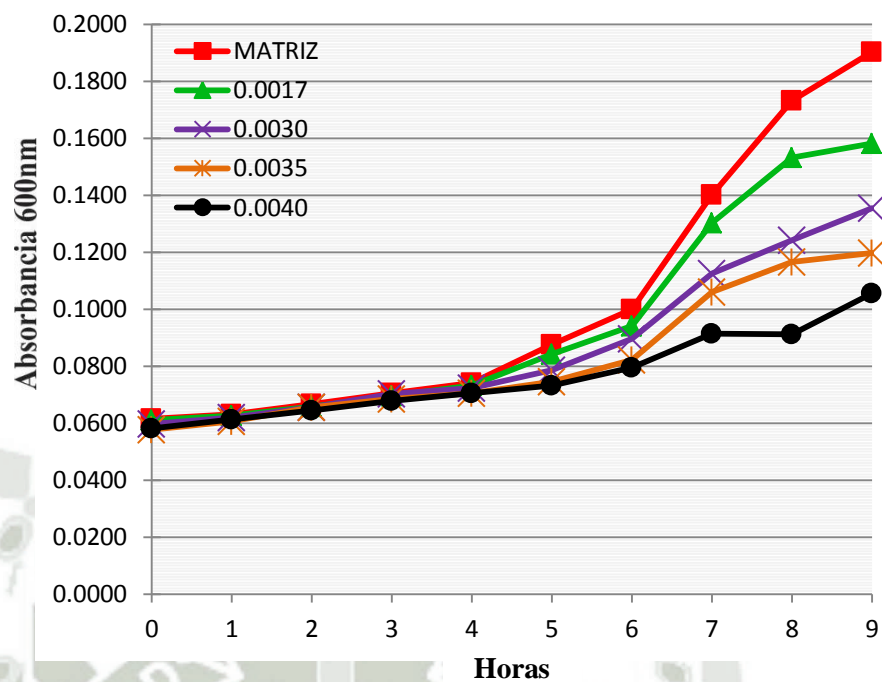
Fuente: Elaboración propia



**Gráfico N° 7: Curvas de crecimiento sobre el efecto bactericida del grupo Control vs Matriz según su tiempo de exposición frente a *Enterococcus faecalis*.**

Fuente: Matriz de datos

En el gráfico N° 7 se puede apreciar la comparación del grupo control vs matriz, la cual nos indica una inhibición bacteriana significativa del grupo Matriz ante el grupo Control, así mismo se observó que el grupo matriz tiene mayor eficacia como antibacteriano por la presencia de quitosano.



**Gráfico N° 8: Curvas de crecimiento sobre el efecto bactericida de las diferentes concentraciones de cobre vs la Matriz según su tiempo de exposición frente a *Enterococcus Faecalis*.**

Fuente: Matriz de datos

En el gráfico N° 8 se puede observar la inhibición en el crecimiento de *Enterococcus Faecalis* que se manifiesta prácticamente deteniendo su crecimiento durante las nueve horas de incubación; sin embargo se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.005$ ) entre la sexta hora para las concentraciones, 0.0030 y 0.0035 mg/l de cobre, y ya todos se igualan a la séptima hora.



# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## CONCLUSIONES

**PRIMERA:** El método de poliol nos permitió reducir completamente el  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^0$  para de esta manera obtener cobre permitiéndonos ejercer su acción antibacterial.

**SEGUNDA:** La presencia de cobre es indispensable para ejercer el efecto antibacterial sobre *Escherichia coli* y *Enterococcus Faecalis*.

**TERCERA:** La matriz híbrida con cobre ejerce una mayor actividad bactericida con respecto a *Escherichia coli* y bacteriostática sobre *Enterococcus Faecalis* en comparación a la matriz (sin presencia de cobre), siendo estas diferencias estadísticamente significativas demostradas con la prueba estadística: Análisis de Varianza ANOVA.

**CUARTA:** La concentración inhibitoria mínima de Cu fue 0.017 ug/ml y la concentración mínima bactericida de Cu fue de 0.040 ug/ml.

### RECOMENDACIONES

1. Para reducir completamente el  $\text{Cu}^{+2}$  para obtener  $\text{Cu}^0$  es importante controlar la velocidad de agitación, la temperatura en el proceso de reflujo y el exceso de nitrógeno.
2. No es posible formar una microesfera si se excede el límite de concentración de Cu.
3. El exceso de concentración de Cu en la matriz híbrida no permita que ejerza su efecto antibacterial.
4. Es importante asegurar la inocuidad del proceso para evitar el crecimiento involuntario de los patógenos en dicho estudio.

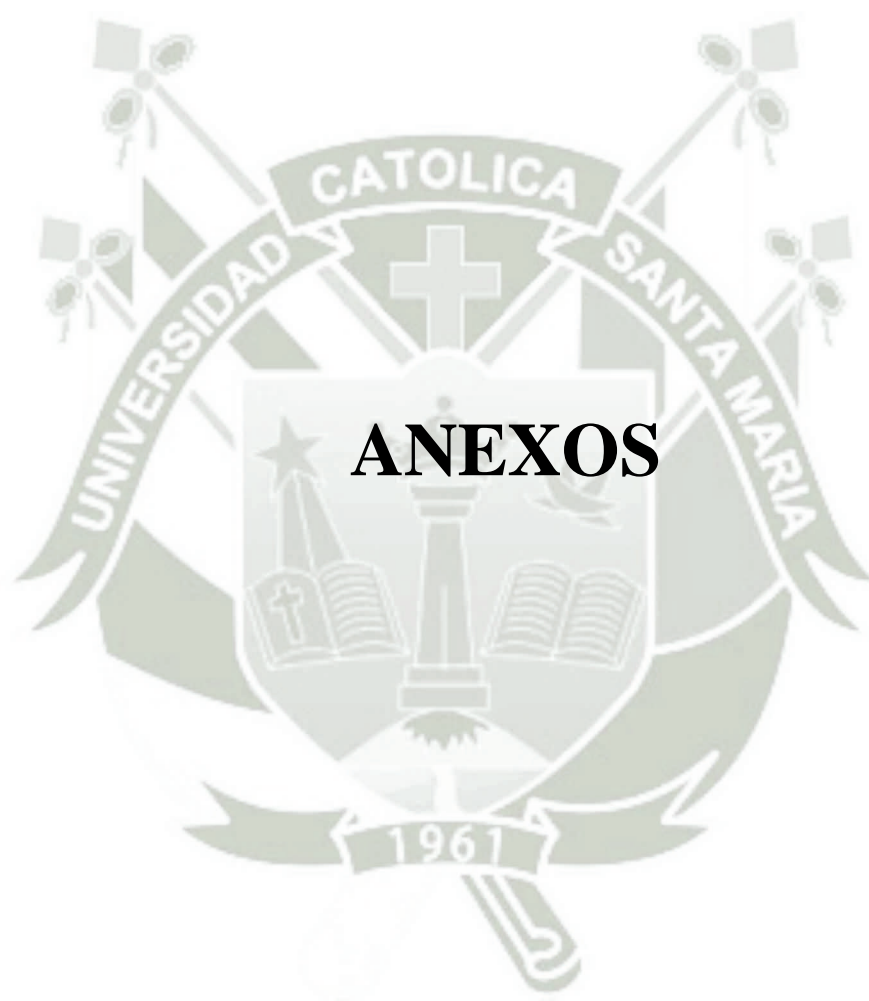
## BIBLIOGRAFÍA

1. Colegio de Ingenieros Agrónomos de Chile, (2014 Setiembre), Fabrican en Chile súper materiales con nanopartículas de cobre y celulosa, Recuperado de <http://ingenierosagronomos.cl/pcomciac/archives/4293>.
2. **GARCÍA CHÁVEZ** Ricardo y Mendoza Martínez Ana María, (2010 marzo), los polímeros sintetizados son tres biopolímeros: gelatina/quitosan/dextran, Revista Iberoamericana de Polímeros, Volumen 11 (2).
3. **GORDON AS**, Howell Ld, Harwood V,(1994 Febrero 18), Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations, Department of Biology and Chemistry - Liberty University.
4. **GUEVARA D.** José, Guevara G. Juan, Valencia Esther, Alcalá Hércules, Guevara G. José, (1997), Enterococcus en la Rutina del Trabajo Microbiológico, Revistas de investigación UNMSM, Vol. (58, Núm. 4).
5. **GUTIÉRREZ WING** Claudia E., (2004), Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial: ¿Por qué el interés en los materiales? ¿Qué aplicaciones tienen?, El ININ hoy – Contacto nuclear (24 – 29).
6. **LANGE** Ignacio (2010 Septiembre), Estudio sobre la conservación térmica de la carne fresca y la leche ultrapasteurizada en supermercados y almacenes ubicados en Capital Federal y Gran Buenos Aires, Universidad de Belgrano – Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Licenciatura en Tecnología de Alimentos.
7. **LECHUGA** Laura M., (2011 mayo), Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud, Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología (CIN2). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Grupo de Nanobiosensores y Aplicaciones Bioanalíticas., (9a edición del curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana).
8. **LOPRETTI** Mary, Barriero Filomena, Fernandes Isabel, Damboriarena Agustín, Ottati Carolina, Olivera Alvaro, (2007), Microencapsulación de compuestos de actividad biológica, Revista del laboratorio tecnológico de Uruguay – INNOTECH, Edición (2).
9. **MAJETI** N.V. Kumar Ravi (2000) A review of chitin and chitosan applications, Reactive & Functional Polymers 46:1–27.

10. **PALAVECINO ROSALES** Elizabeth, (1997), Interpretación de los estudios de Susceptibilidad antimicrobiana, Boletín de la escuela de Medicina – Pontificia Universidad Católica de Chile, Volumen (26), No.3.
11. **PAREDES GUERRERO** Daysi, (2011 Noviembre), Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre *Escherichia coli* y staphylococcus aureus.
12. **PICAZO** Juan J, (2000), Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, Procedimientos en Microbiología Clínica, Volumen (11).
13. **PRADO** J Valeria, Vidal A Roberto, Durán T Claudia, (2012 Setiembre 4), Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica, Revista médica de Chile, volumen 140 no.10.
14. **PRADO J.** Valeria, Vidal A. Roberto, Durán T. Claudia, (2012 Octubre), Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica, Programa de Microbiología, Instituto de Ciencias.
15. **QUARANTA D, KRANS T, Espirito Santo C, Elowsky C G, Domaille Dw, Chang Cj, Grass G.** Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. Appl Environ Microbiol 2011; 77: 416-26.
16. **RAMOS PICOS** Diana, Gómez Carril Martha y Fernández Mena Dianelis, (2001,31 de Enero), Métodos de obtención de microesferas biodegradables, Revista Cubana de Farmacia, volumen 35 n.2 Ciudad de la Habana.
17. **RODRÍGUEZ ANGELES** Guadalupe, (2002), Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*, Salud Pública de México, volumen.44 no.5 Cuernavaca.
18. Sociedad Catalana de Farmacia Clínica, (2003 setiembre), Solución de Glutaraldehído, Recuperado de: <http://www.scfarmclin.org/docs/higiene/part4/4332.pdf>.
19. **VALENCIA E., Lopez Z., González G.,**(2006;2009), Síntesis y Caracterización de Nanopartículas con Potenciales Usos Medicinales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile. 2 Centro para el Desarrollo de Nanociencia y Nanotecnología CEDENNA, Santiago Chile.

20. **VÁSCONEZ CABEZAS** Paulina Alexandra. 2005. Optimización de la gestión de procesos productivos de Gelatinas Ecuatorianas GELEC S.A. Memoria de Ingeniero Industrial. Ambato: Universidad técnica de Ambato. 229p.





**ANEXO N° 1: Halo de Inhibición de *Escherichia Coli* según grupos de estudio**

<b>EXPERIMENTOS</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
		<b>Radio (mm)</b>	<b>Radio (mm)</b>	<b>Radio (mm)</b>	<b>Radio (mm)</b>	<b>Radio (mm)</b>	<b>Radio (mm)</b>	<b>Radio (mm)</b>	<b>Radio (mm)</b>	<b>Radio (mm)</b>	<b>Radio (mm)</b>
<b>CONTROL</b>		9	10	10	11	10	10	11	10	9	10
<b>MATRIZ</b>		13	14	14	15	14	14	15	14	13	14
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	19	20	20	21	20	20	21	20	19	20
	<b>0.0030</b>	31	32	32	33	32	32	33	32	31	32
	<b>0.0035</b>	34	35	35	36	35	35	36	35	34	35
	<b>0.0040</b>	36	37	37	38	37	37	38	37	36	37

**ANEXO N° 2: Cuadro de crecimiento de *Escherichia coli* según grupos de estudios de la Matriz**

GRUPO DE ESTUDIO		TIEMPO (horas)									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>CONTROL (mm)</b>	Media	<b>0.1042</b>	<b>0.1357</b>	<b>0.1865</b>	<b>0.2400</b>	<b>0.2915</b>	<b>0.3350</b>	<b>0.3567</b>	<b>0.3822</b>	<b>0.4020</b>	<b>0.4222</b>
	D.E.*	0.0070	0.0071	0.0117	0.0042	0.0065	0.0037	0.0041	0.0036	0.0030	0.0023
<b>MATRIZ (mm)</b>	Media	<b>0.1172</b>	<b>0.1235</b>	<b>0.1355</b>	<b>0.1745</b>	<b>0.2562</b>	<b>0.2752</b>	<b>0.2822</b>	<b>0.2930</b>	<b>0.2972</b>	<b>0.3002</b>
	D.E.*	0.0046	0.0054	0.0074	0.0038	0.0064	0.0036	0.0052	0.0050	0.0066	0.0046
<b>0.0017 (mg)</b>	Media	<b>0.1140</b>	<b>0.1335</b>	<b>0.1425</b>	<b>0.1612</b>	<b>0.1812</b>	<b>0.1937</b>	<b>0.1927</b>	<b>0.1955</b>	<b>0.1985</b>	<b>0.2075</b>
	D.E.*	0.0029	0.0032	0.0036	0.0028	0.0036	0.0019	0.0014	0.0025	0.0025	0.0032
<b>0.0030 (mg)</b>	Media	<b>0.1166</b>	<b>0.1274</b>	<b>0.1345</b>	<b>0.1449</b>	<b>0.1632</b>	<b>0.1753</b>	<b>0.1869</b>	<b>0.1929</b>	<b>0.1937</b>	<b>0.1949</b>
	D.E.*	0.0015	0.0039	0.0059	0.0071	0.0095	0.0117	0.0143	0.0156	0.0134	0.0121
<b>0.0035 (mg)</b>	Media	<b>0.1171</b>	<b>0.1248</b>	<b>0.1252</b>	<b>0.1303</b>	<b>0.1433</b>	<b>0.1494</b>	<b>0.1536</b>	<b>0.1556</b>	<b>0.1642</b>	<b>0.1688</b>
	D.E.*	0.0021	0.0039	0.0040	0.0055	0.0067	0.0086	0.0123	0.0140	0.0116	0.0105
<b>0.0040 (mg)</b>	Media	<b>0.1075</b>	<b>0.1120</b>	<b>0.1175</b>	<b>0.1177</b>	<b>0.1195</b>	<b>0.1225</b>	<b>0.1227</b>	<b>0.1265</b>	<b>0.1317</b>	<b>0.1322</b>
	D.E.*	0.0031	0.0028	0.0025	0.0021	0.0018	0.0024	0.0019	0.0039	0.0038	0.0035

### ANEXO N° 3: Curvas de crecimiento de *Escherichia Coli*

#### Experimento 1:

HORAS		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CONTROL (mm)		0.094	0.125	0.171	0.233	0.282	0.329	0.350	0.376	0.397	0.418
MATRIZ (mm)		0.110	0.115	0.126	0.168	0.247	0.269	0.274	0.286	0.288	0.293
Concentraciones (mg)	0.0017	0.109	0.128	0.137	0.156	0.175	0.190	0.190	0.191	0.194	0.202
	0.0030	0.114	0.123	0.130	0.142	0.159	0.171	0.186	0.193	0.194	0.195
	0.0035	0.113	0.117	0.118	0.124	0.136	0.142	0.145	0.147	0.154	0.159
	0.0040	0.102	0.107	0.113	0.114	0.116	0.118	0.119	0.120	0.125	0.126

**Experimento 2:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.096	0.127	0.173	0.235	0.284	0.331	0.352	0.378	0.399	0.420
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.112	0.117	0.128	0.170	0.249	0.271	0.276	0.288	0.290	0.295
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.111	0.130	0.139	0.158	0.177	0.192	0.192	0.193	0.196	0.204
	<b>0.0030</b>	0.115	0.119	0.120	0.126	0.138	0.144	0.147	0.149	0.156	0.161
	<b>0.0035</b>	0.116	0.125	0.132	0.144	0.161	0.173	0.188	0.195	0.196	0.197
	<b>0.0040</b>	0.104	0.109	0.115	0.116	0.118	0.120	0.121	0.122	0.127	0.128



### Experimento 3:

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.097	0.128	0.174	0.236	0.285	0.332	0.353	0.379	0.400	0.421
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.113	0.118	0.129	0.171	0.250	0.272	0.277	0.289	0.291	0.296
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.112	0.131	0.140	0.159	0.178	0.193	0.193	0.194	0.197	0.205
	<b>0.0030</b>	0.117	0.126	0.133	0.145	0.162	0.174	0.189	0.196	0.197	0.198
	<b>0.0035</b>	0.116	0.120	0.121	0.127	0.139	0.145	0.148	0.150	0.157	0.162
	<b>0.0040</b>	0.105	0.110	0.116	0.117	0.119	0.121	0.122	0.123	0.128	0.129

#### Experimento 4:

HORAS		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CONTROL (mm)		0.101	0.134	0.180	0.239	0.288	0.333	0.355	0.382	0.400	0.421
MATRIZ (mm)		0.115	0.122	0.131	0.174	0.253	0.276	0.280	0.290	0.297	0.298
Concentraciones (mg)	0.0017	0.113	0.132	0.140	0.161	0.182	0.193	0.192	0.194	0.197	0.206
	0.0030	0.116	0.127	0.136	0.145	0.165	0.177	0.190	0.196	0.197	0.197
	0.0035	0.116	0.123	0.123	0.126	0.141	0.145	0.149	0.150	0.160	0.164
	0.0040	0.107	0.111	0.116	0.116	0.119	0.122	0.123	0.125	0.132	0.132



**Experimento 5:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.103	0.136	0.182	0.241	0.290	0.335	0.357	0.384	0.402	0.423
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.117	0.124	0.133	0.176	0.255	0.278	0.282	0.292	0.299	0.300
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.115	0.134	0.142	0.163	0.184	0.195	0.194	0.196	0.199	0.208
	<b>0.0030</b>	0.118	0.129	0.138	0.147	0.167	0.179	0.192	0.198	0.199	0.199
	<b>0.0035</b>	0.118	0.125	0.125	0.128	0.143	0.147	0.151	0.152	0.162	0.166
	<b>0.0040</b>	0.109	0.113	0.118	0.118	0.121	0.124	0.125	0.127	0.134	0.134



**Experimento 6:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.107	0.138	0.194	0.242	0.296	0.337	0.359	0.382	0.403	0.424
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.119	0.126	0.136	0.176	0.258	0.277	0.285	0.293	0.305	0.304
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.116	0.135	0.143	0.162	0.183	0.194	0.193	0.197	0.199	0.209
	<b>0.0030</b>	0.117	0.129	0.137	0.148	0.167	0.181	0.193	0.198	0.198	0.199
	<b>0.0035</b>	0.118	0.127	0.126	0.129	0.141	0.148	0.151	0.152	0.161	0.166
	<b>0.0040</b>	0.108	0.113	0.119	0.118	0.120	0.123	0.123	0.129	0.133	0.134



### Experimento 7:

HORAS		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CONTROL (mm)		0.108	0.139	0.195	0.243	0.297	0.338	0.360	0.383	0.404	0.425
MATRIZ (mm)		0.120	0.127	0.137	0.177	0.259	0.278	0.286	0.294	0.306	0.305
Concentraciones (mg)	0.0017	0.117	0.136	0.144	0.163	0.184	0.195	0.194	0.198	0.200	0.210
	0.0030	0.118	0.130	0.138	0.149	0.168	0.182	0.194	0.199	0.199	0.200
	0.0035	0.119	0.128	0.127	0.130	0.142	0.149	0.152	0.153	0.162	0.167
	0.0040	0.109	0.114	0.120	0.119	0.121	0.124	0.124	0.130	0.134	0.135



**Experimento 8:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.110	0.141	0.196	0.241	0.295	0.336	0.358	0.384	0.403	0.421
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.120	0.126	0.144	0.175	0.262	0.274	0.285	0.298	0.294	0.301
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.113	0.134	0.145	0.161	0.180	0.193	0.191	0.195	0.199	0.208
	<b>0.0030</b>	0.115	0.128	0.135	0.147	0.166	0.179	0.190	0.198	0.197	0.198
	<b>0.0035</b>	0.116	0.125	0.124	0.130	0.141	0.146	0.148	0.150	0.161	0.167
	<b>0.0040</b>	0.108	0.112	0.117	0.118	0.118	0.122	0.121	0.127	0.132	0.132



**Experimento 9:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.113	0.144	0.199	0.244	0.298	0.339	0.361	0.387	0.406	0.424
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.123	0.129	0.147	0.178	0.265	0.277	0.288	0.301	0.297	0.304
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.116	0.137	0.148	0.164	0.183	0.196	0.194	0.198	0.202	0.211
	<b>0.0030</b>	0.118	0.131	0.138	0.150	0.169	0.182	0.193	0.201	0.200	0.201
	<b>0.0035</b>	0.119	0.128	0.127	0.133	0.144	0.149	0.151	0.153	0.164	0.170
	<b>0.0040</b>	0.111	0.115	0.120	0.121	0.121	0.125	0.124	0.130	0.135	0.135



**Experimento 10:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.113	0.145	0.201	0.246	0.300	0.340	0.362	0.387	0.406	0.425
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.123	0.131	0.144	0.180	0.264	0.280	0.289	0.299	0.305	0.306
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.118	0.138	0.147	0.165	0.186	0.196	0.194	0.199	0.202	0.212
	<b>0.0030</b>	0.118	0.132	0.140	0.150	0.171	0.184	0.195	0.201	0.200	0.201
	<b>0.0035</b>	0.120	0.130	0.129	0.132	0.145	0.150	0.153	0.154	0.165	0.170
	<b>0.0040</b>	0.112	0.116	0.121	0.120	0.122	0.126	0.125	0.132	0.137	0.137



**ANEXO N° 4: Halo de Inhibición de *Enterococcus faecalis* según grupos de estudio**

EXPERIMENTOS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Radio (mm)	Radio (mm)	Radio (mm)	Radio (mm)	Radio (mm)	Radio (mm)	Radio (mm)	Radio (mm)	Radio (mm)	Radio (mm)
CONTROL		11	12	12	13	12	12	13	12	11	12
MATRIZ		13	14	14	15	14	14	15	14	13	14
Concentraciones (mg)	0.0017	15	16	16	17	16	16	17	16	15	16
	0.0030	25	26	26	27	26	26	27	26	25	26
	0.0035	30	31	31	32	31	31	32	31	30	31
	0.0040	34	34	35	34	34	35	34	33	34	37

**ANEXO N° 5: Cuadro de crecimiento de *Enterococcus faecalis* según grupos de estudios de la Matriz**

GRUPO DE ESTUDIO		TIEMPO (horas)									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>CONTROL (mm)</b>	Media	<b>0.0627</b>	<b>0.0645</b>	<b>0.0677</b>	<b>0.0702</b>	<b>0.0785</b>	<b>0.1137</b>	<b>0.1622</b>	<b>0.2275</b>	<b>0.3970</b>	<b>0.4502</b>
	D.E.*	0.0019	0.0024	0.0014	0.0018	0.0076	0.0032	0.0057	0.0088	0.0121	0.0091
<b>MATRIZ (mm)</b>	Media	<b>0.0615</b>	<b>0.0632</b>	<b>0.0667</b>	<b>0.0705</b>	<b>0.074</b>	<b>0.0875</b>	<b>0.100</b>	<b>0.1402</b>	<b>0.1732</b>	<b>0.1902</b>
	D.E.*	0.0018	0.0017	0.0036	0.0043	0.0031	0.0066	0.0068	0.0127	0.0064	0.0091
<b>0.0017 (mg)</b>	Media	<b>0.0610</b>	<b>0.0627</b>	<b>0.0657</b>	<b>0.0695</b>	<b>0.0732</b>	<b>0.0842</b>	<b>0.0942</b>	<b>0.1302</b>	<b>0.1532</b>	<b>0.1582</b>
	D.E.*	0.0020	0.0019	0.0021	0.0036	0.0030	0.0040	0.0064	0.0071	0.0091	0.0084
<b>0.0030 (mg)</b>	Media	<b>0.0597</b>	<b>0.0620</b>	<b>0.0655</b>	<b>0.0702</b>	<b>0.0722</b>	<b>0.0785</b>	<b>0.0895</b>	<b>0.1125</b>	<b>0.1242</b>	<b>0.1355</b>
	D.E.*	0.0019	0.0022	0.0025	0.0022	0.0023	0.0051	0.0050	0.0081	0.0051	0.0059
<b>0.0035 (mg)</b>	Media	<b>0.0577</b>	<b>0.0607</b>	<b>0.0655</b>	<b>0.0685</b>	<b>0.0705</b>	<b>0.0745</b>	<b>0.0822</b>	<b>0.1060</b>	<b>0.1165</b>	<b>0.1197</b>
	D.E.*	0.0019	0.0020	0.0025	0.0018	0.0024	0.0025	0.0053	0.0068	0.0024	0.0035
<b>0.0040 (mg)</b>	Media	<b>0.0582</b>	<b>0.0612</b>	<b>0.0645</b>	<b>0.0677</b>	<b>0.0705</b>	<b>0.0732</b>	<b>0.0795</b>	<b>0.0915</b>	<b>0.0912</b>	<b>0.1055</b>
	D.E.*	0.0016	0.0022	0.0025	0.0025	0.0023	0.0024	0.0034	0.0015	0.0018	0.0027

**ANEXO N° 6: Curva de crecimiento de *Enterococcus faecalis***

**Experimento 1:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.059	0.060	0.065	0.067	0.070	0.108	0.154	0.215	0.385	0.437
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.058	0.060	0.061	0.064	0.069	0.079	0.092	0.123	0.164	0.177
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.057	0.059	0.062	0.064	0.068	0.077	0.085	0.119	0.140	0.145
	<b>0.0030</b>	0.056	0.058	0.061	0.066	0.068	0.071	0.082	0.100	0.117	0.127
	<b>0.0035</b>	0.054	0.057	0.061	0.065	0.066	0.070	0.075	0.096	0.112	0.114
	<b>0.0040</b>	0.055	0.057	0.060	0.063	0.066	0.069	0.074	0.089	0.088	0.101

**Experimento 2:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.061	0.062	0.067	0.069	0.072	0.110	0.156	0.217	0.387	0.439
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.060	0.062	0.063	0.066	0.071	0.081	0.094	0.125	0.166	0.179
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.059	0.061	0.064	0.066	0.070	0.079	0.087	0.121	0.140	0.147
	<b>0.0030</b>	0.058	0.060	0.063	0.068	0.070	0.073	0.084	0.102	0.119	0.129
	<b>0.0035</b>	0.056	0.059	0.063	0.067	0.068	0.072	0.077	0.098	0.114	0.116
	<b>0.0040</b>	0.057	0.059	0.062	0.065	0.068	0.071	0.076	0.091	0.090	0.103

**Experimento 3:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.062	0.063	0.068	0.070	0.072	0.111	0.157	0.218	0.387	0.440
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.061	0.063	0.064	0.067	0.072	0.082	0.094	0.126	0.167	0.180
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.060	0.062	0.065	0.067	0.071	0.080	0.088	0.122	0.141	0.148
	<b>0.0030</b>	0.059	0.061	0.064	0.069	0.071	0.074	0.085	0.103	0.120	0.130
	<b>0.0035</b>	0.057	0.060	0.064	0.068	0.069	0.073	0.078	0.099	0.115	0.117
	<b>0.0040</b>	0.058	0.060	0.063	0.066	0.069	0.072	0.077	0.092	0.091	0.104

**Experimento 4:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.063	0.064	0.067	0.070	0.075	0.113	0.159	0.224	0.389	0.447
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.061	0.062	0.065	0.068	0.072	0.083	0.095	0.134	0.170	0.188
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.061	0.062	0.064	0.067	0.073	0.084	0.091	0.129	0.155	0.159
	<b>0.0030</b>	0.059	0.061	0.065	0.070	0.071	0.076	0.088	0.111	0.122	0.133
	<b>0.0035</b>	0.057	0.060	0.064	0.068	0.070	0.073	0.079	0.103	0.116	0.118
	<b>0.0040</b>	0.058	0.061	0.063	0.067	0.071	0.072	0.079	0.091	0.091	0.104

**Experimento 5:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.065	0.066	0.069	0.072	0.076	0.115	0.160	0.226	0.388	0.449
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.063	0.064	0.067	0.070	0.074	0.083	0.095	0.136	0.171	0.190
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.063	0.064	0.066	0.069	0.074	0.086	0.092	0.131	0.157	0.161
	<b>0.0030</b>	0.061	0.063	0.067	0.072	0.073	0.077	0.089	0.113	0.122	0.134
	<b>0.0035</b>	0.059	0.062	0.066	0.070	0.072	0.075	0.079	0.105	0.118	0.119
	<b>0.0040</b>	0.060	0.063	0.065	0.069	0.073	0.073	0.080	0.093	0.093	0.105

**Experimento 6:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.063	0.065	0.068	0.071	0.077	0.115	0.165	0.231	0.397	0.455
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.061	0.064	0.067	0.071	0.074	0.090	0.102	0.149	0.176	0.193
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.062	0.063	0.066	0.070	0.073	0.087	0.097	0.134	0.158	0.161
	<b>0.0030</b>	0.060	0.062	0.065	0.071	0.074	0.080	0.090	0.117	0.125	0.137
	<b>0.0035</b>	0.058	0.062	0.067	0.069	0.071	0.076	0.084	0.109	0.117	0.121
	<b>0.0040</b>	0.058	0.062	0.066	0.069	0.071	0.074	0.079	0.092	0.092	0.106

**Experimento 7:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.064	0.066	0.069	0.072	0.076	0.116	0.166	0.232	0.396	0.456
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.062	0.065	0.068	0.072	0.075	0.091	0.103	0.150	0.177	0.194
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.063	0.064	0.067	0.071	0.074	0.088	0.098	0.135	0.159	0.162
	<b>0.0030</b>	0.061	0.063	0.066	0.072	0.075	0.081	0.091	0.118	0.126	0.138
	<b>0.0035</b>	0.059	0.063	0.068	0.070	0.072	0.077	0.085	0.110	0.118	0.122
	<b>0.0040</b>	0.059	0.063	0.067	0.070	0.072	0.075	0.080	0.093	0.093	0.107

**Experimento 8:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.061	0.064	0.066	0.068	0.087	0.114	0.166	0.235	0.412	0.458
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.061	0.062	0.068	0.074	0.076	0.093	0.106	0.152	0.178	0.198
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.060	0.062	0.066	0.072	0.074	0.086	0.099	0.136	0.160	0.166
	<b>0.0030</b>	0.059	0.062	0.066	0.069	0.071	0.082	0.093	0.120	0.128	0.140
	<b>0.0035</b>	0.057	0.059	0.065	0.067	0.070	0.074	0.086	0.111	0.116	0.121
	<b>0.0040</b>	0.057	0.060	0.064	0.067	0.070	0.073	0.081	0.089	0.089	0.106

**Experimento 9:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.064	0.067	0.069	0.071	0.090	0.117	0.169	0.238	0.415	0.460
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.064	0.065	0.072	0.077	0.079	0.096	0.109	0.153	0.181	0.201
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.062	0.065	0.069	0.075	0.077	0.087	0.102	0.137	0.160	0.166
	<b>0.0030</b>	0.062	0.065	0.069	0.072	0.074	0.085	0.096	0.120	0.131	0.143
	<b>0.0035</b>	0.060	0.062	0.068	0.070	0.073	0.077	0.089	0.114	0.119	0.124
	<b>0.0040</b>	0.060	0.063	0.067	0.070	0.072	0.076	0.084	0.092	0.092	0.109

**Experimento 10:**

<b>HORAS</b>		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>CONTROL (mm)</b>		0.065	0.068	0.069	0.072	0.090	0.118	0.170	0.239	0.414	0.461
<b>MATRIZ (mm)</b>		0.064	0.065	0.072	0.076	0.078	0.097	0.110	0.154	0.182	0.202
<b>Concentraciones (mg)</b>	<b>0.0017</b>	0.063	0.065	0.068	0.074	0.078	0.088	0.103	0.138	0.162	0.167
	<b>0.0030</b>	0.062	0.065	0.069	0.073	0.075	0.086	0.097	0.121	0.132	0.144
	<b>0.0035</b>	0.060	0.063	0.069	0.071	0.074	0.078	0.090	0.115	0.120	0.125
	<b>0.0040</b>	0.060	0.064	0.068	0.071	0.073	0.077	0.085	0.093	0.093	0.110