

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**“Desarrollo de nuevas estrategias en desinfección de superficies
inanimadas”**

Tesis para obtener el grado de:

Maestría en Ingeniería

PRESENTA:

Jorge Salomón Salvador Carlos

Director de tesis:

Dr. Benjamín Valdez Salas

Mexicali, Baja California, Junio 2021

Agradecimientos

A mi familia, que son los pilares que sostienen mi causa, voluntad y coraje.

A mis amigos, que tienen grandes deseos para mí, y me recuerdan constantemente el camino que debo seguir.

A los doctores, que me han apoyado más allá de su deber y tratado como parte de su familia.

Resumen

Las infecciones nosocomiales son un problema grave, no sólo en México, sino en el mundo, ya que representan los primeros lugares de decesos a nivel global puesto que, su contagio es debido al interacción del entorno médico, como instrumentos médicos, salas de espera y cirugía.

La efectividad del desinfectante fue dividida en tres fases. La fase 1 fue orientada a la optimización estética y fisicoquímica de la turbidez de la formulación y la producción de espuma de forma estadística con un diseño de experimentos factorial de 2^4 , donde los datos de la turbidez se capturaron por análisis de imagen mediante el software de IMAGE, y para la producción de espuma por medición con regla de la espuma generada después de 5 minutos de agitación.

En la fase 2 se realizó la evaluación de amplio espectro, sinergia e impregnación en superficies inanimadas. En la evaluación de amplio espectro, se efectuaron tres pruebas: la técnica de neutralización y recuperación de células viables por Dey y Engley para la actividad antimicrobiana de los desinfectantes por evaluación de medio recuperado, estudio de reto microbiano siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para pruebas germicidas NMX-BB-040-SCFI-1999 y la prueba de difusión en agar. Los microorganismos evaluados fueron tres bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), una bacteria gram positiva (*S. aureus*) y un hongo diploide (*Candida albicans*). En la sinergia, la evaluación de las nanopartículas como del desinfectante final fueron realizadas por espectroscopia de infrarrojo con una longitud de onda de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . Por último, en la permanencia de superficies inanimadas, se impregnaron mascarillas de tres capas con el desinfectante formulado. La visualización de la impregnación se llevó a cabo por microscopía electrónica de barrido.

En la fase 3, la distribución y costo fueron realizados por investigación de precios de los desinfectantes comerciales encontrados en el mercado de la ciudad de Mexicali Baja California México.

Los resultados de cada una de las fases mostraron que el desinfectante desarrollado cumplió con cada una de las pruebas, resumiéndose en un desinfectante que conservará sus características estéticas almacenado y en diferentes ambientes; en una optimización de los ingredientes usando diferentes mecanismos de acción; un amplio espectro antimicrobiano que da indicios de prevenir infecciones por otros patógenos como son el SARS-CoV-2 y una impregnación en superficies

inanimadas que proporcionará protección durante días brindando seguridad al área donde se ha impregnado.

Estos resultados abren paso a una nueva generación de desinfectantes con una duración y permanencia superior, que aprovecha las nuevas tecnologías e invita a seguir investigando y desarrollando nuevas estrategias de desinfección en superficies inanimadas.

Índice de contenido

| | |
|---|----|
| Capítulo 1 | 10 |
| 1.1. Introducción | 10 |
| 1.2. Justificación..... | 11 |
| 1.3. Objetivo general | 11 |
| 1.4. Objetivos específicos..... | 11 |
| 1.5. Hipótesis..... | 11 |
| Capítulo 2 Marco teórico | 12 |
| 2.1. Desinfección, Esterilización, Antisépticos y Biocidas..... | 12 |
| 2.2. Infecciones nosocomiales y tipos..... | 12 |
| 2.3. Aspecto mundial y nacional de las infecciones nosocomiales..... | 14 |
| 2.3.1. Implicaciones (carga) de las infecciones nosocomiales en países desarrollados, en vía de desarrollo y subdesarrollados..... | 14 |
| 2.3.2. Microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en instituciones mexicanas | 15 |
| 2.3.3. Tiempo de permanencia de diferentes microorganismos causantes de infecciones nosocomiales..... | 18 |
| 2.4. Bacterias | 19 |
| 2.5. Virus..... | 20 |
| 2.6. Hongos | 20 |
| 2.7. Métodos de desinfección..... | 21 |
| 2.7.1. Desinfectantes químicos o modalidades al tacto | 21 |
| 2.7.2. Modalidades automátatas o sin tacto | 25 |
| 2.7.3. Superficies auto limpiantes o antimicrobianas | 26 |
| Capítulo 3 Metodología | 27 |

| | |
|--|----|
| 3.1. Estrategia..... | 27 |
| 3.2. Síntesis de nanopartículas de plata..... | 27 |
| 3.3. Elaboración de la formulación base | 28 |
| 3.4. Métodos estadísticos en formulaciones..... | 28 |
| 3.5. Consideraciones para el diseño factorial..... | 29 |
| 3.6. Procedimiento para optimización de turbidez..... | 29 |
| 3.7. Procedimiento para optimización de espumado..... | 30 |
| 3.8. Microbiología..... | 31 |
| Preparación de superficies | 33 |
| Capítulo 4 Resultados y discusión | 34 |
| 4.1. Formulación general..... | 34 |
| 4.1.1. Pruebas de estabilidad..... | 35 |
| 4.2. Optimización | 37 |
| 4.2.1. Turbidez | 37 |
| 4.2.1.1. Diseño..... | 38 |
| 4.2.1.2. ANOVA turbidez | 39 |
| 4.2.1.3. Diagrama de Pareto de efectos turbidez..... | 40 |
| 4.2.1.4. Efectos normales estadísticos turbidez..... | 41 |
| 4.2.1.5. Herramienta de optimización MINITAB 19..... | 42 |
| 4.2.2. Espumado..... | 43 |
| 4.2.2.1. Diseño..... | 44 |
| 4.2.2.2. ANOVA espumado | 45 |
| 4.2.2.3. Diagrama de Pareto de efectos espumado..... | 46 |
| 4.2.2.4. Efectos normales estadísticos espumado..... | 47 |
| 4.2.2.5. Herramienta de optimización de MINITAB 19 | 48 |

| | |
|---|----|
| 4.3. Importancia de los resultados estadísticos por diseño factorial en el desinfectante..... | 49 |
| 4.3.1. Turbidez | 49 |
| 4.3.2. Espumado..... | 50 |
| Pruebas microbiológicas | 52 |
| Desafío microbiano..... | 53 |
| Halo de inhibición..... | 53 |
| Unidades formadoras de colonias | 55 |
| Sinergia | 56 |
| Nanopartículas | 56 |
| UV-Vis..... | 56 |
| DLS..... | 57 |
| FTIR..... | 59 |
| Desinfectante..... | 61 |
| FTIR..... | 61 |
| Impregnación en mascarillas..... | 62 |
| Distribución..... | 67 |
| Costo | 68 |
| Capítulo 5 Conclusiones | 70 |
| Referencias..... | 72 |
| Apéndice | 83 |
| Anexo | 88 |

Índice de ilustraciones

| | |
|--|----|
| Ilustración 1 Microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en México [34, 35] | 16 |
| Ilustración 2 Microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en EUA [36, 37] | 17 |

| | |
|--|----|
| Ilustración 3 Microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en UE [36, 37] | 17 |
| Ilustración 4 Bacterias Gram positiva y Gram negativa y sus partes | 19 |
| Ilustración 5 Virus envuelto y no envuelto y sus partes | 20 |
| Ilustración 6 Estructura de Candida albicans y Aspergillus candidus. | 21 |
| Ilustración 7 Estrategia y fases del desarrollo del desinfectante..... | 27 |
| Ilustración 8 Celda de captura de imágenes para el análisis de la turbidez | 30 |
| Ilustración 9 Medición del espesor de espumado | 31 |
| Ilustración 10 Muestras de mascarilla impregnadas con el desinfectante formulado..... | 33 |
| Ilustración 11 Espectro antimicrobiano teórico del desinfectante desarrollado | 35 |
| Ilustración 12 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la turbidez | 41 |
| Ilustración 13 Gráfica normal de efectos estandarizados para la turbidez..... | 42 |
| Ilustración 14 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el espumado | 47 |
| Ilustración 15 Gráfica normal de efectos estandarizados del espumado | 48 |
| Ilustración 16 Efecto de la humectabilidad de las cadenas polioxietileno en la turbidez..... | 50 |
| Ilustración 17 Partes de la espuma y fenómeno de drenado | 51 |
| Ilustración 18 Halo de inhibición (mm) para diferentes concentraciones del surfactante catiónico y desinfectantes comerciales..... | 55 |
| Ilustración 19 Log ₁₀ Unidades formadoras de colonias para diferentes concentraciones del surfactante catiónico y desinfectantes comerciales..... | 56 |
| Ilustración 20 Espectro UV-visible para las nanopartículas sintetizadas | 57 |
| Ilustración 21 Distribución de tamaño de partícula para las nanopartículas sintetizadas..... | 58 |
| Ilustración 22 Espectro infrarrojo del agente reductor, estabilizante y nanopartículas | 59 |
| Ilustración 23 Espectro infrarrojo del surfactante no iónico, catiónico, nanopartículas y desinfectante formulado..... | 61 |
| Ilustración 24 Capas y materiales de la mascarilla impregnada | 63 |
| Ilustración 25 Micrografías y EDX de capa de polipropileno no tejido azul | 65 |
| Ilustración 26 Micrografías y EDX de capa de polipropileno no tejido blanco | 66 |
| Ilustración 27 Micrografía y EDX de Fibra de alta densidad blanca gruesa | 67 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Métodos estadísticos usados en la optimización de formulaciones | 28 |
| Tabla 2 Diseño de experimentos para la formulación del desinfectante | 29 |
| Tabla 3 Comparación de agentes activos, tipos y espectro..... | 34 |
| Tabla 4 Resultados de pruebas de estabilidad..... | 36 |
| Tabla 5 Valores en pixeles (VP) de las muestras analizadas por el software de imágenes | 37 |
| Tabla 6 Resultados del diseño factorial para la turbidez | 38 |
| Tabla 7 ANOVA de interacción de 2 términos para la turbidez..... | 39 |
| Tabla 8 Valor deseado y experimental de la herramienta optimización..... | 42 |
| Tabla 9 Muestras después de la medición del espesor de la espuma y nivel de espuma (NE) en cm | 43 |
| Tabla 10 Resultados del diseño factorial para el espumado | 44 |
| Tabla 11 ANOVA de interacción de 2 términos para el espumado..... | 45 |
| Tabla 12 Valor deseado y experimental de la herramienta optimización..... | 48 |
| Tabla 13 Microorganismos evaluados y su impacto en las infecciones nosocomiales..... | 52 |
| Tabla 14 Longitudes de onda con tipo de bandas para el agente reductor | 59 |
| Tabla 15 Longitudes de onda con tipo de bandas para el agente estabilizador | 59 |
| Tabla 16 Longitudes de onda con tipo de bandas para las nanopartículas | 60 |
| Tabla 17 Longitudes de onda con tipo de bandas para el surfactante no iónico..... | 61 |
| Tabla 18 Longitudes de onda con tipo de bandas para el surfactante catiónico | 62 |
| Tabla 19 Longitudes de onda con tipo de bandas para el desinfectante | 62 |
| Tabla 20 Comparativo de desinfectantes en el mercado, precio por volumen | 68 |

Índice de apéndice

| | |
|--|----|
| Apéndice 1 ANOVA de turbidez de 4 términos | 83 |
| Apéndice 2 ANOVA de turbidez de 3 términos | 84 |
| Apéndice 3 ANOVA de espumado de 4 términos | 85 |
| Apéndice 4 ANOVA de turbidez de 3 términos | 86 |

Índice de anexos

| | |
|---------------|----|
| Anexo 1 | 88 |
|---------------|----|

| | |
|--------------|-----|
| Anexo 2..... | 89 |
| Anexo 3..... | 89 |
| Anexo 4..... | 90 |
| Anexo 5..... | 91 |
| Anexo 6..... | 92 |
| Anexo 7..... | 106 |

Capítulo 1

1.1. Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las infecciones asociadas a la atención médica o infecciones nosocomiales como las contraídas por un paciente durante su tratamiento en un hospital u otro centro sanitario y que dicho paciente no tenía ni estaba incubando en el momento de su ingreso [1]. Estas infecciones no se limitan a los centros hospitalarios, debido a que, otras formas de llevar tratamiento a las personas lo ponen en contacto con este tipo de infecciones como son ambulancias, consultorios móviles, y centros de día [2].

Las infecciones nosocomiales más comunes son las provenientes de las vías urinarias, las de heridas quirúrgicas, las vías respiratorias bajas y las del sitio de inserción de catéteres endovenosos [2]. Todas estas provocadas por bacterias, virus, hongos y parásitos procedentes del contacto con personal médico o pacientes, por la flora intestinal de un paciente o por superficies u objetos inanimados que han sido contaminados.

Enfatizando las provenientes de las superficies, es un hecho que diversos organismos tienen la capacidad de permanecer en superficies inanimadas por un periodo de tiempo. En el caso de bacterias se ha encontrado que la *Escherichia coli*, con habilidad de contaminar alimentos provocando cólera, tiene una duración de hasta 16 meses de permanencia [3]. En el caso de los virus, el *Parvovirus* responsable del eritema infeccioso puede persistir por más de 1 año. Por último, en el caso de los hongos, el hongo *Candida albicans*, común en la cavidad bucal puede permanecer hasta 120 días en superficies secas. Este tiempo de permanencia de estos organismos conlleva a un foco importante de infección que, al no controlarse, puede causar complicaciones serias como es un brote epidémico, como la cólera en el 2013 en México [4].

Para combatir este problema, se han creado diferentes formas de eliminar los gérmenes en las superficies inanimadas. Métodos clásicos como son el uso de luz ultravioleta y desinfectantes ha probado tener una eficacia considerable, sin embargo, no todas las superficies son de fácil acceso haciendo insuficiente el uso de estos métodos para controlar su crecimiento. Esta insuficiencia conlleva a un tema de importancia actual, como es la resistencia adquirida de los microorganismos. Estas nuevas áreas de estudio ponen a los científicos a buscar nuevas alternativas para lograr el uso de nuevas tecnologías como es la nanotecnología. Ejemplos de la incorporación de la

nanotecnología son la modificación nanoestructural de las superficies, recubrimientos e incorporación de nanopartículas de metales con potencial antimicrobiano [5].

La presente tesis tiene como objetivo el desarrollo y evaluación de novedosos desinfectantes de amplio espectro que incorporan nanotecnología de última generación para aumentar la eficacia en la eliminación de microorganismos. El trabajo conlleva desde la síntesis de nanopartículas hasta el estudio microbiológico de los desinfectantes, así como la implementación en sector salud y escolar.

1.2. Justificación

Teniendo en mente las dificultades de los sistemas de salud en México, el incremento de las infecciones nosocomiales en hospitales públicos y privados y la expansión de la reciente pandemia de la COVID 19, esta tesis tiene como objetivo el desarrollo de un desinfectante de amplio espectro con la función de evitar las infecciones más comunes en México. El resultado de este trabajo busca hacer consciencia en la sociedad de la importancia de la desinfección de nuestro entorno, así como la exploración de nuevas estrategias encaminadas en la mejora de la calidad de vida de las personas.

1.3. Objetivo general

Desarrollar un desinfectante de alto espectro formulado con nuevas estrategias y con tiempo de permanencia en superficies inanimadas.

1.4. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas metálicas
- Desarrollar formulaciones incorporando nanopartículas y Preparar el desinfectante más óptimo
- Analizar las propiedades antimicrobianas del desinfectante nanoestructurado
- Validar la eficiencia antimicrobiana del desinfectante formulado en superficies inanimadas

1.5. Hipótesis

La funcionalización con nanopartículas de diferentes activos de uso en desinfectantes mejorará la eficiencia de desinfección y la permanencia en superficies inanimadas.

Capítulo 2 Marco teórico

2.1. Desinfección, Esterilización, Antisépticos y Biocidas

Aunque en la vida cotidiana se confunden los conceptos de desinfección y esterilización, éstos son distintos y tienen características que los distinguen. La desinfección tiene la función de eliminar microorganismos en superficies con excepción de esporas bacterianas. En cambio, la esterilización busca eliminar por completo microorganismos en superficies [6, 7]. Además de los desinfectantes y esterilizantes, existen también los antisépticos que se diferencian de los desinfectantes en su aplicación y concentración, ya que la empleabilidad de los antisépticos es en aplicaciones tópicas y busca destruir o inhibir microorganismos, además que la concentración de los productos con esta función es reducida [8]. Por último, los biocidas son una mezcla de sustancias activas con múltiples medios (atomizador, aerosol, pinturas, etc.) que tienen como objetivo (incluidos los microorganismos) destruir, contrarrestar o inhibir cualquier organismo nocivo, por lo tanto, engloban a los desinfectantes, plaguicidas, conservadores, entre otros [9].

2.2. Infecciones nosocomiales y tipos

Las infecciones nosocomiales son aquellas cuyo contagio es debido a la interacción del entorno médico, como instrumentos médicos, salas de espera, hasta sistemas de ventilación, las cuales, no estaban presentes antes de su ingreso al hospital, por esta razón son llamadas también como Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud [10]. Las infecciones nosocomiales son un problema grave, no sólo en México, sino en el mundo, ya que representan los primeros lugares de decesos a nivel global [11]. La incidencia de las infecciones nosocomiales está influenciada a diferentes factores, sin embargo, éstos pueden englobarse en dos, los extrínsecos y los intrínsecos [12]. Dentro de los factores intrínsecos se encuentran la edad, obesidad, si el paciente es fumador, la nutrición, el sistema inmunológico del paciente (edad y nutrición) y enfermedades predisuestas que lo hacen susceptible a microorganismos presentes en el entorno hospitalario (obesidad, niveles de glucosa, paciente fumador). En cambio, los factores extrínsecos se encuentran en el cuidado en la preparación del paciente (corte de cabello, limpieza de la piel, tiempo de cirugía) y materiales usados (desinfectantes, suplemento de oxígeno, sondas, ventilación, superficies) [13].

Entre los tipos de infecciones nosocomiales se encuentran la infección respiratoria (39.7%), infección urinaria (20.5%), infección del sitio de intervención quirúrgica (13.3%) e infección del sitio de inserción de un catéter vascular (7.3%), donde el porcentaje entre paréntesis representa los

resultados obtenidos en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud en México [14].

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su trabajo “Prevención de las infecciones nosocomiales: Guía práctica” ha clasificado las infecciones nosocomiales por los sitios de contagio, siendo estos: infecciones urinarias, infecciones del sitio de una intervención quirúrgica, neumonía nosocomial, bacteriemia nosocomial y otras [15].

Infecciones urinarias: las infecciones por vías urinarias representan entre el 30 y 50 % de todas las infecciones nosocomiales [16, 17]. Estas se deben a dos causas principales, por origen endógeno y por ambientes húmedos en los hospitales. Lesiones en el tracto urinario debido a catéteres permanentes representan el 80% de estos casos, sin embargo, también se presentan por anomalía congénita, deficiencia neurológica o cálculos [18, 19]. Entre los microorganismos causantes de las infecciones urinarias se encuentran *E. coli*, *Enterococcus* y *Klebsilla*, siendo la *E. coli* la que tiene el mayor porcentaje [20].

Infecciones del sitio de intervención quirúrgica: Son las infecciones desarrolladas durante o después de un procedimiento quirúrgico invasivo [21]. Este tipo de infecciones es causado por gérmenes como *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Pseudomonas*, siendo el *Staphylococcus aureus* el más recurrente (23%) según un estudio en los Estados Unidos [22, 23].

Neumonía nosocomial: Esta infección se transmite principalmente por las vías respiratorias debido al uso de ventilación mecánica en salas de hospitalización médica o salas quirúrgicas, ocupando el segundo lugar de frecuencia en las infecciones nosocomiales [24]. La etiología microbiológica de la neumonía nosocomial es de amplio espectro, siendo lo más común las bacterias y raramente producidas por hongos o virus. Entre los microorganismos más frecuentes encontrados en la neumonía nosocomial es *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y *K. pneumoniae* [25].

Bacteriemia nosocomial: la bacteriemia nosocomial está estrechamente relacionada con el sitio de entrada a la piel del dispositivo intravascular y los catéteres venosos durante la estancia en el hospital. La mortalidad global de esta asciende del 19% hasta el 50% siendo *S. aureus* y *Staphylococcus coagulase negativo* los microorganismos con la frecuencia, tanto en la sala general como en cuidados intensivos [26, 27].

Otras: existen otros sitios que pueden infectar a una persona, sin embargo, otros sitios frecuentes son infecciones en piel y tejidos blandos (úlceras y quemaduras), gastroenteritis (la más común en niños), infecciones en los ojos, endometritis e infecciones en los órganos genitales (después del parto) [15].

2.3. Aspecto mundial y nacional de las infecciones nosocomiales

2.3.1. Implicaciones (carga) de las infecciones nosocomiales en países desarrollados, en vía de desarrollo y subdesarrollados

Como es de esperarse, la presencia o mortalidad de las infecciones nosocomiales en los países desarrollados es sustancialmente menor que en los países en vías de desarrollo, con un estimado de 4.5-7.1 pacientes por cada 100 para los países en desarrollados y 15.5 pacientes por cada 100 para países en vías de desarrollo [28]. A pesar de que, la mortalidad de las infecciones nosocomiales en los países desarrollados es menor que en los países en vías de desarrollo, estas cifras siguen siendo un valor considerable.

Existen diversas razones por las que los países en desarrollo tienen un valor por debajo de la media con respecto a los de vías en desarrollo, ejemplos de estas han sido listadas por Sharmila *et al.* [29]:

1. Programas para el control y prevención de infecciones.
2. Directrices
3. Educación y formación
4. Vigilancia
5. Estrategias multimodales
6. Seguimiento y auditorias
7. Carga de trabajo, dotación de personal y ocupación de camas
8. Construcción del entorno, materiales y equipo

En el caso de México, existe un Comité para la Detección y Control de Infecciones Nosocomiales (CODECIN) encargado de las medidas listadas por Sharmila *et al.* Donde sus funciones engloban actividades, proyectos y programas para la prevención, detección y control de infecciones nosocomiales [30, 31].

A su vez, un informe documental en extenso titulado “Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud” del 2011 evidencia las políticas relacionadas al control de las infecciones nosocomiales, como son [32]:

- Políticas de manejo de alimentos
- Políticas de esterilización, desinfección y antisépticos
- Políticas de manejo de catéteres y soluciones parenterales
- Políticas de uso de antibióticos

2.3.2. Microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en instituciones mexicanas

En la república mexicana las instituciones de salud se dividen en grupos, clases y subclases. Dando énfasis en la primera clasificación (grupos), éstos están formados por instituciones de salud del sector público, del sector privado e instituciones de prepago (aseguradoras y bancos) [33]. La mayor parte de las personas, asisten al sector público, ya sea por afiliación en el trabajo, seguro social, seguro facultativo o precio. Esta demanda de servicios hace que las instalaciones y equipos sean insuficientes para sobrellevar de manera adecuada a cada paciente, volviéndose un foco para la proliferación de microorganismos causantes de infecciones nosocomiales.

De acuerdo a un estudio del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el 2016 reveló los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales encontrados, a su vez comparándolos con un estudio anterior del 2011 [34, 35]. Sus resultados mostraron que el microorganismo más frecuente fue *Escherichia coli* con un 24%, seguida de *Staphylococcus coagulasa-negativa* (19%) y *Pseudomonas aeruginosa* (15%). Sin embargo, los otros microorganismos tienen un porcentaje de igual manera alto, donde el 80% incluye 5 microorganismos (Ilustración 1).

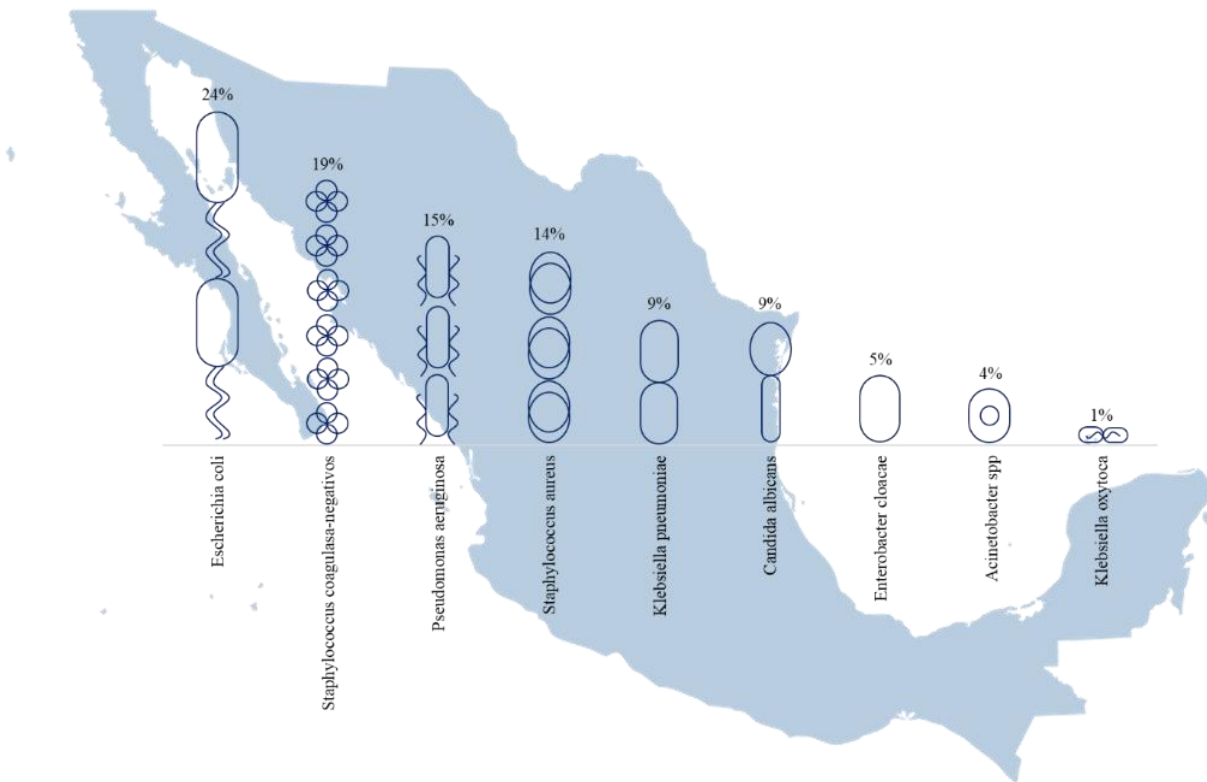


Ilustración 1 Microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en México [34, 35]

Otro estudio similar, pero elaborado en países desarrollados (EUA y UE) reportó resultados similares a México para la UE y ligeramente distintos para EUA, teniendo este último, microorganismos diferentes es sus resultados [36, 37]. Para el caso de los EUA, los microorganismos más recurrentes fueron *Staphylococcus aureus* con un 22%, seguido por *Escherichia coli* (16%) y *Staphylococcus coagulasa negativo* (16%) (Ilustración 2). En cambio, para la UE, *Escherichia coli* (22%), *Pseudomonas aeuroginosa* (18%) y *Staphylococcus coagulasa negativo* (17%) estuvieron en los primeros lugares (Ilustración 3).

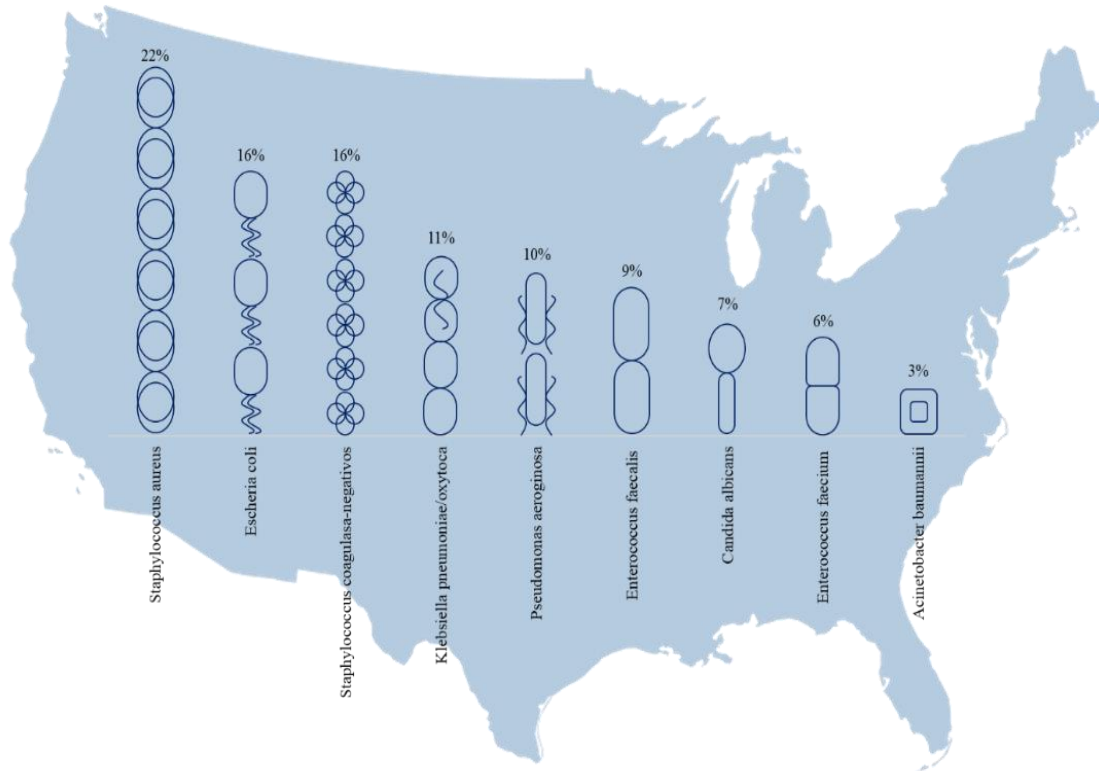


Ilustración 2 Microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en EUA [36, 37]

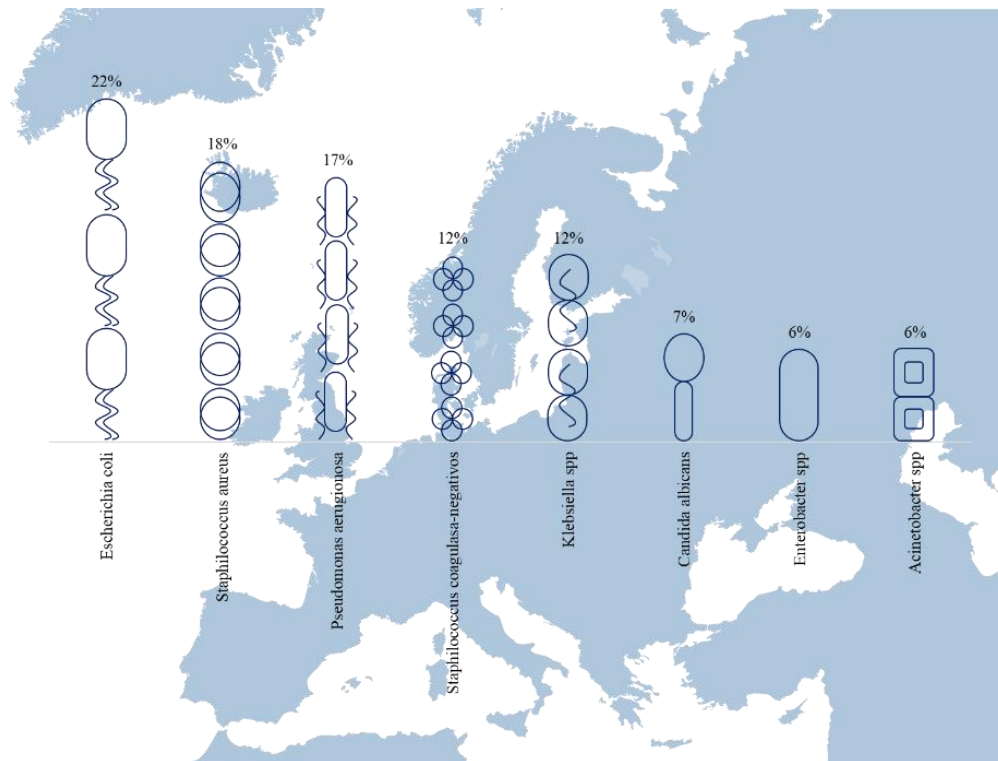


Ilustración 3 Microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en UE [36, 37]

Esta información arroja deducciones interesantes, ya que, da un indicio de la procedencia de éstos microorganismos y posibles cadencias en los centros médicos de cada país. En esta comparación, es notable, que *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* son los microorganismos más abundantes. Por la literatura de investigaciones anteriores, se encuentra que, *Escherichia coli* es una bacteria común, proveniente del tracto intestinal y causante de diarrea y muerte infantil [38]. Por otra parte, *Staphylococcus aureus* es una bacteria anaerobia, proveniente de las mucosas o la piel y causante de infecciones cutáneas y de mucosas, considerada como el principal causante de las enfermedades nosocomiales [39]. Analizando estos dos microorganismos, *Escherichia coli* puede aparecer en las superficies inanimadas por la falta de higiene en las personas y *Staphylococcus aureus* por falta de higiene en procedimientos invasivos intravenosos.

2.3.3. Tiempo de permanencia de diferentes microorganismos causantes de infecciones nosocomiales

El tiempo de permanencia de los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales es variado, pudiendo permanecer desde horas hasta meses o años. Además, que, su persistencia se ve afectada por el tipo de superficie y las condiciones ambientales en las que se encuentren. Para las bacterias Gram positivas y Gram negativas se ha comprobado que su persistencia se incrementa en superficies secas y a temperaturas bajas (4-6 °C). En el caso de los hongos, especialmente de *Candida albicans*, las condiciones óptimas se encuentran en lugares húmedos, bajas temperaturas y presencia de suero y albúmina. Por último, los virus persisten en superficies lisas, de baja temperatura y baja humedad.

En síntesis, de anteriores estudios, la persistencia de los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en México es [40, 41]:

Acinetobacter spp.: 3 días a 5 meses

Escherichia coli: 1.5 horas a 16 horas

Klebsiella spp.: 2 horas a 30 meses

Pseudomonas aeruginosa: 6 horas a 16 meses

Staphylococcus aureus: 7 días a 7 meses

Candida albicans: 1-120 días

SARS: 72-96 horas

Es sorprendente que algunos puedan durar años sobre una superficie y más sorprendente aún, que los que tienen mayor tiempo de permanencia son los que se encontraron en mayor porcentaje en las Instituciones Mexicanas de Salud Pública.

2.4. Bacterias

Las bacterias son microorganismos que se pueden clasificar de acuerdo al número de capas lipídicas que contiene su membrana, siendo Gram-positivas las que contienen una gruesa capa de peptidoglicano y Gram-negativas las que tienen una capa pequeña de peptidoglicano interior y una exterior (Ilustración 4). Sin embargo, hay casos aislados de bacterias que no contienen capa, pero habitan en otras células para su subsistencia. El tamaño de éstas puede variar de 200 micrómetros, como es el caso de *Schaudinnium bütschlii* hasta 1 o 20 micrómetros, como *Mycoplasma gallicepticum*. A su vez, las bacterias se pueden dividir por su morfología (morfología bacteriana), donde éstas presentan formas simples como los cocos y bacilos hasta complejas como las helicoidales [42].

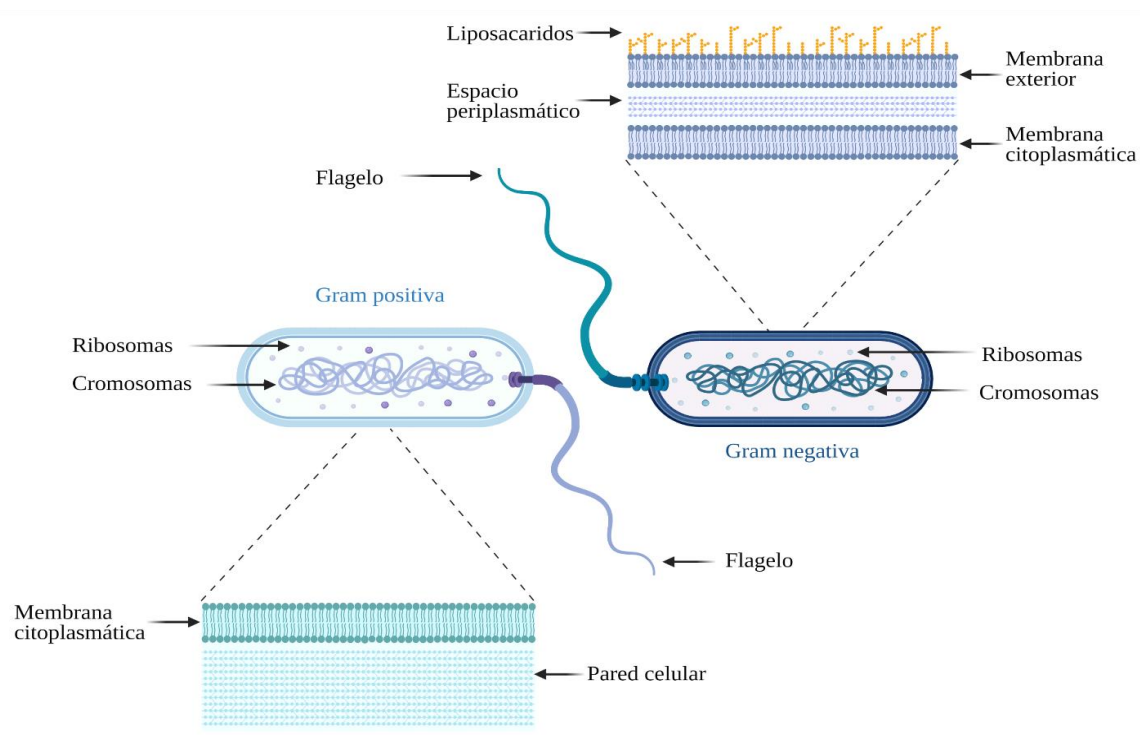


Ilustración 4 Bacterias Gram positiva y Gram negativa y sus partes (elaborado en Biorender)

2.5. Virus

Los virus son entidades que se caracterizan por tener ADN o ARN, pero no ambos. Aunque su definición está aún en debate, se ha propuesto asignarles un propio reino, ya que no pueden ser considerados como organismos vivos. El tamaño de los virus ronda los 20 nm como Parvovirus hasta los 600 nm como el virus del Ébola. La morfología vírica es variada, pueden encontrarse de forma helicoidal, icosaédrica, con envoltura o complejos. Los más comunes son con envoltura y sin envoltura (Ilustración 5). Se consideran parásitos, ya que, requieren de invadir las células para su replicación. Para su reproducción, el ciclo consta de 6 pasos: la adsorción, penetración, despojo, replicación, ensamblaje, y liberación [42].

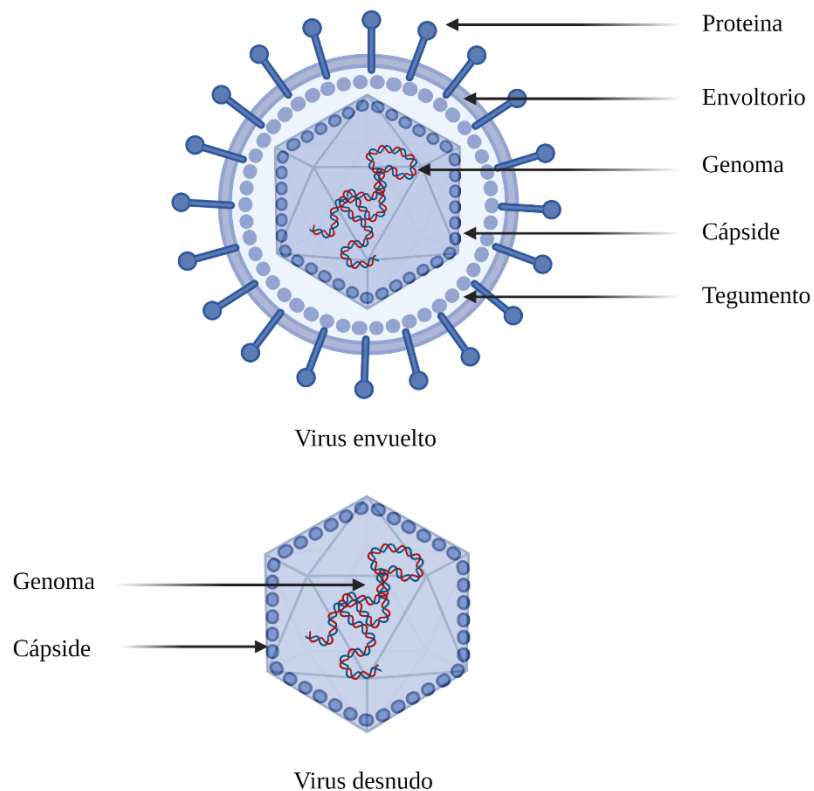


Ilustración 5 Virus envuelto y no envuelto y sus partes (elaborado en Biorender)

2.6. Hongos

Los hongos pertenecen a los organismos eucarióticos con estructura más compleja que las bacterias y los virus. Éstos contienen un núcleo bien definido, mitocondria, aparato de Golgi y retículo endoplásmico. Los hongos pueden ser clasificados por su forma, teniendo forma unicelular,

filamentosa y dimórfica (Ilustración 6). A pesar que, a primera instancia, los hongos son relacionados automáticamente a las setas, éstos se encuentran de igual manera en escala microscópica, y causa problemas importantes de salud, por esta razón su estudio corresponde a la microbiología. Para los hongos de interés en esta tesis y los cuales, están relacionados a las infecciones nosocomiales, son las levaduras y hongos dimórficos [42].

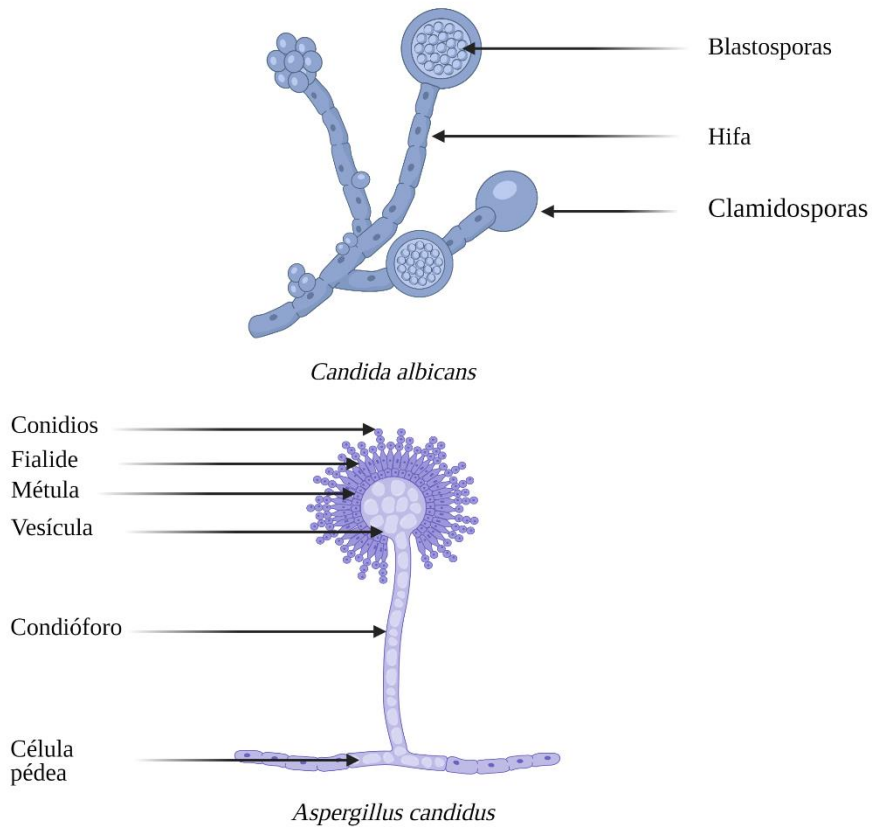


Ilustración 6 Estructura de Candida albicans y Aspergillus candidus (elaborado en Biorender)

2.7. Métodos de desinfección

2.7.1. Desinfectantes químicos o modalidades al tacto

Alcoholes

Los alcoholes, tales como etanol, alcohol isopropílico, y n-butanol, han sido implementados ampliamente como desinfectantes de superficies, llegando a ser ingredientes activos principales en múltiples productos desinfectantes. No obstante, los más usados son el etanol y el alcohol

isopropílico, ya que el n-butanol es acompañado habitualmente del alcohol isopropílico al 70% (v/v) [43, 44].

Diferentes trabajos, inclusive de hace más de 200 años, estudiaron la eficiencia desinfectante de los alcoholes en diferentes porcentajes. Las primeras conclusiones encontraron que un porcentaje de 25%-90% como el ideal para desinfectar y más recientemente, se acortó este intervalo a 60-90% (v/v) [43]. A pesar de las ventajas que tiene el alcohol en términos de desinfección, este cuenta con un espectro limitado a bacterias y virus y evaporación rápida. Además, de posibles problemas dermatológicos en usuarios de productos como gel para manos o desinfectantes en atomizador como son picazón, enrojecimiento y alergias [45].

Mecanismo de acción de los alcoholes: estudios han llegado a la conclusión que el mecanismo principal de los alcoholes es por medio de la desnaturalización de proteínas y enzimas en bacterias, virus y levaduras. El mecanismo comienza por estrés alcohólico, el cual hace que la capa lipídica incremente su fluidez permitiendo la penetración de las moléculas de alcohol. Por consiguiente, estas moléculas de alcohol se enlazan con las proteínas o enzimas por medio de puentes de hidrógeno en la estructura proteica terciaria, y estos a su vez forman nuevos enlaces entre el alcohol y las cadenas laterales de la proteína [46, 47].

Aldehídos

Los aldehídos son compuestos orgánicos con grupo funcional carbonilo, los cuales, el glutaraldehído y formaldehído son los principales exponentes en el ámbito de la desinfección por su amplio espectro desinfectante. Además del glutaraldehído y el formaldehído, existen otros con poder desinfectante, como son el benzaldehído, succinaldehído y ftalaldehído [48].

Dentro de las aplicaciones de los aldehídos en el área de la desinfección y esterilización, el glutaraldehído ha dominado la esterilización de endoscopios gastrointestinales, siendo la concentración del 2% la más extendida no sólo para aplicaciones de endoscopios gastrointestinales, también tubos de presión para espirometría, dializadores, transductores, equipos de anestesia y terapia respiratoria [48].

A pesar de que los aldehídos han sido ampliamente utilizados por más de 50 años, diversos estudios demuestran problemas de salud graves con las concentraciones recomendadas. Problemas comunes son la irritación y alergias [49].

Mecanismo de acción: tanto el glutaraldehído y el formaldehído inactivan microorganismos por la alquilación de grupos amino, carboxilo, hidroxilo y sulfhidrilo alterando la síntesis de ARN, ADN y proteínas por los átomos de nitrógeno del anillo de las bases de purina [50, 51].

Clorhexidina

La clorhexidina es una bisbiguanidinaa catiónica ampliamente usada en el área de la desinfección desde los años 50s [52]. Aunque existen otras moléculas pertenecientes a la familia de las guanidinas como son la alexidina y las biguanidas poliméricas como agentes desinfectantes, la clorhexidina ha sido la más difundida, pudiéndola encontrar en enjuagues bucales, jabones e instrumentos quirúrgicos [53]. Otra aplicación de la clorhexidina relacionada a la desinfección, es su efecto preservativo en formulaciones como jabones para manos, champús y cremas.

Mecanismo de acción: el mecanismo de la clorhexidina ha sido descrito de dos formas distintas, anteriormente se le atribuía su mecanismo a la inactivación de la enzima ATPasa, sin embargo, un estudio posterior con *E. coli* demostraron que el verdadero mecanismo de acción era la disrupción de la membrana citoplasmática. La clorhexidina es adsorbida por los fosfatos de los componentes proteicos de la pared celular bacteriana, éstos penetran y rompen la membrana citoplasmática bacteriana [54, 55].

Compuestos de cuaternarios de amonio

Los primeros compuestos de amonio cuaternario implementados en el área de la desinfección fueron n-alkil metil bencil cloruro de amonio o mejor conocido como cloruro de benzalconio, los cuales emergieron en los 50s [56]. Los cuaternarios de amonio han ido evolucionando y siendo divididos por generaciones:

- 1ra generación: Cloruro de N-alkil dimetil bencil amonio
- 2da generación: Cloruro de alkil dimetil etilbencil amonio
- 3ra generación: Cloruro de N-alkil dimetil bencil amonio + cloruro de alkil dimetil etilbencil amonio
- 4ta generación: Cloruro de alkil dimetil amonio
- 5ta generación: Cloruro de alkil dimetil amonio + Cloruro de N-alkil dimetil bencil amonio

En la actualidad existen 5 generaciones de compuestos de amonio cuaternario, siendo la 3ra (1ra más 2da) y 5ta (1ra más 4ta) generación una combinación de las anteriores. Acompañado al tiempo, los compuestos de amonio cuaternario han mejorado su poder desinfectante con concentraciones cada vez menores [57, 58].

En el mercado actual, los cuaternarios de amonio más utilizados son aún los de la 1ra generación, que pueden ser encontrados en multitud de productos desinfectantes, sin embargo, la 5ta generación empieza a adentrarse al área de la desinfección [59]. Aunque, en la literatura, sólo se reconocen 5 generaciones de compuestos de cuaternario de amonio, es posible encontrar reactivos que tienen como clasificación 6ta y 7ma generación, sin embargo, no están aún reconocidos.

Mecanismo de acción de los compuestos de amonio cuaternario: Diversos estudios han buscado explicar el mecanismo de inhibición de los compuestos de amonio cuaternario sobre diferentes organismos, no obstante, el mecanismo que los ha descrito mejor, así como otros compuestos catiónicos, es por la perturbación de la bicapa lipídica, seguido de la pérdida de material por un proceso osmótico [60].

Compuestos liberadores de halógenos

Los compuestos clorados y iodados son los principales representantes de este grupo. Entre los compuestos clorados más comunes encontrados en desinfección son el hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, y dióxido de cloro, todos estos teniendo un nivel intermedio en desinfección. En el caso de los compuestos iodados, generalmente son usados como antisépticos, pero el cloruro de iodo y monobromuro de iodo pueden ser encontrados en soluciones desinfectantes. Ejemplos típicos de desinfección con iodo es en alimentos, agua para beber y agua de piscinas.

Mecanismo de acción de los compuestos clorados: el mecanismo de acción cambia dependiendo del compuesto clorado utilizado, pero pueden resumirse en los siguientes puntos [48]:

- Por electronegatividad: oxidación de enlaces pépticos y desnaturalización de proteínas.
- Oxidación de grupos tiol.
- Decremento de la producción de adenosín trifosfato.
- Alterando permeabilidad de membrana externa por fuga de iones K^+ .

Mecanismo de acción de los compuestos iodados: al igual que los compuestos clorados, el mecanismo de acción de los compuestos iodados se puede resumir en los siguientes puntos [61, 62]:

- Detención de la síntesis de proteínas por oxidación del grupo S-H.
- Impedimento estérico de enlaces de hidrógeno por yodación del grupo fenólico.
- Inmovilización de membranas lipídicas.

El desarrollo e implementación de nanopartículas, entendiéndose como cualquier estructura en escala nanométrica (esferas, esferoides, tubos, estrellas, etc.) entre 0.1 nm a 500 nm ha tenido un gran impacto en todas las áreas de la ciencia, que, en el caso de la desinfección, no es una excepción. La incorporación de agentes nanoestructurados con objetivo de desinfectar diversas superficies es una realidad y es cada vez más frecuente encontrarlos en productos comerciales. La cinética química de los materiales nanoparticulados (velocidad de reacción), así como su actividad antimicrobiana de algunos metales (Ag y Cu) se ve incrementada debido al aumento del área superficial [63]. Además, el diseño de nanopartículas permite cambiar la forma en que interactuarán con los microorganismos ya que pueden funcionar como recubrimientos (siendo un material inerte; ejemplo: Au), transportador (encapsular otros ingredientes activos), anclajes (incorporación de receptores) y guiados (guiados por magnetismo) [64].

Mecanismo de acción: se ha descrito mucho sobre el mecanismo de acción de las nanopartículas, es común que se describa por los mecanismos antes mencionados y estos varían con la forma (esferas, estrellas, capsulas), el tamaño (preferentemente <50 nm), combinación de las nanopartículas (bimetálicas, polimetálicas, inorgánicas-orgánicas). No obstante, si se analizan las más comunes (esféricas) y siendo de elementos puros (Ag, Au, Cu, etc.), el mecanismo de acción es por la alteración en la producción de especies reactivas de oxígeno. Debido a su tamaño, las nanopartículas pueden atravesar la membrana citoplasmática por fagocitosis o difusión [65, 66].

2.7.2. Modalidades automátatas o sin tacto

Aparatos UV-C

Entre las longitudes de onda UV se encuentran la A, B y C, sin embargo, la C es la única confirmada para la desinfección ya que la A y B han resultado ser considerablemente menos eficientes para esta aplicación [67]. La efectividad antimicrobiana de la radiación UV-C está

determinada por el tiempo de incidencia y la distancia entre la fuente de luz y la superficie a desinfectar. Diversos estudios han realizado pruebas con estos dos parámetros y llegado a la conclusión que deben ser distancias menores a 2.4 metros y tiempos exposición de 30 minutos [68].

Mecanismo de acción: Los ácidos nucleicos de los microorganismos son susceptibles a una longitud de onda entre 250 nm -270 nm, por lo tanto, la luz UV-C (200-280 nm) inactiva los microorganismos dañando el material genético (ADN o ARN) [69].

2.7.3. Superficies auto limpiantes o antimicrobianas

Al escuchar superficies desinfectantes o auto limpiantes suena como una última tendencia, no obstante, estas superficies han sido usadas hace mucho tiempo atrás, aprovechando las propiedades intrínsecas de ciertos materiales, como la plata y el cobre (cubiertos, chapas y vasijas). En el caso de las superficies autolimpiantes, éstas también pueden ser encontradas en la naturaleza, por ejemplo, en el reino vegetal, las plantas de la familia de las *Nelumbonaceae*, donde sus hojas presentan superhidrofobicidad debido a un recubrimiento ceroso y la morfología de éstas [70]. Por otro lado, en el reino animal, las plumas de aves presentan superhidrofobicidad por la heterogeneidad de la superficie descrito por el estado de Cassie-Baxter y con el propósito de no estropear el vuelo [71]. Por estos ejemplos, la ciencia ha querido imitar o incorporar estas propiedades en aplicaciones de desinfección por diferentes medios [72].

| Tipos | Ejemplos | Referencias |
|------------------------------------|---|-------------|
| Superficies anti-adhesivas | Superficies cargadas negativamente, Recubrimientos poliméricos (óxido de polietileno y polietilenglicol), Modificación topográfica (nanotubos y nanofibras) | 73, 74, 75 |
| Superficies antimicrobianas | Materiales intrínsecamente activos (Ag y Cu), superficies que contienen agentes activos (electrospinning, cuaternarios de amonio, nanopartículas) | 76, 77 |
| Superficies fotoactivadas | TiO ₂ | 78 |

Capítulo 3 Metodología

3.1. Estrategia

Para el desarrollo del desinfectante, se propone un estudio en tres fases (Ilustración 7). La fase 1 engloba la estabilidad de la formulación, así como el control de los parámetros estéticos por medio de optimización. La fase dos se centra en analizar y demostrar el amplio espectro de la formulación, la sinergia de los reactivos y su permanencia en superficie. Por último, la fase 3, se enfoca en la forma en que será distribuido, su aplicación y costo respecto a desinfectantes ya existentes en el mercado.

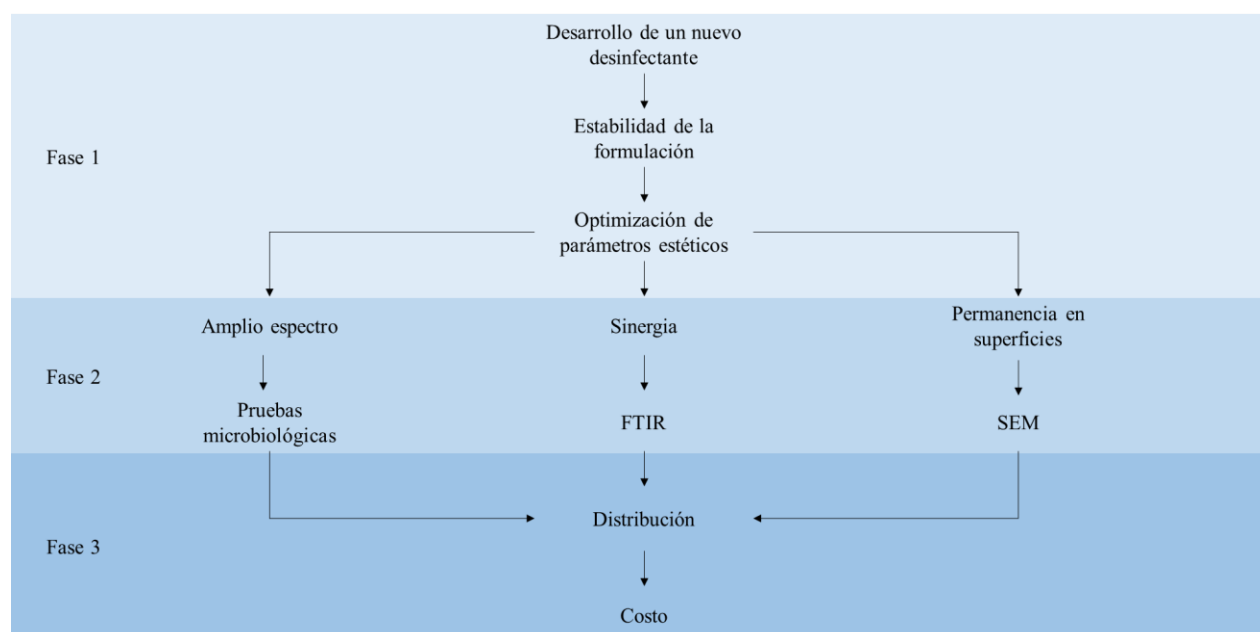


Ilustración 7 Estrategia y fases del desarrollo del desinfectante

3.2. Síntesis de nanopartículas de plata

Para la obtención de nanopartículas de plata se realizó una síntesis por medio del método conocido como bottom-up; para esto se prepararon 2 soluciones definidas de la siguiente manera:

Solución 1: contiene el precursor de plata.

Solución 2: contiene el agente reductor y estabilizador.

Procedimiento

1. Se calentó la solución 2 hasta el reflujo y se mantuvo con agitación.

2. Cuando la solución 2 alcanzó el reflujo, se añadió la solución 1.
3. Se mantuvo el reflujo por 10 minutos, después se pasó el matraz a otro agitador para que la solución se enfriara a temperatura ambiente.
4. Se guardó la solución en un frasco ámbar para protegerlo de la luz.

3.3. Elaboración de la formulación base

El procedimiento de elaboración de los desinfectantes consta de tres partes listadas enseguida:

1. Disolución en alcohol (Alcohol, surfactantes, compuestos de amoníaco, derivados bifenólicos)
2. Disolución en agua (Derivados clorados y metales nanoparticulados)
3. Mezcla de parte 1 en parte 2.

La razón de este procedimiento radica en el grado de solubilidad de cada reactivo, en el caso de los usados en la formulación algunos son poco solubles en agua o poco solubles en alcohol.

3.4. Métodos estadísticos en formulaciones

Es común usar herramientas de la estadística para optimizar un sin número de proyectos, aplicaciones en áreas como la agricultura, reacciones químicas, líneas de producción y formulaciones, etc [79-82]. En el caso específico de las formulaciones, una herramienta comúnmente utilizada es el Diseño de Experimentos, de los cuales, existen una gran variedad (Tabla 1).

Tabla 1 Métodos estadísticos usados en la optimización de formulaciones

| Método estadístico | Aplicaciones | Referencias |
|---------------------------|--|--------------------|
| Factorial | Procesos, desarrollo de productos, optimización y sistemas | 83 |
| Superficie | Optimización de procesos, comportamiento de datos, desarrollo de productos | 84, 85 |
| Mixto | Funciones matemáticas, optimización de procesos | 86 |
| Taguchi | Optimización de procesos | 87 |

Con base a lo expresado en la Tabla 1, se ha optado por la implementación del diseño factorial, ya que, para la formulación base, sólo 4 reactivos fueron sujetos a modificaciones en un rango limitado.

3.5. Consideraciones para el diseño factorial

El motivo de la optimización es entender la influencia que hay en los reactivos y en el resultado final teniendo como meta parámetros físicos/estéticos como son la producción de espuma y turbidez.

El diseño factorial se suele expresar como 2^n , donde 2 son los límites y n las variables de estudio. Para este caso, se aplicará un diseño de 2^4 , ya que, de la cantidad de reactivos en la formulación, 4 son los que tienen mayor influencia en la turbidez y en la producción de espuma debido a sus características fisicoquímicas. En la Tabla 2 se muestran las variables, límites y diseño aleatorio generado por el programa MINITAB 19, entendiéndose como base a la concentración utilizada.

Tabla 2 Diseño de experimentos para la formulación del desinfectante

| Parámetros | Componentes | Unidades | Nivel bajo (-1) | Nivel alto (1) |
|------------|-----------------------|----------|-----------------|----------------|
| X1 | Alcohol | g | Base - 15 | Base + 15 |
| X2 | Agua | g | Base -12 | Base +12 |
| X3 | Surfactante catiónico | g | Base - 0.1 | Base + 0.1 |
| X4 | Surfactante no iónico | g | Base - 0.1 | Base + 0.1 |

3.6. Procedimiento para optimización de turbidez

Para la implementación del diseño factorial es necesario tener un valor numérico de las pruebas, en el caso de la producción de espuma, no presenta problemas ya que el valor numérico proviene del espesor de la espuma en la superficie de la solución en centímetros. Sin embargo, la claridad o turbidez de la muestra es un parámetro cualitativo. Para llevar la turbidez a un parámetro cuantitativo se propone la utilización de un software de imagen gratuito llamado IMAGE. La forma de trabajo de este software se basa en la creación de áreas en una fotografía, la cual le asigna un

valor en píxeles a cada área, y este valor en píxeles, es el valor que se digitará en el software de diseño de experimentos. Para la captura de la imagen, se diseñó y construyó una celda con interior blanco, luz artificial y una cámara colocada a 12 cm de distancia para controlar las condiciones de fotografía como se muestra en la Ilustración 8. Una vez tomada la foto se analiza en el software de imagen y se captura el valor de pixel como resultado.

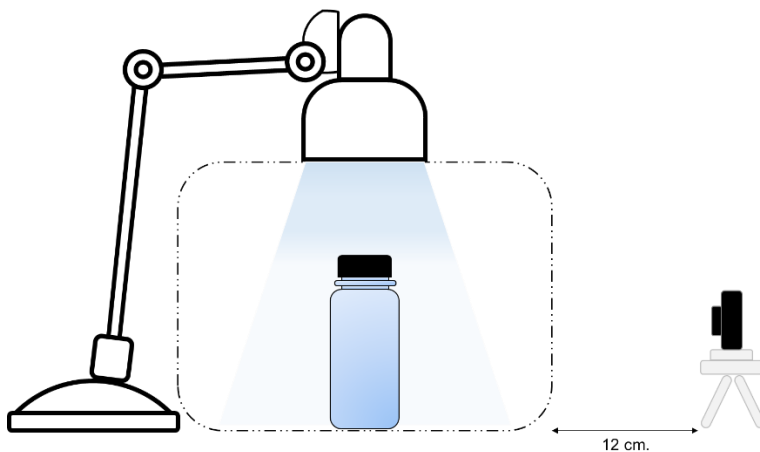


Ilustración 8 Celda de captura de imágenes para el análisis de la turbidez

Los resultados muestran la correcta implementación de este sistema, ya que el grado de turbidez de la muestra corresponde con el incremento de los valores en píxeles.

3.7. Procedimiento para optimización de espumado

La producción de espuma en las formulaciones desinfectantes es un factor fundamental a analizar ya que genera problemas en diferentes industrias. El producto ideal debe presentar apenas turbidez y espuma. El procedimiento para optimizar este parámetro es listado:

1. En botellas de 250 ml se añadió la muestra y se colocó en la cámara aislada utilizada en la prueba de turbidez.
2. Las muestras se agitaron manualmente durante 10 s y se dejaron reposar durante 5 min a temperatura ambiente.
3. A continuación, se tomaron las medidas del espesor de la espuma con una regla común y se analizaron los datos numéricos utilizando el diseño factorial (Ilustración 9).

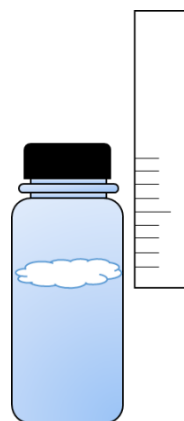


Ilustración 9 Medición del espesor de espumado

3.8. Microbiología

Cultivo microbiano: se inocularon colonias de células recién cultivadas cada una por separado. Para bacterias se utilizó caldo de soya tripticaseína recién preparado (TSB; Becton Dickinson, Sparks, MD, EE. UU.). Para *C. albicans* se utilizó caldo de dextrosa de papa (PDB; Becton Dickinson, Sparks, MD, EE. UU.). Cada inóculo se diluyó en el caldo nuevo correspondiente a aproximadamente 1×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, que se utilizó como concentración microbiana para los estudios antimicrobianos.

Actividad antimicrobiana de los desinfectantes por evaluación de medio recuperado: Para esta evaluación se utilizó la técnica de neutralización y recuperación de células viables por Dey y Engley para medir la actividad antimicrobiana de la formulación desinfectante. El procedimiento es el siguiente:

1. 1 ml de cada desinfectante formulado fue añadido en 8.9 mL de caldo neutralizante Dey and Engley (D/E), se mezcló y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.
2. La mezcla se inoculó con 0.1 ml de cultivo microbiano de trabajo por separado y se incubó a 37 °C durante 48 h.
3. Por consiguiente, cada tubo de cultivo se agitó cuidadosamente durante 15 s, se sembraron 0,1 ml de cada mezcla de cultivo en una placa de agar D/E reciente. Por cada evaluación microbiana se incubó a 37 ° C durante 48 h.
4. Después de la incubación, se contó el organismo recuperado y se expresó como \log_{10} de UFC/ml.

Estudio de reto microbiano: esta prueba siguió los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para pruebas germicidas NMX-BB-040-SCFI-1999, la cual, menciona que la carga microbiana viable inicial debe ser reducida en un 99.999% en 30 segundos de exposición usando los microorganismos de *E. coli* y *S. aureus*. El procedimiento para esta prueba fue el siguiente:

1. Con una pipeta estéril, 1 mL de cada suspensión microbiana fue transferido a 9 mL de la fórmula desinfectante que contenía 0.2% BC. Por consiguiente, se ajustaron diferentes tiempos experimentales (0,5, 1,0, 5,0 y 10,0 min).
2. En los puntos de tiempo correspondientes, se homogeneizó cada suspensión y se diluyó 1 ml de mezcla de cultivo con 9 ml de caldo neutralizante D / E.
3. Después se sembró 1 ml de la solución neutralizada y se extendió sobre placas de agar de soya tricapseína.

Incubación: en dos placas en condiciones aeróbicas a 35 ° C durante 48 h.

Conteo: Se contó el número resultante de colonias en crecimiento en cada placa y se calculó el porcentaje de reducción usando la carga microbiana inicial.

Controles:

- Positivos: microorganismos evaluados en paralelo utilizando agua desionizada.
- Negativos: desinfectantes comerciales (Lysol®; Benckiser, México y Dermocleen®; D.C.; Degasa, México).

Estudio de difusión en agar: este estudio se evaluó aplicando la prueba de difusión en agar bajo los siguientes pasos:

1. Se cultivaron 0.1 mL de organismos de prueba separados en placas de TSA (25 mL de TSA líquido por placa de Petri de 100 mm).
2. Pasados 30 min, se hicieron 3 agujeros de 7 mm de diámetro y 4 mm de profundidad por plato donde se agregaron 50 µL del desinfectante de prueba correspondiente por separado para cada organismo. Los inóculos estuvieron a 37 ° C durante 24 h.
3. Con un calibre electrónico digital se midieron las zonas de inhibición y se contaron con un contador de colonias de campo oscuro.

Preparación de superficies

Uno de los principales objetivos del desinfectante es la impregnación duradera de los agentes activos en superficies inanimadas, ejemplos de estas superficies son en telas (ropa de vestir, batas de laboratorio, cubrebocas); metales (acero inoxidable, acero, aluminio, cobre); y otros materiales (plásticos, maderas, resinas). Para este trabajo se comprobó la impregnación en las fibras de un cubrebocas quirúrgico. Para su visualización en el microscopio electrónico, la preparación de las mascarillas fue la siguiente:

1. La mascarilla utilizada es completamente nueva y se corta a una medida de 2 cm x 2 cm para cada una de las capas.
2. Las muestras son colocadas en un cristalizador para evitar el contacto con otras superficies.
3. Se impregna cada muestra con el desinfectante formulado en forma de goteo (Ilustración 10).
4. Cuando se seca la muestra por completo, se impregna de nuevo con el desinfectante. Este paso se repitió 3 veces para asegurar que las muestras han sido bien impregnadas.
5. Las muestras se guardan en una caja Petri hasta su análisis en el microscopio electrónico.

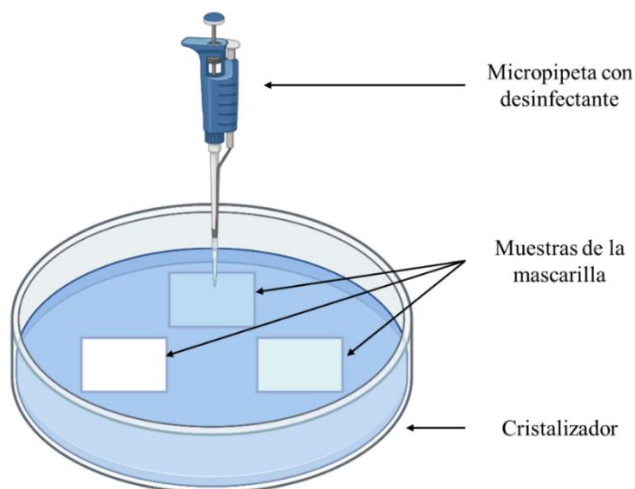


Ilustración 10 Muestras de mascarilla impregnadas con el desinfectante formulado (elaborado en Biorender)

Capítulo 4 Resultados y discusión

4.1. Formulación general

Para la formulación del desinfectante se realizó una revisión bibliográfica de los agentes químicos tradicionales, agentes inactivadores, y nuevas tendencias [88]. La formulación base y su comparación con otros desinfectantes frecuentes en el mercado son captados en la Tabla 3.

Tabla 3 Comparación de agentes activos, tipos y espectro

| Marca | Activos | Tipo | Espectro | Referencia |
|--|--|------------------------------------|---------------------------|------------|
| Lysol desinfectante en atomizador | Alquilo (50% C14, 40% C12, 10% C16) dimetil bencil amonio sacarinato | Compuesto de amonio cuaternario | Bacterias, hongos y virus | 89 |
| | Etanol | Alcohol | Bacteria, hongos y virus | 89 |
| Sanytol desinfectante | Cloruro de didecildimetilamonio | Compuesto de cuaternario de amonio | Bacterias, hongos y virus | 90 |
| Cimarrón desinfectante | - | Alcohol | Bacteria, hongos y virus | 91, 92 |
| | - | Derivados clorados | Bacteria, hongos y virus | 93, 94 |
| | - | Surfactantes | Bacteria, hongos y virus | 95, 96 |
| | - | Compuestos de amonio cuaternario | Bacterias, hongos y virus | 97, 98 |
| | - | Derivados bifenólicos | Bacterias y hongos | 99, 100 |
| | - | Metales nanoparticulados | Bacterias, hongos y virus | 101, 102 |

Como se puede observar los desinfectantes comerciales más comunes contienen uno o dos ingredientes activos, para los dos mostrados en la Tabla 3, el ingrediente activo es un compuesto de amonio cuaternario de 5ta generación y etanol. Como es conocido, el espectro de los compuestos de amonio cuaternario abarca las bacterias, hongos y virus, pero no son tan efectivos contra [103].

El desarrollo del desinfectante contiene un total de siete ingredientes activos que abarca todos los mecanismos de inactivación de bacterias, hongos, virus y esporas (Ilustración 11). Además de proporcionar un tiempo mayor de actividad, ya que varios de los ingredientes activos pueden durar más de 24 horas de acción. El porcentaje de la formulación base no será presentada ya que se encuentra bajo esquema de protección, sin embargo, para las primeras pruebas (pruebas de estabilidad), únicamente dos reactivos tuvieron una concentración variable con el fin de observar su comportamiento.

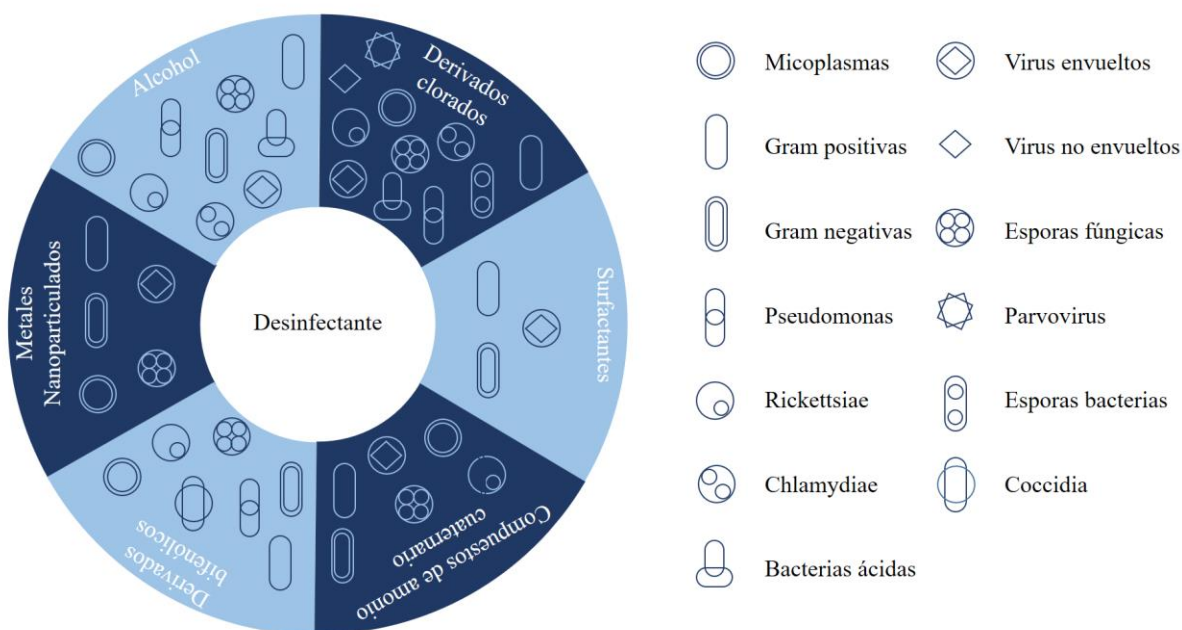


Ilustración 11 Espectro antimicrobiano teórico del desinfectante desarrollado

4.1.1. Pruebas de estabilidad

Después del procedimiento de mezclado, se continúa con la observación física del desinfectante. Los parámetros iniciales a inspeccionar fueron: conservación de una fase, turbidez de la muestra, y estabilidad a los rayos UV. Todos los parámetros fueron tomados justo después de su realización

y después de un mes de realizados y se calificó la apariencia de las formulaciones como mala, moderada, buena y excelente, siendo excelente si es completamente transparente. Todas las formulaciones se mantuvieron bajo temperaturas de laboratorio. Por consiguiente, se da una explicación de estos parámetros:

Conservación de fase: para el desinfectante que se planea formular, la incorporación de todos los reactivos debe mantenerse en una solución homogénea.

Turbidez de la muestra: el desinfectante ideal debe ser transparente. Se calificará el grado de transparencia como mala, moderada, buena y excelente justo después de la preparación y un mes después de ésta.

Estabilidad a los rayos UV: Algunos reactivos pueden ser sensibles a los rayos UV del sol y cambiar su coloración. Un ejemplo de estos reactivos que están presentes en la formulación son las nanopartículas metálicas.

Los resultados de estas observaciones son plasmados en la Tabla 4, donde se señalan como mala (-), moderada (+/-), buena (+), y excelente (++) . Para el número de fases, se puede observar que todas las formulaciones mantuvieron su estabilidad física en el momento de realizarlas y después de un mes; inclusive continúan con una fase después de este tiempo. En cuestión de la turbidez, la formulación 1 y 3 presentaron cierta turbidez, sin embargo, después de 1 mes, todas las formulaciones quedaron transparentes. Esto puede ser debido a la solubilidad de los componentes y la hidratación de las cadenas en los surfactantes, un fenómeno que será explicado con más detalle en el capítulo “Optimización”. Para la estabilidad a los rayos UV hubo resultados distintos, que son completamente dependientes de la concentración de los reactivos variables.

Tabla 4 Resultados de pruebas de estabilidad

| Parámetros | Inicial | | | | 1 mes | | | |
|-----------------|---------|----|-----|----|-------|----|----|----|
| | F1 | F2 | F3 | F4 | F1 | F2 | F3 | F4 |
| Número de fases | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Turbidez | - | + | +/- | ++ | + | ++ | ++ | ++ |
| Estabilidad UV | + | ++ | + | ++ | + | ++ | ++ | ++ |

Como conclusión de estos resultados, la Formulación 4 presentó las mejores características, ya que, en todos los parámetros evaluados, mostró tener las adecuadas características de un desinfectante. Por lo tanto, las siguientes pruebas se aplicarán a la Formulación 4.

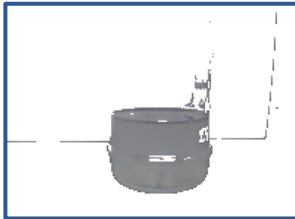

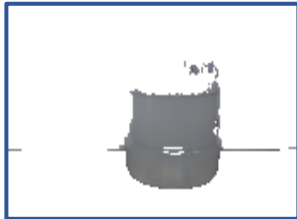
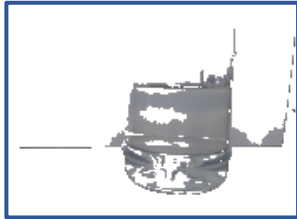







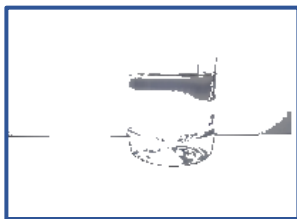
4.2. Optimización

Teniendo la formulación base, es necesario la optimización de ésta. La optimización tiene como propósito racionalizar la cantidad de cada reactivo mientras la integridad de la formulación final permanece con características ideales.

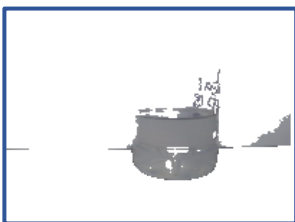
4.2.1. Turbidez

Los resultados del software de imagen son mostrados en la Tabla 5. Las imágenes en la tabla muestran el área definida por el líquido dentro de la botella. Como se observa, las muestras que presentaron una turbidez mayor, el color del área es de un gris más fuerte, además de que su valor de pixel (VP) es más alto. El VP más alto fue el 13.00 y el más bajo 3.00, este último, la mayor parte de la superficie de la solución es transparente, con excepción de la superficie del envase.

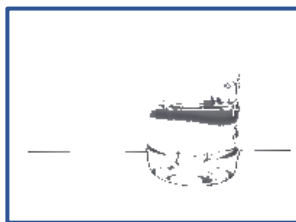
Tabla 5 Valores en pixeles (VP) de las muestras analizadas por el software de imágenes

| | | | |
|---|---|--|---|
| VP= 13 | VP= 5.69 | VP= 9.03 | VP= 13.15 |
|  |  |  |  |
| VP= 9.17 | VP= 3.49 | VP= 8.12 | VP= 13.91 |
|  |  |  |  |
| VP= 6.52 | VP= 3.04 | VP=3 | VP= 4.34 |
|  |  |  |  |

VP= 10.34



VP= 3.42



VP= 11.78



VP= 7.48



4.2.1.1. Diseño

El diseño factorial es no aleatorio y los resultados fueron sintetizados en la Tabla 6. Recordando que el valor más pequeño corresponde a una muestra transparente y conforme incrementa el valor aumenta la turbidez de la muestra. De las dieciséis muestras, la 11 fue la que tuvo el valor más bajo (transparente) y la 8 el valor más alto (turbia). Se observa que para la muestra 11, las concentraciones del alcohol y el surfactante no iónico estuvieron en el límite más alto, por el contrario, el agua y el surfactante catiónico en el límite más bajo. Para el caso de la muestra 8, todos los valores estuvieron en el límite superior con excepción de surfactante no iónico.

Tabla 6 Resultados del diseño factorial para la turbidez

| Corrida | Variables independientes computadas | | | | Variables dependientes medidas |
|---------|-------------------------------------|----|----|----|--------------------------------|
| | X1 | X2 | X3 | X4 | Turbidez |
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 13.87±1.21 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | -1 | 5.08±0.82 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | -1 | 10.60±1.36 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | -1 | 14.58±1.26 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | -1 | 9.47±0.61 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | -1 | 3.63±0.41 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | -1 | 7.41±0.92 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | -1 | 15.02±0.97 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | +1 | 5.96±0.95 |
| 10 | +1 | -1 | -1 | +1 | 3.15±0.12 |
| 11 | -1 | +1 | -1 | +1 | 2.83±0.35 |
| 12 | +1 | +1 | -1 | +1 | 4.35±0.03 |
| 13 | -1 | -1 | +1 | +1 | 11.06±0.69 |
| 14 | +1 | -1 | +1 | +1 | 3.66±0.26 |

| | | | | | |
|----|----|----|----|----|------------|
| 15 | -1 | +1 | +1 | +1 | 12.07±0.26 |
| 16 | +1 | +1 | +1 | +1 | 7.33±0.96 |

4.2.1.2. ANOVA turbidez

Interacción de 4 términos (Apéndice 1): Por el software utilizado (MINITAB 19), la interacción de 4 términos es el primer resultado para el diseño factorial propuesto. Se observa, que, el valor F y valor P no tienen resultado, esto es debido a que no existe alguna consideración. El objetivo de ANOVA es encontrar qué interacciones tienen mayor impacto en el producto final, este impacto se ve reflejado con un valor de $p < 0.05$. En sistemas como desinfectantes, donde la turbidez es alterada por los hidrotropos o surfactantes, la primera consideración a realizar es excluir la interacción por 4 términos.

Interacción de 3 términos (Apéndice 2): Al realizar la primera consideración, el software arroja los primeros valores para F y P. Se aprecia que, las interacciones lineales y las de 2 términos se acercan a la meta de 0.05, incluso, un término en la interacción de 2 términos presenta un valor de 0.047 (Alcohol*Agua). Por lo tanto, en el caso de la turbidez de la muestra, las interacciones de 3 términos no alteran al desinfectante, por esta razón, las interacciones de 3 términos son excluidas.

Interacción de 2 términos (Tabla 7): Eliminando la interacción de 4 y 3 términos, y aislando las interacciones que presentaron un valor más alejado de significancia, fue posible obtener un modelo satisfactorio de turbidez (lineal = 0.036, $p < 0.05$; 2 términos = 0.020, $p < 0.05$). En la lineal es el surfactante no iónico y en la de 2 términos la combinación de alcohol*agua, por ende, para el caso de la formulación, ANOVA indica que los reactivos que alteran la transparencia/turbidez son el alcohol-agua y el surfactante no iónico. Estos resultados proporcionan una comprensión de la influencia de cada elemento o la unión de estos para alterar las propiedades físicas de la formulación general.

Tabla 7 ANOVA de interacción de 2 términos para la turbidez

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo | 10 | 195.038 | 19.504 | 3.85 | 0.075 |
| Lineal | 4 | 80.437 | 20.109 | 3.97 | 0.081 |

| | | | | | |
|------------------------------------|----|---------|--------|-------|-------|
| Alcohol | 1 | 16.892 | 16.892 | 3.33 | 0.127 |
| Agua | 1 | 16.281 | 16.281 | 3.21 | 0.133 |
| S. Cationico | 1 | 6.175 | 6.175 | 1.22 | 0.320 |
| S. No iónico | 1 | 41.088 | 41.088 | 8.11 | 0.036 |
| Interacciones de 2 términos | 6 | 114.602 | 19.100 | 3.77 | 0.083 |
| Alcohol*Agua | 1 | 57.532 | 57.532 | 11.35 | 0.020 |
| Alcohol*S. Cationico | 1 | 2.088 | 2.088 | 0.41 | 0.549 |
| Alcohol*S. No iónico | 1 | 6.605 | 6.605 | 1.30 | 0.305 |
| Agua*S. Cationico | 1 | 11.560 | 11.560 | 2.28 | 0.191 |
| Agua*S. No iónico | 1 | 5.736 | 5.736 | 1.13 | 0.336 |
| S. Cationico*S. No iónico | 1 | 31.081 | 31.081 | 6.13 | 0.056 |
| Error | 5 | 25.334 | 5.067 | | |
| Total | 15 | 220.372 | | | |

4.2.1.3. Diagrama de Pareto de efectos turbidez

El diagrama de Pareto de la Ilustración 12 muestra que los resultados tienen la misma tendencia que los de ANOVA, mostrando la combinación de alcohol-agua, surfactante catiónico-no iónico y el surfactante no iónico como los factores más cruciales en la turbidez de la formulación.

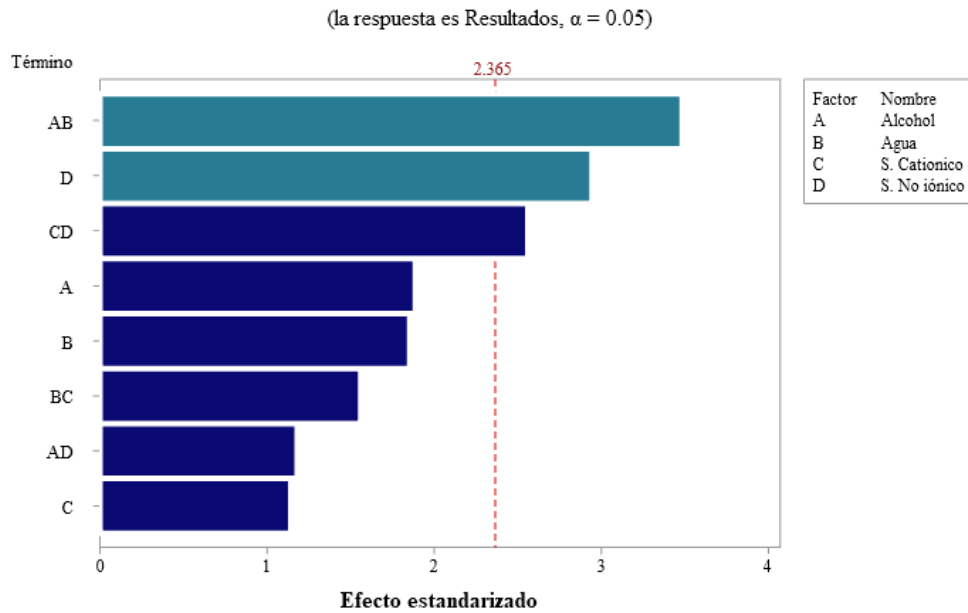


Ilustración 12 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados de la turbidez

4.2.1.4. Efectos normales estadísticos turbidez

Un complemento del diagrama de Pareto es el diagrama normal y la ecuación de regresión (Ilustración 13 y Ecuación 1) ya que, además de proporcionar magnitud y efecto, proporciona dirección. En otras palabras, se sabe si el factor incide positivamente o negativamente en la formulación general. Como se puede observar en la Ilustración 13, la combinación de alcohol y agua y surfactante catiónico tienen un efecto positivo, esto quiere decir que, al aumentar su concentración, aumenta la turbidez de la formulación. Por el contrario, el surfactante no iónico por sí solo afecta negativamente a la turbidez; por lo tanto, al aumentar su concentración, la turbidez de la formulación disminuye.

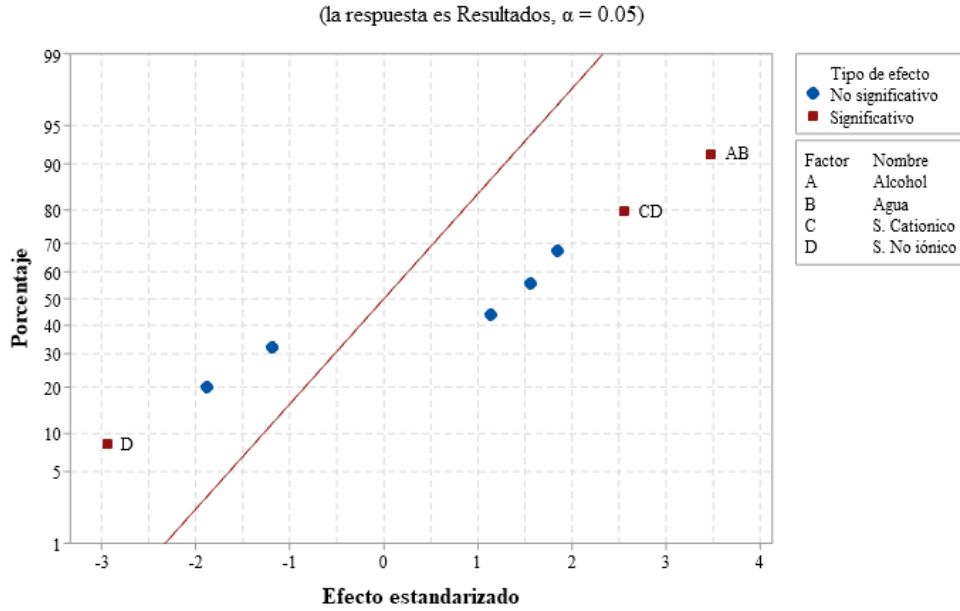


Ilustración 13 Gráfica normal de efectos estandarizados para la turbidez

Ecuación 1 Ecuación de regresión para la turbidez

$$\text{Results} = 7.843 - 1.027 \text{ EtOH} + 1.009 \text{ H}_2\text{O} + 0.621 \text{ BC} - 1.602 \text{ TX-100} + 1.896 \text{ EtOH} * \text{H}_2\text{O} - 0.643 \text{ EtOH} * \text{TX-100} + 0.850 \text{ H}_2\text{O} * \text{BC} + 1.394 \text{ BC} * \text{TX-100}$$

4.2.1.5. Herramienta de optimización MINITAB 19

El software MINITAB-19 contiene una herramienta llamada “Optimización”, con ella, es posible poner un valor deseado de los resultados y ajustar los ingredientes entre el intervalo de los valores límites en el diseño. Recordando que en el diseño la transparencia de la muestra fue para un valor de pixel de 3.00, el valor deseado será 3.5.

Tabla 8 Valor deseado y experimental de la herramienta optimización

| Valores | Turbidez |
|--------------------|----------|
| Valor deseado | 3.5 |
| Valor experimental | 3.3 |
| Error | 5.71% |





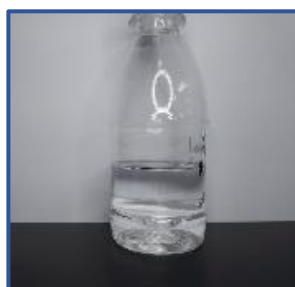

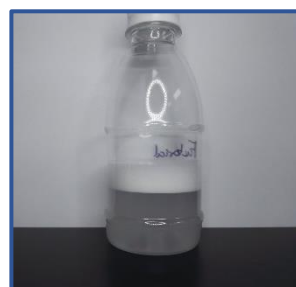



Después de preparar la solución de acuerdo a los valores asignados por la herramienta optimización, los resultados fueron plasmados en la Tabla 8. Sólo se obtuvo un error de 5.71%

entre el deseado y el experimental, que, por inspección visual, imposible notar la diferencia. Por lo que se pudo llegar a la optimización de todos los reactivos en cuestión de turbidez.

4.2.2. Espumado

En el caso de la producción de espuma, el registro de los resultados es mostrados en la Tabla 9. Es apreciable que, para la mayoría de las muestras, los niveles de espumado (NE) más altos los presentan las muestras con un grado de turbidez considerable.

Tabla 9 Muestras después de la medición del espesor de la espuma y nivel de espuma (NE) en cm

| | | | |
|---|---|--|---|
| NE=1.42 | NE=0.05 | NE=5.80 | NE=0.05 |
|  |  |  |  |
| NE=1.67 | NE=0.05 | NE=4.07 | NE=1.18 |
|  |  |  |  |
| NE=0.05 | NE=0.05 | NE=6.17 | NE=0.05 |
|  |  |  |  |
| NE=1.20 | NE=0.05 | NE=2.50 | NE=0.07 |



4.2.2.1. Diseño

Para el espumado el diseño factorial siguió siendo no aleatorio y los resultados fueron sintetizados en la Tabla 10. Después de la agitación y esperar 5 minutos, las medidas del espesor de espuma rondaron entre 0.05 y 6.17. Para el espesor de espuma más pequeño, varias muestras presentaron este valor (2, 4, 6, 8, 9, 12, 14), coincidiendo con las muestras que presentaban el límite más alto del alcohol, con excepción de la 9. La muestra que presentó mayor espuma fue la 11 con un espesor de 6.17 cm, seguido de la 3 (5.80 cm) y 7 (4.07), correspondiendo el valor límite más pequeño el alcohol y límite máximo el agua. Sin embargo, para todos los casos, se observó que la espuma no era persistente, puesto que después de un par de horas, todas las muestras perdían la espuma completamente.

Tabla 10 Resultados del diseño factorial para el espumado

| Corrida | Variables independientes computadas | | | | Variables dependientes medidas |
|---------|-------------------------------------|----|----|----|--------------------------------|
| | X1 | X2 | X3 | X4 | Espesor de espuma (cm) |
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1.42±0.51 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | -1 | 0.05±0.00 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | -1 | 5.80±0.61 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | -1 | 0.05±0.00 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | -1 | 1.67±0.29 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | -1 | 0.05±0.00 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | -1 | 4.07±0.82 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | -1 | 1.18±0.29 |

| | | | | | |
|----|----|----|----|----|-----------|
| 9 | -1 | -1 | -1 | +1 | 0.05±0.00 |
| 10 | +1 | -1 | -1 | +1 | 0.05±0.00 |
| 11 | -1 | +1 | -1 | +1 | 6.17±1.15 |
| 12 | +1 | +1 | -1 | +1 | 0.05±0.00 |
| 13 | -1 | -1 | +1 | +1 | 1.20±0.27 |
| 14 | +1 | -1 | +1 | +1 | 0.05±0.00 |
| 15 | -1 | +1 | +1 | +1 | 2.50±0.70 |
| 16 | +1 | +1 | +1 | +1 | 0.07±0.03 |

4.2.2.2. ANOVA espumado

Interacción de 4 términos (Apéndice 3): Como en el caso de la turbidez, en el espumado, de acuerdo a las condiciones del diseño factorial, la interacción con 4 términos no arrojó valores de F y P, por lo que, la influencia de los 4 ingredientes a la vez no tiene un valor significativo en la producción de espuma.

Interacción de 3 términos (Apéndice 4): A diferencia de la turbidez, para la interacción de 3 términos, ninguna interacción estuvo cerca de la condición de 0.05, por lo que, una interacción entre 3 ingredientes no tiene influencia en la producción de espuma.

Interacción de 2 términos (Tabla 11): Al interactuar únicamente dos términos, ANOVA revela que los reactivos con mayor influencia son lineales. Para el caso del valor lineal, éste alcanzó el valor de significancia, pero el de 2 vías permaneció distante de él. Al aislar las interacciones más lejos del valor de significancia, se obtuvo un valor más próximo al de significancia para la interacción lineal (alcohol: 0.009 y agua: 0.031; $p < 0.05$), pero la de 2 vías permaneció distante del valor de significancia, por lo tanto, puede dar una primera aproximación de que la producción de espuma es alcohol y agua.

Tabla 11 ANOVA de interacción de 2 términos para el espumado

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo | 10 | 78.4303 | 7.8430 | 3.58 | 0.086 |
| Lineal | 4 | 58.3144 | 14.5786 | 6.65 | 0.031 |

| | | | | | |
|------------------------------------|----|---------|---------|-------|-------|
| Alcohol | 1 | 37.3627 | 37.3627 | 17.05 | 0.009 |
| Agua | 1 | 17.5352 | 17.5352 | 8.00 | 0.037 |
| S. Cationico | 1 | 1.1289 | 1.1289 | 0.52 | 0.505 |
| S. No iónico | 1 | 2.2877 | 2.2877 | 1.04 | 0.354 |
| Interacciones de 2 términos | 6 | 20.1159 | 3.3527 | 1.53 | 0.329 |
| Alcohol*Agua | 1 | 11.8164 | 11.8164 | 5.39 | 0.068 |
| Alcohol*S. Cationico | 1 | 3.2852 | 3.2852 | 1.50 | 0.275 |
| Alcohol*S. No iónico | 1 | 0.6602 | 0.6602 | 0.30 | 0.607 |
| Agua*S. Cationico | 1 | 3.1952 | 3.1952 | 1.46 | 0.281 |
| Agua*S. No iónico | 1 | 0.0827 | 0.0827 | 0.04 | 0.854 |
| S. Cationico*S. No iónico | 1 | 1.0764 | 1.0764 | 0.49 | 0.515 |
| Error | 5 | 10.9583 | 2.1917 | | |
| Total | 15 | 89.3886 | | | |

4.2.2.3. Diagrama de Pareto de efectos espumado

El diagrama de Pareto de Ilustración 14 muestra que los resultados tienen la misma tendencia que los de ANOVA, mostrando el alcohol como el factor más crucial, por consiguiente, el agua y la combinación de estos.

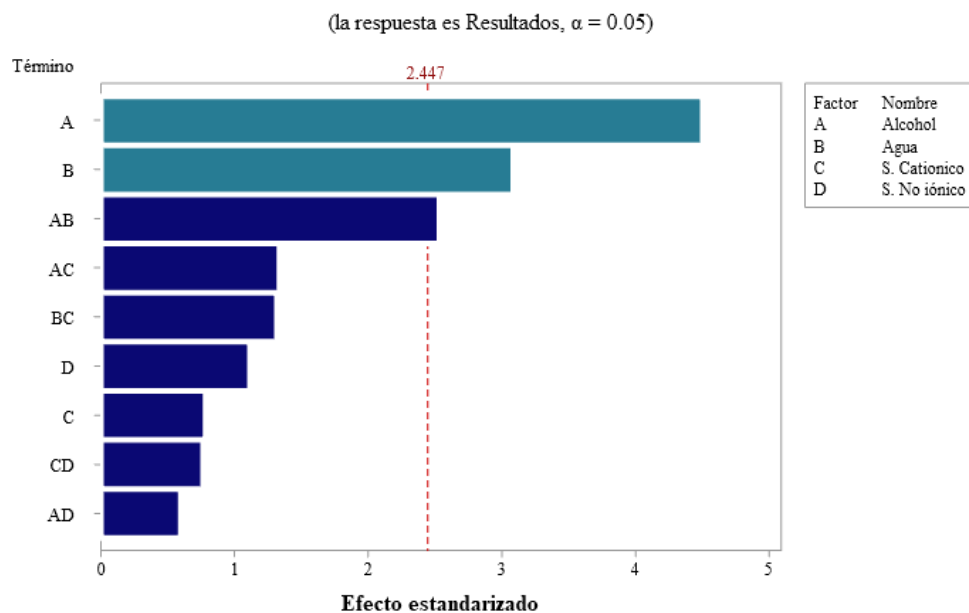


Ilustración 14 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el espumado

4.2.2.4. Efectos normales estadísticos espumado

La gráfica de efectos normales estandarizados (Ilustración 15) muestra los ingredientes que alteran de mayor manera la formulación final. Es apreciable que el alcohol, el agua y la combinación de estos fueron los más importantes. Además de confirmar las primeras conclusiones asignadas por ANOVA y el diagrama de Pareto, la gráfica de efectos normales muestra si estos reactivos afectan de manera negativa o positiva la producción de espuma. Si beneficia el espumado, se dice que el ingrediente afecta de manera positiva, en cambio, evita el espumado, el ingrediente tendrá un efecto negativo. Con esto en mente, es notable que el agua tiene un efecto positivo y el alcohol un efecto negativo. Estas aseveraciones también son interpretadas por la ecuación de regresión (Ecuación 2), donde el sentido negativo y positivo del reactivo lo proporciona el signo del ingrediente.

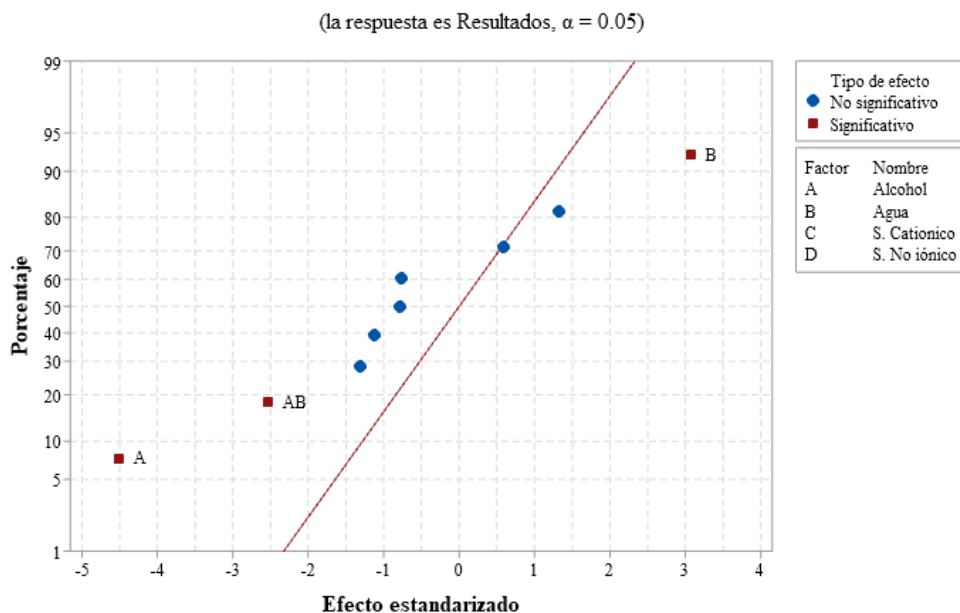


Ilustración 15 Gráfica normal de efectos estandarizados del espumado

Ecuación 2 Ecuación de regresión para el espumado

Results = $1.766 - 1.528 \text{ EtOH} + 1.047 \text{ H}_2\text{O} - 0.266 \text{ BC} - 0.378 \text{ TX} - 100 - 0.859 \text{ EtOH} * \text{H}_2\text{O} + 0.453 \text{ EtOH} * \text{BC} + 0.203 \text{ EtOH} * \text{TX} - 100 - 0.447 \text{ H}_2\text{O} * \text{BC} - 0.259 \text{ BC} * \text{TX} - 100$

4.2.2.5. Herramienta de optimización de MINITAB 19

Como en el caso de la turbidez, el espumado fue puesto a prueba por la herramienta de optimización. Considerando el rango obtenido por el espumado, donde 0.05 cm fue de la muestra con el espumado más bajo, el valor deseado fue de 0.1 cm.

Tabla 12 Valor deseado y experimental de la herramienta optimización

| Valores | Turbidez |
|--------------------|----------|
| Valor deseado | 0.1 |
| Valor experimental | 0.095 |
| Error | 5.00% |

Después de preparar la solución de acuerdo a los valores asignados por la herramienta optimización, los resultados fueron plasmados en la Tabla 12. El error entre el valor deseado y el

experimental fue de solamente 5.00%, que, de igual manera, al realizar la inspección visual, el espesor de la diferencia no era notoria, además que, la espuma no permanecía por más de 1 minuto.

4.3. Importancia de los resultados estadísticos por diseño factorial en el desinfectante

4.3.1. Turbidez

Con base a los resultados estadísticos, donde los reactivos con mayor influencia en la turbidez fueron el agua, el alcohol y el surfactante no iónico, es interesante conocer a qué se deben estos resultados. Para esto, es fundamental considerar el concepto de punto nube, ya que, describe perfectamente la turbidez de las soluciones. El punto de nube es una característica esencial en la estabilidad de las mezclas donde los solutos interactúan como un elemento que contribuye a la turbidez de la disolución, ejemplos de estos solutos son los surfactantes implementados (en especial los no iónicos). Otro elemento importante es la temperatura del sistema, ya que, el equilibrio de los surfactantes es, en parte, proporcional a la temperatura ambiental [104, 105].

Las modificaciones del punto de nube antes mencionadas, surgen de la alteración estructural y ambiental de una micela, que, tienen como resultado la alteración de la estabilidad del sistema [106, 107]. No obstante, podemos evidenciar que el color del desinfectante cambia cuando la humectabilidad de la mezcla aumenta o disminuye, como se describe en estudios previos [108]. Curiosamente, agregando un hidrotropo a un sistema binario surfactante no iónico-agua podemos reducir la turbidez en la solución debido a la propiedad intrínseca de aumentar la solubilidad dispersando los compuestos orgánicos en el agua. Además, en el desinfectante desarrollado, explicamos que, el cambio de solubilidad se debe a la humectabilidad y efecto emulsionante que brindan las cadenas de polioxietileno y al aumento de las micelas del surfactante no iónico (Ilustración 16) [109]. Además, la incorporación de las cadenas estructurales del surfactante no iónico aporta una conformación molecular importante al sistema agua-alcohol que promueve una disolución estable a temperatura ambiente.

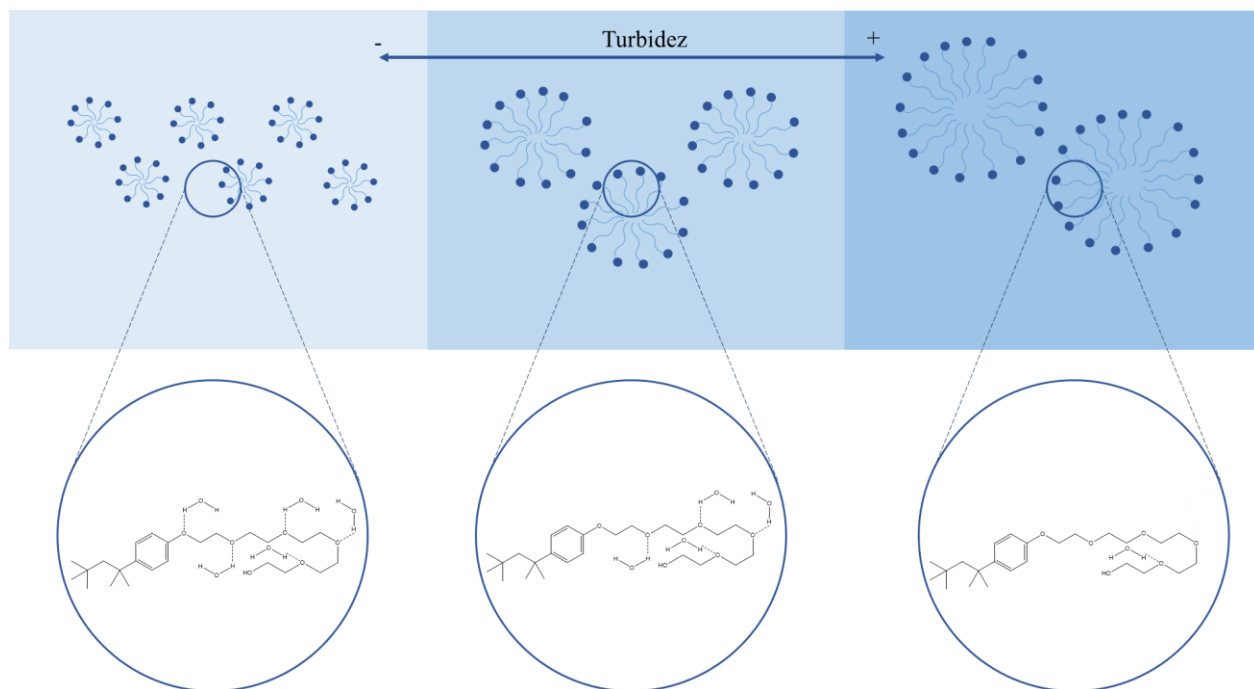


Ilustración 16 Efecto de la humectabilidad de las cadenas polioxietileno en la turbidez

En el caso del otro surfactante (catiónico), se observa (por los resultados estadísticos y visuales) que no afectó la turbidez de la solución, ya que, al variar la relación no iónica, el surfactante catiónico se expresa como una constante, algo reportado con anterioridad [110, 111].

4.3.2. Espumado

A pesar que las investigaciones sobre la producción de espuma se profundizaron hace poco tiempo, se han tenido grandes avances respecto al entendimiento de su mecanismo. En el caso del desinfectante en estudio, su formulación contiene solutos que pueden ser clasificados como promotores de la producción de espuma, caso de éstos, son los surfactantes utilizados [112].

Retomando los resultados obtenidos por el diagrama de Pareto, la gráfica normal de efectos estandarizados y el gráfico de contornos, tenemos que, el alcohol y el agua tuvieron la máxima relevancia en la producción de espuma. A primera instancia, se podría pensar que, los surfactantes tuvieran el primer lugar, sin embargo, los resultados pueden ser explicados por el concepto de drenado (drained) en espumas; este concepto describe a la espuma como una red lamelar de aire, surfactante y líquido [113]. Para el proceso de formado de la espuma, el aire inyectado a la solución por métodos mecánicos, como el mezclado de los reactivos y propiamente al agitado usado para este trabajo, se transforman en burbujas, que a su vez tienden a subir a la superficie debido a su

densidad. Sin embargo, estas burbujas son envueltas por el surfactante debido a su estructura. Las burbujas se van agrupando hasta generar lo que se conoce como espuma, entre la espuma se pueden observar un canal que divide una burbuja de otra, este canal está formado de la disolución (Ilustración 17) [114, 115]. El concepto de drenado menciona que, dependiendo de las características de la solución, por ejemplo, su viscosidad, aumentará o disminuirá la rapidez con la que estos canales se vacían, haciendo que el espacio entre cada burbuja se vaya reduciendo hasta el punto que sea imposible la subsistencia de la fase lamelar [116].

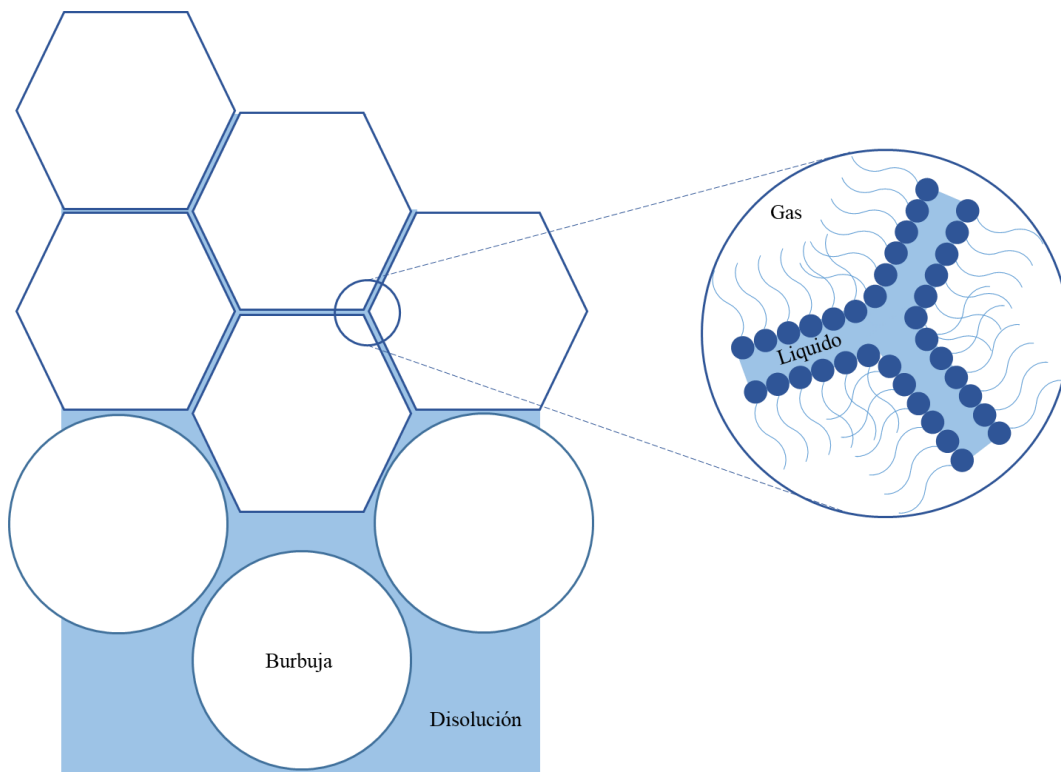


Ilustración 17 Partes de la espuma y fenómeno de drenado

Como se abordó, la baja viscosidad incrementa la rapidez del drenado de los canales, por lo tanto, el aumento de la cantidad de alcohol (un hidrotropo) en la mezcla final reduce la viscosidad por tensión superficial, explicando porque el incremento de alcohol tiene un efecto negativo para la producción de espuma. A su vez, analizando el segundo reactivo con mayor importancia para el espumado (agua), se atribuye su influencia positiva precisamente al reducir la concentración del hidrotropo en la solución final.

Haciendo una relación entre los resultados estadísticos y visuales de las muestras (Tabla 5), se llegó a la aseveración de que las muestras con mayor turbidez presentaban mayor producción de

espuma. Si bien, una explicación de esto se puede hacer con los puntos mencionados anteriormente, otra posible explicación es ilustrada por los diagramas ternarios, donde se observa que, generalmente, el agua y los surfactantes no iónicos son miembros ordinarios; en cambio, la concentración micelar crítica es casi significativa para el porcentaje de agua [117, 118]. El espumado está relacionado con la proximidad del punto de enturbiamiento, donde hay dos fases, una con un alto grado de micelas y otra con un bajo grado actuando como bloqueador de la formación de espuma [118].

Pruebas microbiológicas

¿Por qué los siguientes microorganismos? De acuerdo a la Tabla 13, para probar la eficacia de los desinfectantes se propusieron cuatro bacterias; tres Gram negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) y una Gram positiva (*S. aureus*), en conjunto con una levadura (*C. albicans*). Relacionando los microorganismos usados en esta prueba con los que provocan las infecciones nosocomiales en hospitales mexicanos de acuerdo a los datos recolectados, se observa que, el espectro representa el 71% de las infecciones nosocomiales en hospitales mexicanos de tercer nivel, por lo tanto, el desinfectante formulado abarcará un espectro importante.

Tabla 13 Microorganismos evaluados y su impacto en las infecciones nosocomiales

| Nombre | Tipo | Causas a la salud | Posición en las infecciones nosocomiales |
|--------------------------------------|----------|--|--|
| <i>C. albicans</i> (hongo diploide) | Hongo | Candidiasis | 9% |
| <i>E. coli</i> (Gram negativa) | Bacteria | diarrea | 24% |
| <i>K. pneumoniae</i> (Gram negativa) | Bacteria | Infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones del tejido blando e infecciones de herida quirúrgica | 9% |
| <i>S. aureus</i> (Gram positiva) | Bacteria | Infecciones cutáneas y de las mucosas | 14% |
| <i>P. aeruginosa</i> (Gram negativa) | Bacteria | Dermatitis | 15% |

Desafío microbiano

Una característica de suma importancia de la eficacia de los desinfectantes es su viabilidad de reducción integral del 99,999% durante un máximo de 30 s. En base a esto, aplicamos la prueba de desafío microbiano para la formulación seleccionada, lo que resultó en una reducción del 99.999% para los microorganismos evaluados.

Halo de inhibición

Para este análisis, las muestras fueron tejidos de mascarillas impregnados con los desinfectantes. La nomenclatura usada en las Ilustraciones 18 y 19 es la siguiente:

Las diferencias significativas marcadas con asteriscos o arroba representan que hubo evidencia que realmente representa una diferencia entre los cultivos.

@: diferencias significativas entre desinfectantes.

*: sugiere cambios estadísticos, pero no permite ser significativo, ya que un dato puede caer en el diámetro del otro.

** : indica cambios contra un desinfectante.

***: indica diferencias considerables contra un desinfectante

Los gráficos muestran los halos de inhibición en milímetros, separados por microorganismos y comparados por desinfectantes comerciales, donde la difusión del desinfectante y la diferencia de concentración a la distancia (mayor concentración en el centro de la muestra) expresan la disminución del crecimiento de las colonias en las cajas Petri.

De forma general, el incremento de la concentración del surfactante catiónico incrementa significativamente la actividad microbiana, concluyendo que, el incremento del surfactante catiónico juega un papel importante en la inhibición microbiana, teniendo resultados equiparables con dos marcas comerciales; y en algunos microorganismos, superiores a estas marcas. Si se analizan los resultados por microorganismo, tenemos que:

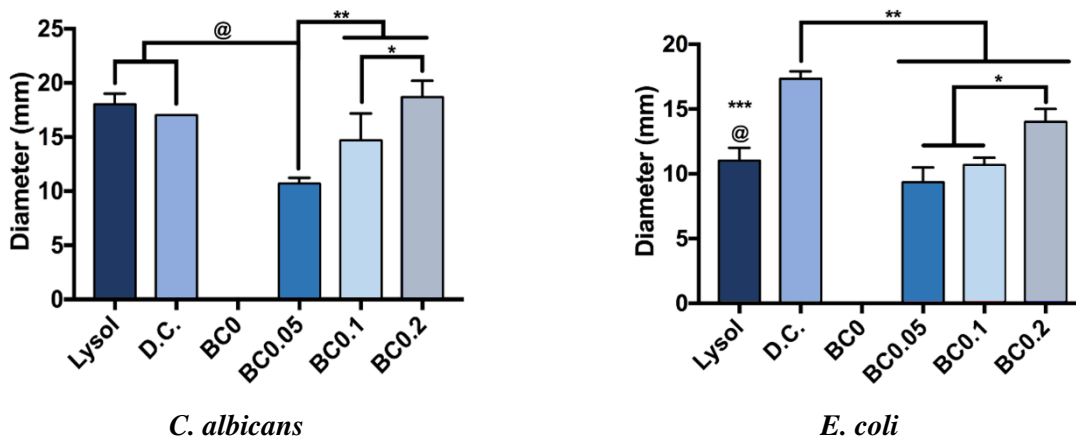
C. albicans: Se observó que el incremento de la concentración del surfactante catiónico influyó en la expansión del diámetro del halo de inhibición, incrementando de 10 mm a 18 mm, superando a los desinfectantes comerciales.

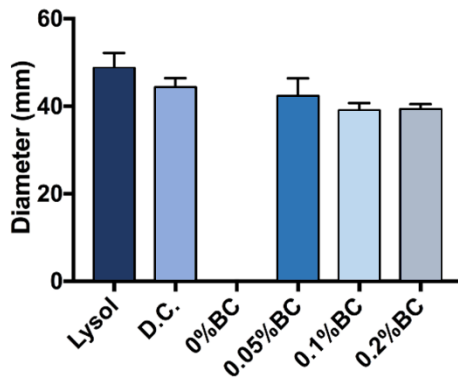
E. coli: De la misma manera que para *C. albicans*, en *E. coli*, el incremento de la concentración del surfactante catiónico incrementó el halo de inhibición de 10 mm a 15 mm, superando al desinfectante Lysol a partir de la concentración de 0.1, pero siendo superado por D.C. con un halo de inhibición de 17 mm.

K. pneumoniae: A diferencia de los anteriores microorganismos, para la *K. pneumoniae*, el incremento de la concentración no influyó en la actividad microbiana, incluso, la menor concentración fue la que dio mejor resultado (40 mm). Además de no haber superado a los desinfectantes comerciales. No obstante, se aprecia que el rango del gráfico es 2 a 3 veces mayor al rango de *C. albicans* y *E. coli*, hablando de la poca resistencia que tiene esta bacteria frente a los desinfectantes a prueba.

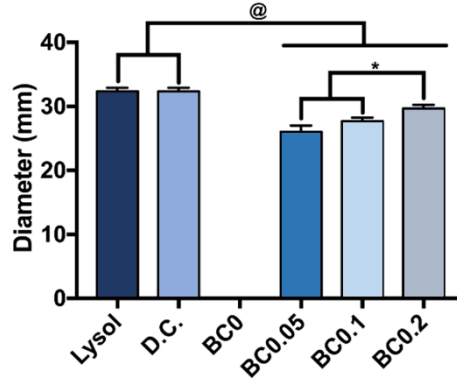
S. aureus: De la misma manera que para *K. pneumoniae*, *S. aureus* mostró un rango de halo de inhibición hasta los 40 mm, donde si incrementó la actividad microbiana por aumento de la concentración del surfactante catiónico. Teniendo 25 mm para 0.05% hasta 28 mm para 0.2% de surfactante catiónico. Comparando los resultados con los otros desinfectantes, se aprecia que sus resultados son equiparables.

P. aeruginosa: Para esta bacteria, la resistencia frente a los desinfectantes aumentó, ya que el rango del diámetro disminuyó a 20 mm y el incremento de la concentración del surfactante catiónico no mostró una influencia consistente, siendo el mejor valor para la concentración menor (15 mm). Sin embargo, para esta bacteria, el desinfectante formulado presentó mejor resultados que los desinfectantes comerciales.

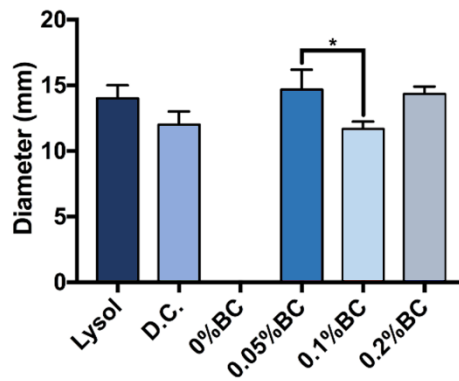




K. pneumoniae



S. aureus

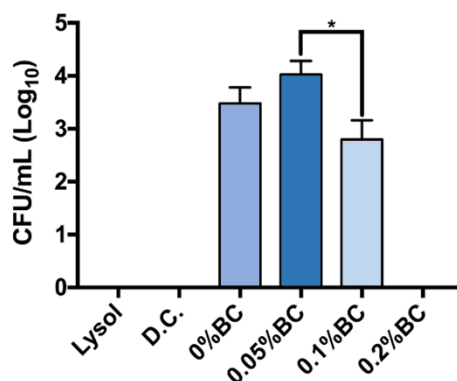
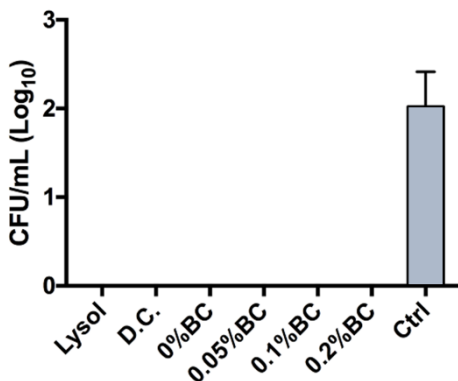


P. aeruginosa

Ilustración 18 Halo de inhibición (mm) para diferentes concentraciones del surfactante catiónico y desinfectantes comerciales

Unidades formadoras de colonias

Para los resultados de las unidades formadoras de colonias, la concentración más alta de surfactante catiónico mostró nulo crecimiento para todos los microorganismos evaluados. En cambio, para concentraciones inferiores, se presenta algún tipo de crecimiento. Esto se puede justificar en función a los resultados obtenidos.



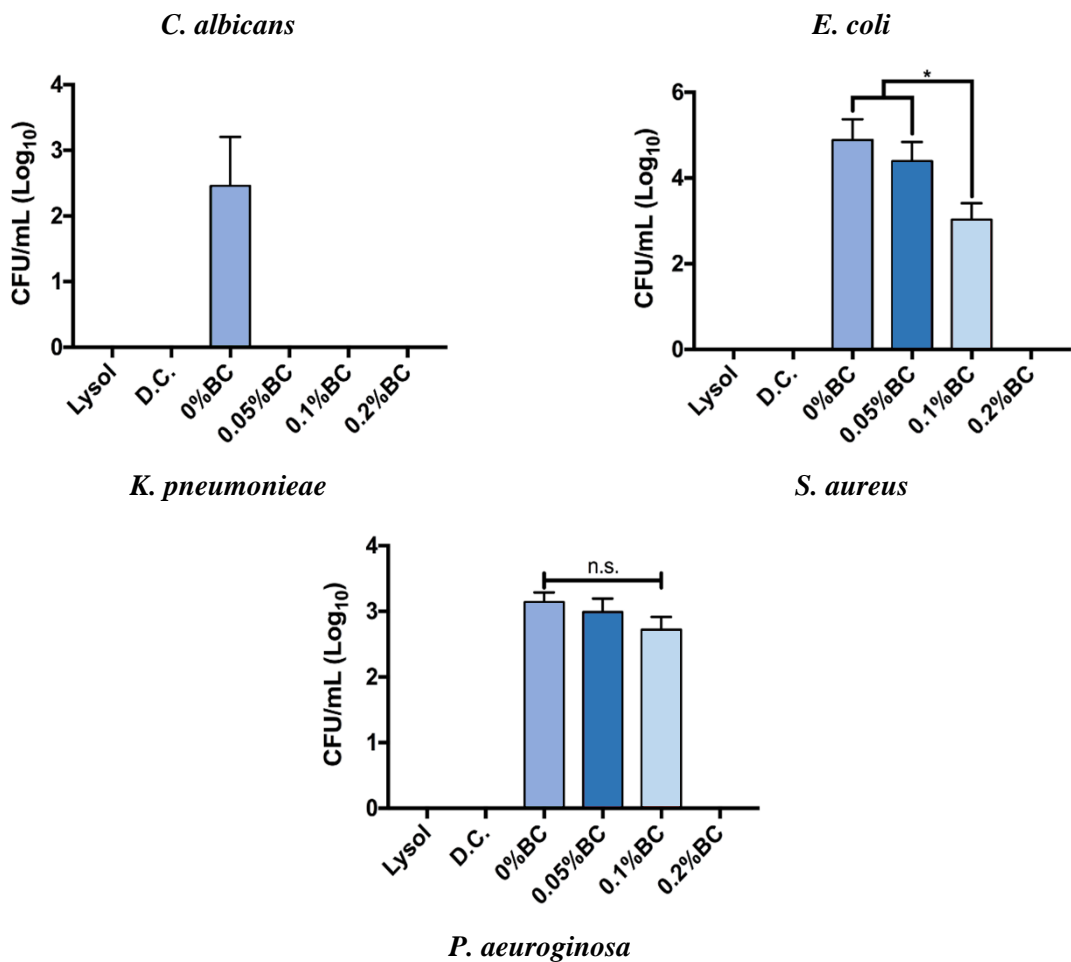


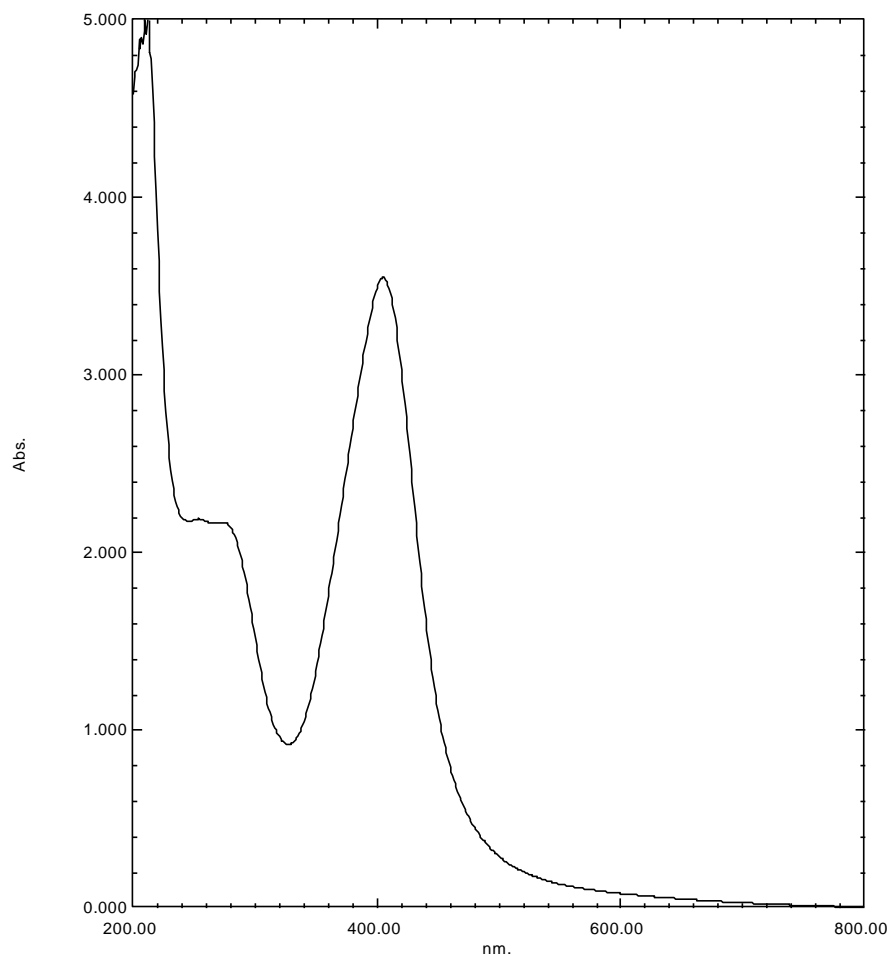
Ilustración 19 Log₁₀ Unidades formadoras de colonias para diferentes concentraciones del surfactante catiónico y desinfectantes comerciales

Sinergia

Nanopartículas

UV-Vis

La técnica de caracterización de UV-Vis, es obligatoria en el análisis de nanopartículas, ya que da el primer indicio de la presencia de la nanopartícula del elemento buscado debido a la excitación del plasmon de resonancia.



Absorbancia: 3.551

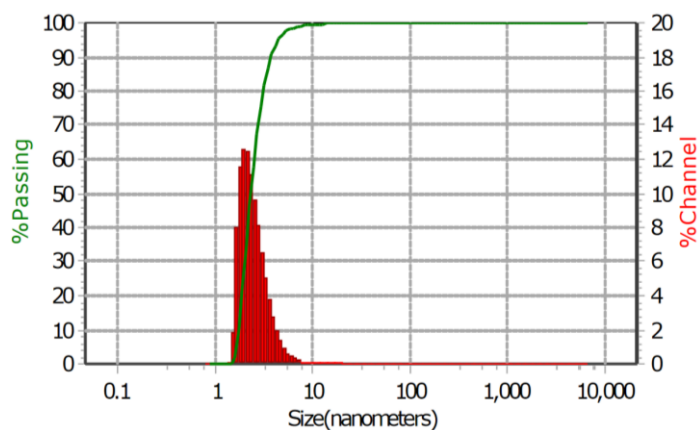
Longitud de onda: 405 nm

Ilustración 20 Espectro UV-visible para las nanopartículas sintetizadas

Como se muestra en la Ilustración 20, en el intervalo seleccionado (200 nm – 800 nm), se observa un pico definido con una absorbancia de 3.551 a una longitud de onda de 405 nm comprobando la presencia de nanopartículas del elemento esperado. Además de la presencia de nanopartículas, se puede suponer que la muestra contiene nanopartículas con un tamaño uniforme debido al ancho de la curva y que la utilización del agente reductor y estabilizador fueron ideales, ya que en la parte orgánica del espectro (200-300), no hay picos que opaquen al pico de 405 nm.

DLS

Los resultados obtenidos por la técnica de barrido de luz dinámico son esenciales en la caracterización de nanopartículas, ya que proporcionan la estabilidad, tamaño, carga, movilidad, hasta un acercamiento de su forma, características imprescindibles de un coloide (Ilustración 21).



Potencial Zeta: 44.6 mV

Polaridad: Negativa

Tamaño: 2.32 nm

Ilustración 21 Distribución de tamaño de partícula para las nanopartículas sintetizadas

Los resultados arrojaron un tamaño de partícula de 2.32 nm, siendo su distribución uniforme, ya que el 100% se encuentra en este rango. Siguiendo el criterio que, para un sistema coloidal, una buena estabilidad se obtiene con un potencial $Z > \pm 30$ mV, la estabilidad de las nanopartículas sintetizadas es excelente, ya que, se obtuvo un potencial Z de 44.6 mV. También, la polaridad obtenida es la ideal, ya que, al ser negativa, seguramente por los grupos hidroxilo del agente estabilizador, pueden funcionar como anclaje en las superficies lipídicas de bacterias y virus con envoltura (membrana lipídica con carga positiva).

FTIR

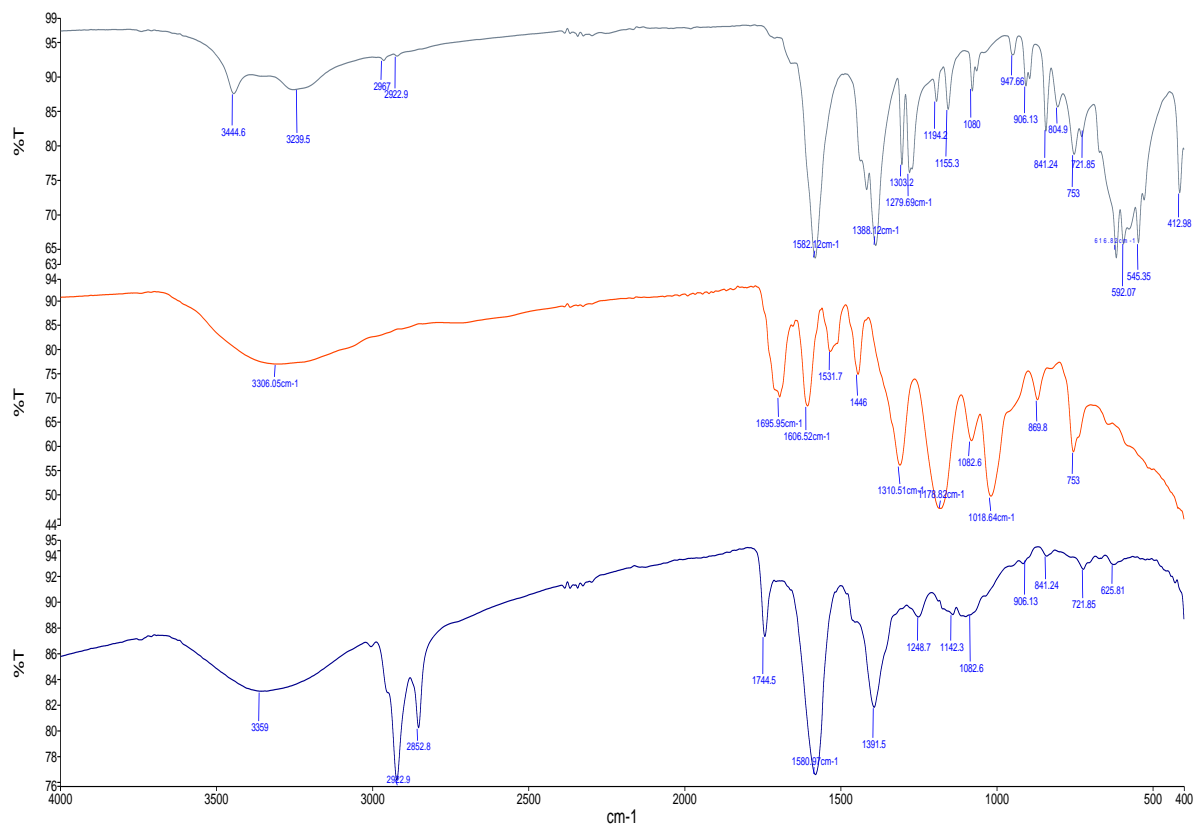


Ilustración 22 Espectro infrarrojo del agente reductor, estabilizante y nanopartículas

Tabla 14 Longitudes de onda con tipo de bandas para el agente reductor

| Reductor (cm-1) | Banda | Tipo de banda |
|--------------------|-------|--------------------------------|
| 1695.95 | C=O | Ácidos carboxílicos aromáticos |
| 1606.52 | C=O | Sales carboxílicas |
| 1310.51 | C-O | Ácidos carboxílicos |
| 1178.82 | C-X | Fluoralquenos |
| 1018.64 | C-O | Alcoholes primarios |

Tabla 15 Longitudes de onda con tipo de bandas para el agente estabilizador

| Estabilizador (cm-1) | Banda | Tipo de banda |
|-------------------------|-------|--------------------|
| 1582.12 | C=O | Sales carboxílicas |

| | | |
|---------|-----|--------------|
| 1388.12 | C-H | Alquil metil |
| 1279.69 | C-H | Alquil metil |
| 592.07 | C-X | Bromoalcanos |

Tabla 16 Longitudes de onda con tipo de bandas para las nanopartículas

| Nanopartículas de Ag (cm-1) | Banda | Tipo de banda |
|--|--------------|----------------------|
| 1744.5 | C=O | Aldehído o quetona |
| 1582.24 | C=O | Sales carboxílicas |
| 1394.0 | C-H | Alquil metil |
| 1256.50 | C-H | Alquil metil |

Los picos más importantes de los espectros de los surfactantes utilizados y las nanopartículas (Ilustración 22) son plasmados en las Tablas 14 - 16. Analizando el espectro correspondiente a las nanopartículas, se observa que se conservan los picos de 1744.5 (C=O, aldehído o quetona) correspondiente al reductor y 1582.12 (C=O; sales carboxílicas) correspondiente al estabilizador. Este resultado no solo da indicios al recubrimiento del agente estabilizador de las nanopartículas, sino de la formación de un posible complejo agente reductor-agente estabilizador, como se ha reportado anteriormente en síntesis de Ag por vía bottom-up [119, 120].

Desinfectante

FTIR

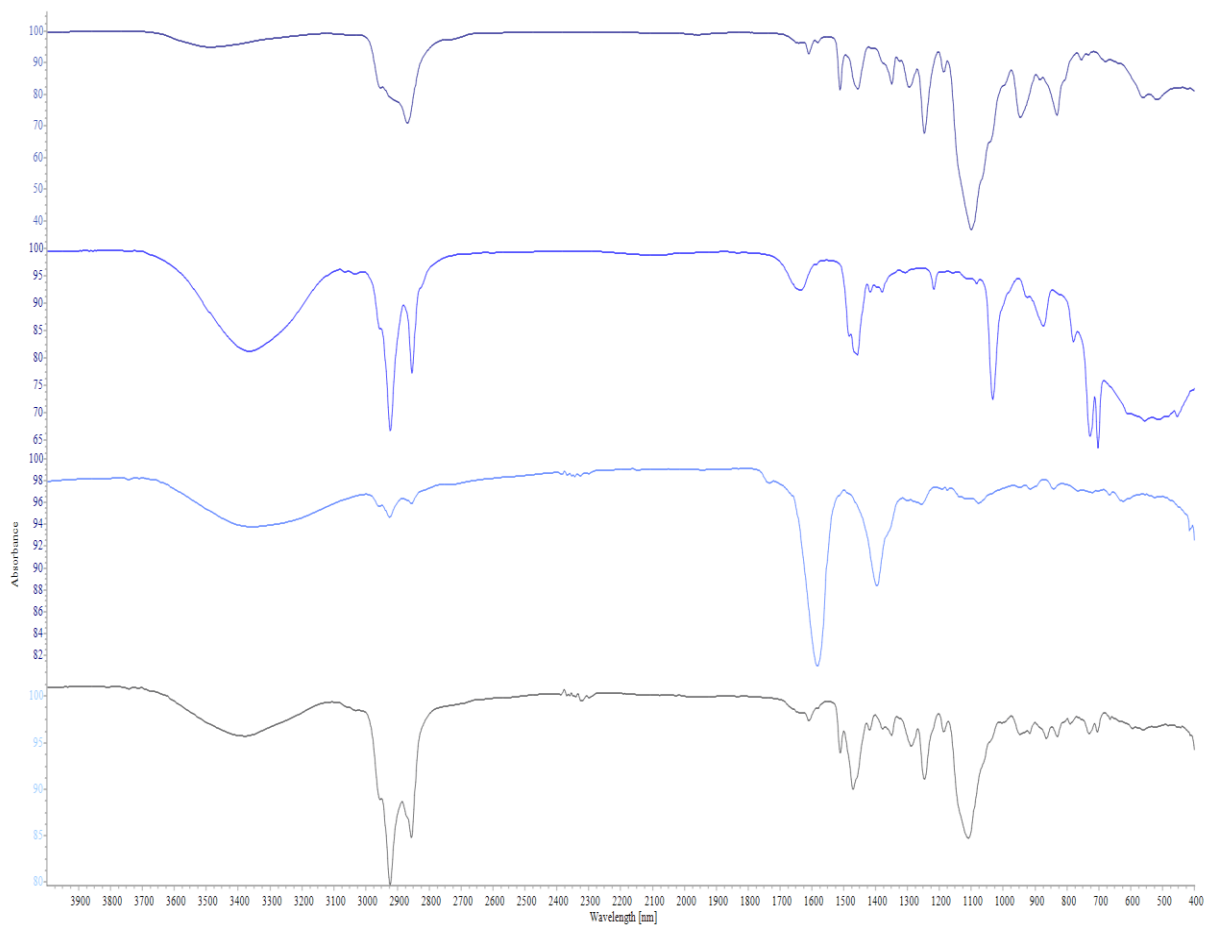


Ilustración 23 Espectro infrarrojo del surfactante no iónico, catiónico, nanopartículas y desinfectante formulado

Tabla 17 Longitudes de onda con tipo de bandas para el surfactante no iónico

| Surfactante no iónico (cm-1) | Banda | Tipo de banda |
|---|--------------|-----------------------------------|
| 1247.52 | C-O | Ácidos carboxílicos |
| 1098.48 | C-O | Esteres |
| 946.03 | C-H | Vinil alcanos trans disustituidos |
| 830.34 | C-H | Vinil; alcanos trisustituidos |

Tabla 18 Longitudes de onda con tipo de bandas para el surfactante catiónico

| Surfactante catiónico (cm-1) | Banda | Tipo de banda |
|---------------------------------|-------|---------------------------------------|
| 1635.5 | C=C | Aromático |
| 1458.13 | C=C | Aromático |
| 1032.17 | C-X | Fluoralcano ordinario |
| 727.04 | C-H | Aromático, benceno mono sustituido |

Tabla 19 Longitudes de onda con tipo de bandas para el desinfectante

| Desinfectante | Banda | Tipo de banda |
|---------------|-------|-----------------------|
| 1609.5 | C=C | Aromático |
| 1469.4 | C=C | Aromático |
| 1246.1 | C-O | Ácidos carboxílicos |
| 1106.0 | C-O | Alcoholes secundarios |

La combinación de los surfactantes se ve reflejada en todo el espectro del desinfectante formulado (Ilustración 23). Los picos correspondientes al surfactante no iónico presentes en el desinfectante son en 1245.5 (C-O; ácidos carboxílicos) y 1106.0 (C-O; alcoholes secundarios); y para el surfactante no iónico son en 1609.5 (C=C; aromático) y 1469.4 (C=C; aromático) (Tablas 17 - 19).

La sinergia de sistemas surfactante catiónico-surfactante no iónico, en especial, en la formación de micelas, no ha sido tan estudiada como los surfactantes aniónicos, no obstante, algunos trabajos han llegado a la conclusión que estos sistemas contribuyen a la formación de monocapas mixtas influenciadas por la longitud de la cadena hidrófoba del surfactante catiónico y la fracción molar total inicial en las soluciones mixtas afectando su reparto. El efecto de dilución tras la mezcla y un gran número de interacciones atractivas de Van der Waals entre partes hidrófobas vecinas se atribuye como el factor principal de sinergia en el proceso de la mezcla [121, 122].

Impregnación en mascarillas

Observaciones de la mascarilla: al realizar la prueba de impregnación, se observó que las capas de la mascarilla son superhidrofóbicas con el objetivo de evitar la adherencia de saliva o líquidos

en cualquiera de sus superficies, siendo un método físico de prevenir contaminación microbiológica. Debido a esta superhidrofobicidad, desinfectantes acuosos tendrían problemas al tratar de ser incorporados a la mascarilla, sin embargo, la incorporación de un hidrotropo (uno de los ingredientes activos en la formulación) ayudó a la impregnación de los ingredientes activos debido a la reducción de la tensión superficial.

Microscopio electrónico de barrido: Para verificar la impregnación de los agentes activos del desinfectante en superficies, se analizó por microscopio electrónico las fibras de una mascarilla comercial de tres capas de polipropileno (Ilustración 24).

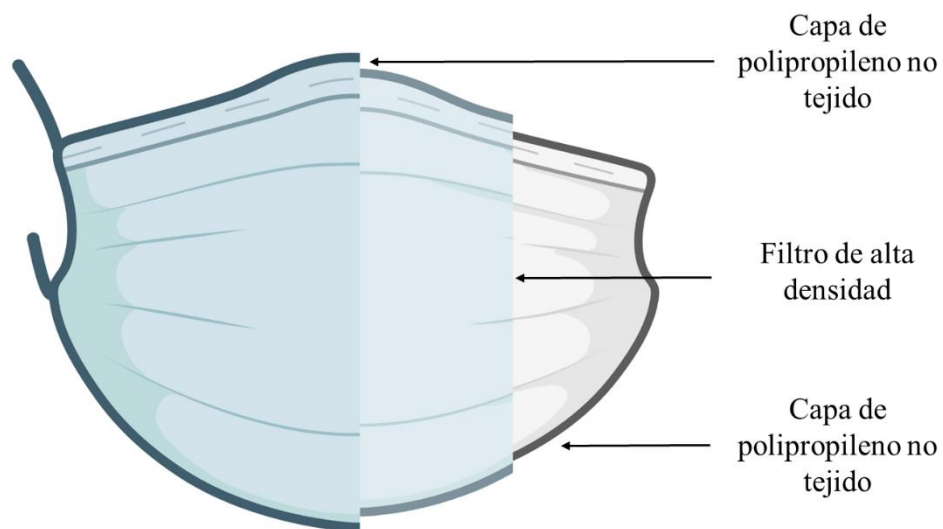


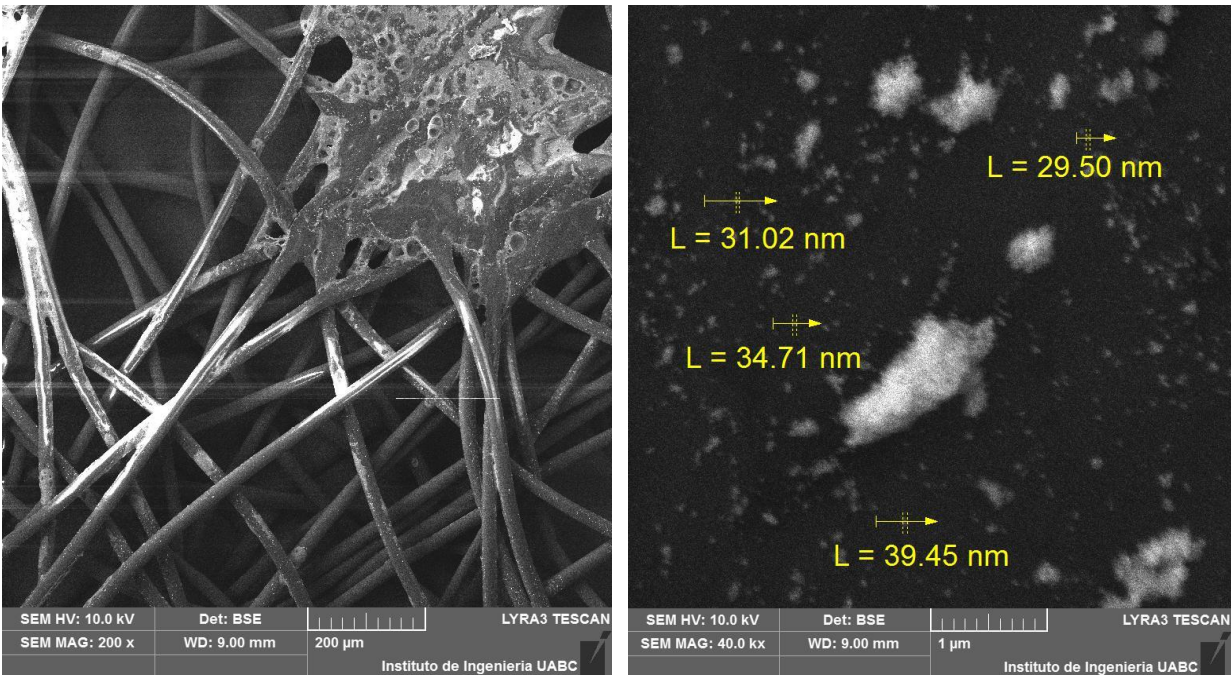
Ilustración 24 Capas y materiales de la mascarilla impregnada (elaborado en Biorender)

Los resultados a 200X, 10 Kv (Ilustraciones 25 - 27) muestran que las fibras exteriores tienen la misma medida, en cambio la interior (blanca gruesa), sus fibras son más pequeñas comprobando lo establecido por el proveedor, que las capas exteriores son de polipropileno no tejido y la interior un filtro de alta densidad.

En todos los casos las fibras lucen impregnadas, que, de acuerdo con los resultados del EDX se puede deducir que la mayor parte de lo impregnado es por surfactantes. Un acercamiento a estas

fibras (10 Kv, 40 KX), se observan las nanopartículas en la formulación de tamaños menores a 40 nm, y confirmándose que son nanopartículas de Ag por EDX.

Enfatizando los tamaños de las nanopartículas vistas por el SEM, es notorio que existe una diferencia considerable que el obtenido por DLS. Esta diferencia de tamaño se explica al entender la diferencia del medio en que se encuentran, ya que las nanopartículas se encuentran en una solución preparada que es agregada a la formulación final del desinfectante. Por lo tanto, los surfactantes pudieron interactuar con las nanopartículas brindándoles otro tipo de recubrimiento o aglomerándolas para formar una nueva, pero de tamaño menor a 40 nm. Esto es algo benéfico por dos razones principales, la primera, los surfactantes pueden funcionar como anclaje en las superficies (visto en las imágenes del SEM) y en bacterias o virus envueltos. La segunda ventaja es que el tamaño no excedió los 50 nm, tamaño deseado en aplicaciones médicas. Además, no se puede despreciar, que existan nanopartículas con tamaños inferiores, como los obtenidos en la caracterización por DLS, solo que no pudieron ser definidas por microscopio electrónico debido a su tamaño y la baja conductividad de las fibras de la mascarilla.



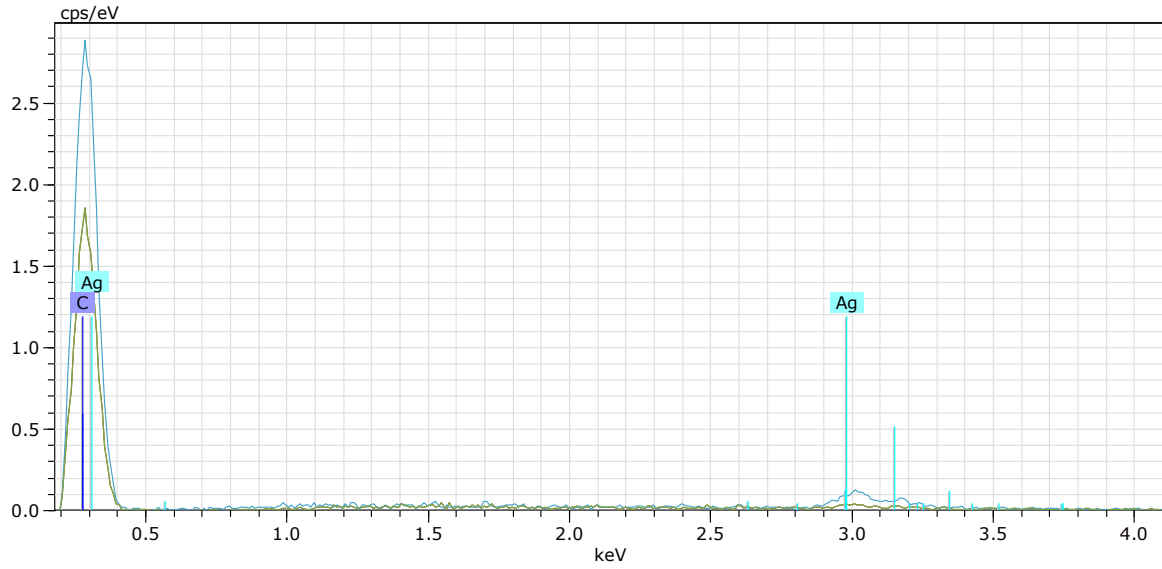
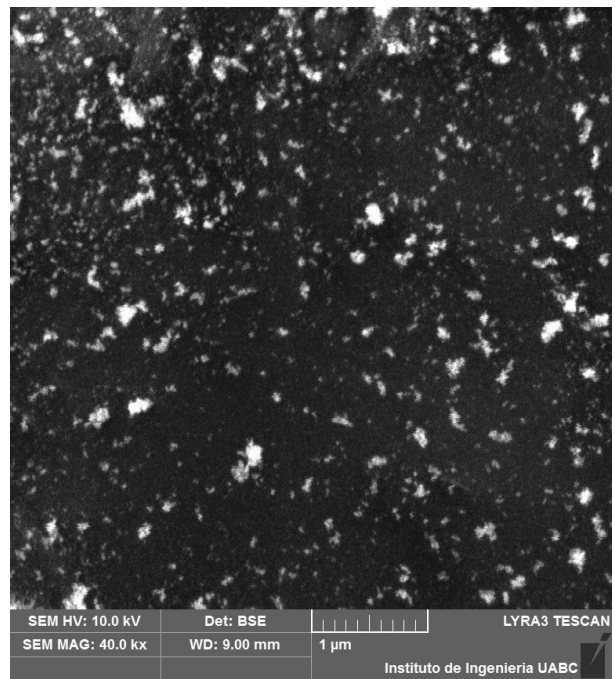


Ilustración 25 Micrografías y EDX de capa de polipropileno no tejido azul



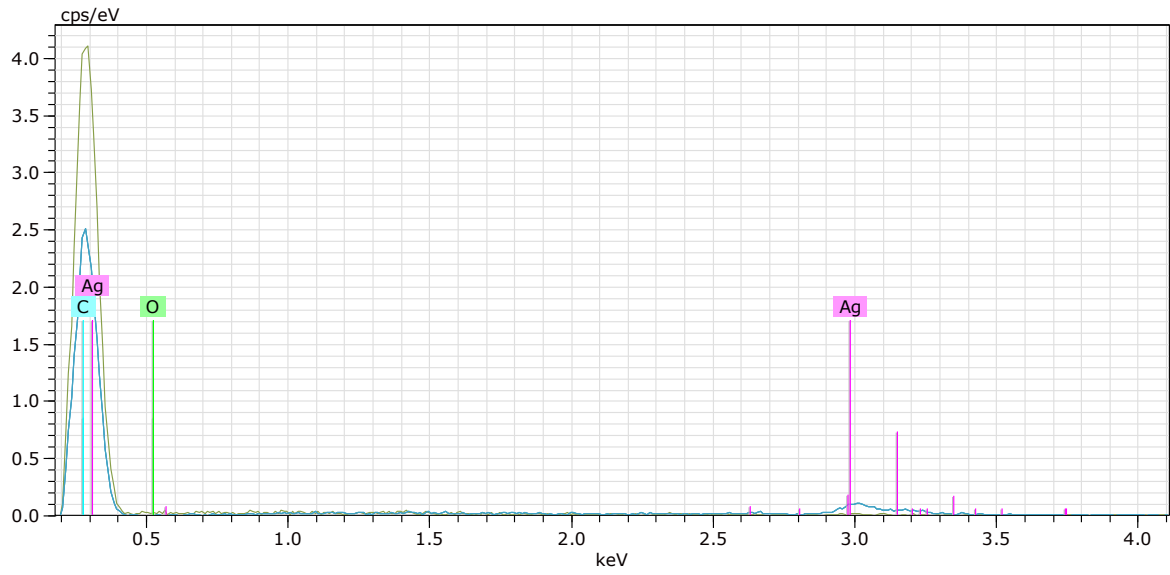
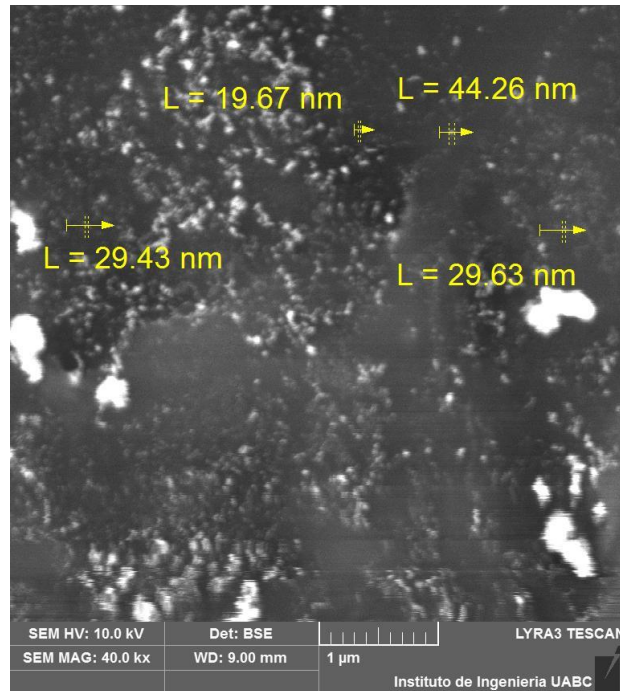
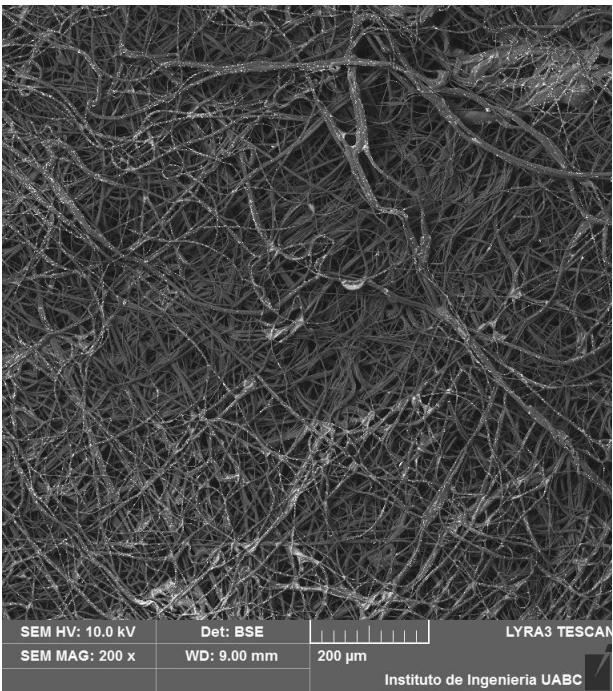


Ilustración 26 Micrografías y EDX de capa de polipropileno no tejido blanco



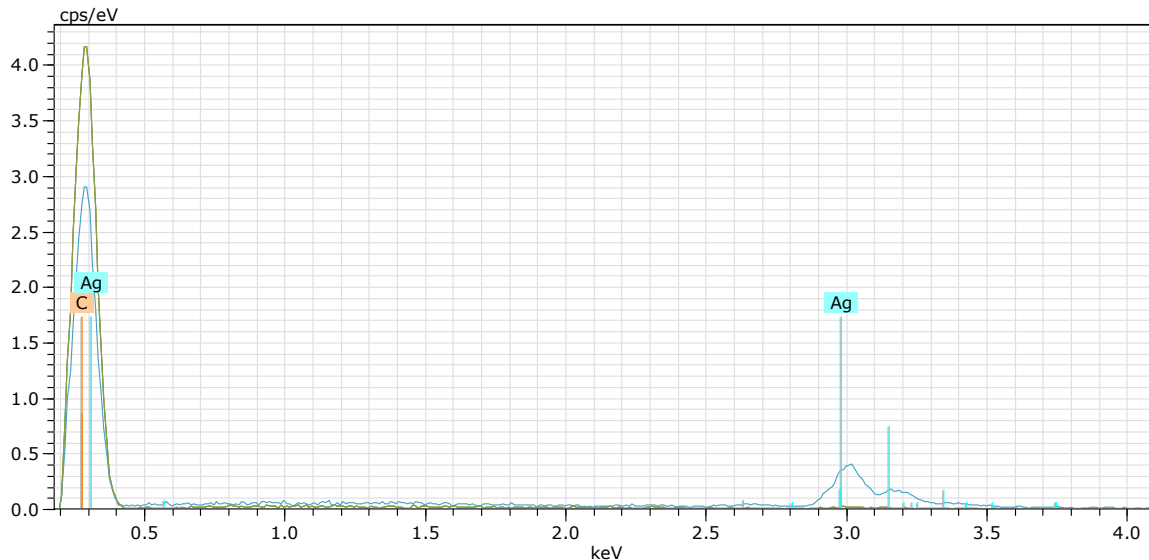


Ilustración 27 Micrografía y EDX de Fibra de alta densidad blanca gruesa

Los resultados aquí mostrados son de gran importancia porque se observa la incorporación de ingredientes activos en un accesorio que ya tiene la función de proteger de la transmisión de enfermedades por medio de una obstrucción física y superhidrofobicidad, con esto incrementando el poder de proteger a una persona de contagios.

También indica que la formulación podrá impregnarse perfectamente en otros tejidos (ya que la mayoría en el mercado no tienen la propiedad superhidrofóbica) y superficies, protegiendo por un periodo de tiempo (surfactante y nanopartículas).

Distribución

Si en el futuro, el desinfectante formulado se comercializa, su distribución/envasado se recomienda en forma de atomizador, espuma y nebulizador. Estos sistemas tienen la intención de abarcar diferentes lugares. El atomizador para desinfectar superficies cercanas; la espuma por su fácil transporte y el nebulizador para espacios amplios.

Con pruebas rápidas en diferentes contenedores (atomizador, espumador, y nebulizador) se llegaron a las siguientes observaciones:

Atomizador: La formulación se comporta perfectamente, utilizado como atomizador de mano, el desinfectante no irritó la piel, no mancha las superficies o provoca corrosión.

Espumado: En este caso, para producir espuma, la formulación tuvo que ser diluida, 50% desinfectante-50% agua. La formulación se comporta perfectamente, la espuma es consistente y no presenta irritación para la piel.

Nebulizador: La formulación se comporta perfectamente, el nebulizador utilizado puede dispersar el desinfectante de manera óptima, pudiendo desinfectar un área grande con una cantidad pequeña. El nebulizador en la prueba tiene la capacidad de 20 L, y con este volumen se pudo nebulizar una superficie de 350 m². Sin embargo, es necesario esperar un tiempo (15 min) para que el desinfectante asiente, ya que el inhalarlo puede resultar molesto en la garganta para las personas, este olor o molestia es debido al alcohol que contiene la formulación.

Costo

La comparación del costo para su elaboración es importante, ya que necesita competir con otros en el mercado. La Tabla 20 muestra el precio de desinfectantes comunes:

Tabla 20 Comparativo de desinfectantes en el mercado, precio por volumen

| Nombre | Volumen (ml) | Precio (MXN) | Referencia |
|---|--------------|--------------|------------|
| Lysol Spray desinfectante | 650 | \$75.00 | Walmart |
| Wiese DC | 226 | \$138.00 | SAMS |
| Sanytol | 750 | \$299.00 | COSTCO |
| Mr Músculo desinfectante | 650 | \$49.00 | Walmart |
| Spray desinfectante Cloralex | 60 | \$54.99 | Waldos |
| Desinfectante desarrollado | 650 | \$120.00 | - |

En la Tabla 20 se muestran desinfectantes habituales encontrados en mercados del país. Se observa que el precio de los desinfectantes es variado y depende de factores como calidad, volumen y tienda. La presentación más común es la de 650 ml, con un rango de precios entre \$75.00 y casi \$300.00, por lo que, el precio del desinfectante desarrollado se mantiene en los márgenes de lo razonable. Por experiencia de la pandemia de COVID-19 vivida al tiempo que se realizó esta tesis, el empleo de desinfectantes en cualquiera de sus modalidades se volvió un requisito indispensable, ya que fueron condiciones para que ciertos lugares pudieran abrir. Por esta razón, la venta de

desinfectantes se elevó desmesuradamente por lo que, es común ver en el mercado no formal, desinfectantes con un valor menor al mostrado en la Tabla 20. No obstante, la calidad y efectividad de éstos está en duda. Por lo que, una ventaja competitiva que tendría el desinfectante desarrollado es la ciencia, pruebas y estudios que lo sustentan.

Capítulo 5 Conclusiones

Siguiendo la estrategia planteada en el capítulo 2, se pueden establecer las siguientes conclusiones para cada sección de este trabajo:

Fase 1: La optimización de la formulación presentó múltiples ventajas, abarcando el entendimiento de cada ingrediente, la correcta utilización de los ingredientes, y la comprensión de la fisicoquímica de los sistemas, que tienen su máxima relevancia, en la fase de desarrollo y escalamiento. La utilización de cada ingrediente no superó la concentración recomendada en las fichas técnicas, además que, para el porcentaje de alcohol, se llegó a una reducción considerable clasificado como efectivo, haciendo que su precio (ya que el costo del alcohol se elevó por la pandemia) y dependencia de un agente activo se redujeran.

En cuestión de las herramientas usadas para la optimización, se propuso un nuevo método con un software de imagen (IMAGE), que proporcionó una ventaja considerable a los sistemas habituales que son por absorbancia, tomando en cuenta el número de experimentos usado en el diseño factorial.

Fase 2: Las tres áreas analizadas en la fase 2 (amplio espectro, sinergia y permanencia en superficies) fueron llevadas con éxito, puesto que en cada una de ellas se pudo comprobar la efectividad del desinfectante. El desinfectante formulado pasó con éxito la prueba de halo de inhibición y unidades formadoras de colonias en la concentración más alta de surfactante catiónico, comparándose con los desinfectantes en el mercado más famosos. Dando un paréntesis en la emergencia de salud vivida en el año en que se escribió esta tesis, los microorganismos evaluados orientados a las infecciones nosocomiales y la efectividad antimicrobiana que presentó el desinfectante formulado, promueven el frenado del SARS-CoV-2, siendo este virus, un microorganismo que ha adquirido un lugar importante en las infecciones nosocomiales de los hospitales del mundo.

Con los análisis de espectroscopia infrarroja, se comprobó la sinergia de los reactivos utilizados, teniendo nanopartículas altamente estables y con un tamaño que está comprobado que realiza su mecanismo de acción antimicrobiana, además de un sistema micelar surfactante catiónico-no iónico que desarrolla un complejo que funciona como enlace entre las superficies y las nanopartículas.

El análisis de microscopía de barrido electrónico demostró la correcta impregnación en un material difícil de impregnar puesto que tiene características hidrofóbicas, dando indicios que su impregnación sucederá en otras superficies inanimadas.

Fase 3: Comparando el costo del desinfectante formulado con los encontrados actualmente en el mercado, el costo es un porcentaje más alto, algo entendible ya que, se exploraron alternativas en agentes activos. Como es habitual en reactivos con nuevas tecnologías, el costo es más elevado, puesto que, la producción es reducida comparada con los que dominan el mercado y la inexperiencia de la manufactura con éstos. Es un hecho que la sustitución o incorporación de uno o más agentes en un producto ya distribuido es complicado por todas las variables a considerar, por lo tanto, el tiempo para que un producto contenga nuevos agentes en su formulación puede durar años.

Otro punto importante que interviene en el incremento del precio de nuevas tecnologías es la facilidad de adquirirlo, normalmente su distribución y venta comienzan en países desarrollados, ya que son los que restringen el uso de reactivos clásicos debido a posibles problemas con la salud y el medio ambiente o por el hecho de tener mejores características que los anteriores. En todo caso, el costo del producto ha sido justificado por la eficiencia que presentó en las pruebas tanto fisicoquímicas como microbiológicas.

Referencias

- [1] WHO, The burden of health care-associated infection worldwide. https://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/en/
- [2] M. Pujol and E. Limón. Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica, 2013; 31(2):108-113.
- [3] A. Kramer, I. Schwebke, G. Kampf. How long do noscomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infectious Diseases, 2006; 6:130.
- [4] WHO, Cólera en México – Actualización. https://www.who.int/csr/don/2013_11_13/es/
- [5] M. Machado-Querido, L. Aguiar, P. Neves, C. Costa-Pereira, J.P. Teixeira. Self-disinfecting surfaces and infection control. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019; 178:8-21.
- [6] W.A. Rutala, D.J. Weber. Disinfection and sterilization: an overview. American journal of infection control. 2013; 41:1-5.
- [7] J.H. Yoo. Review of disinfection and sterilization-back to the basics. Infect Chemother. 2018; 50(2):101-109.
- [8] J. Benedi. Antisépticos: Revisión. Farmacia Profesional. 2005; 19(8):58-61.
- [9] <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/biocidas/#:~:text=Los%20biocidas%20son%20sustancias%20o,que%20no%20sea%20una%20mera>
- [10] A. Sikora, F. Zahra. Nosocomial infections. StatPearls Publishing. 2021.
- [11] A. Bueno-Cavanillas, M. Delgado-Rodríguez, A. López-Luque, S. Schaffino-Cano, R. Gálvez-Vargas. Influence of nosocomial infection on mortality rate in an intensive care unit. Crit Care Med. 1994; 22(1):55-60.
- [12] T.G. Emori, R.P. Gaynes. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clinical Microbiology Reviews. 1993; 6(4):428-442.
- [13] H.B. Garner, D.J. Anderson. Surgical site infections: An update. Infect Dis Clin N Am. 2016; 30:909-929.

- [14] Secretaría de Salud. Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones Públicas de salud. México: SSA; 2011. Disponible en http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dess/descargas/estudios_especiales/NOSOCOMIAL_IF.pdf
- [15] OMS. Prevención de las infecciones nosocomiales: guía práctica. 2002. https://www.who.int/csr/resources/publications/ES_WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12.pdf
- [16] P. Gastmeier, G. Kampf, N. Wischnewski, M. Schumacher, F. Daschner, H. Ruden. Importance of the surveillance method various national prevalence studies on nosocomial infections and limits of comparison. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998; 19:661-667.
- [17] V. Lacovelli, G. Gaziev, L. Topazio. Nosocomial Urinary Tract Infections: A Review. *Urologia Journal.* 2014; 81(4):222-227.
- [18] T.Y. Yong, K.S.F. Khaw. Urinary Tract Infections in Older People with Long-Term Indwelling Catheters. *J Emerg Infect Dis.* 2016.
- [19] T.E. Bjerklund-Johansen, M. Cek, K. Naber, L. Stratchounski, M.V. Svendsen, et al. Prevalence of hospital-acquired urinary tract infections in urology departments. *Eur Urol.* 2007; 51:1100-1111.
- [20] B. Deepthi, K.T. Gopika, K.R. Samyuktha, R. Priyanka and S.K. Sharmila. Nosocomial Urinary Tract Infections. *Skin Diseases and Skin Care.* 2017; 2(1):1-4.
- [21] National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Surgical site infection: Prevention and treatment of surgical site infection. NICE Clinical Guidelines. 2019; 74.
- [22] Johns Hopkins Medicine. Surgical site infections. Acceso: 3 de abril de 2021.
- [23] American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America; American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2005; 171(4):388-416.
- [24] E. Díaz, I. Martín-Loeches, J. Vallés. Neumonía nosocomial. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2013; 31(10):692-698.

- [25] G. Pérez-Chica, C. Lacarcel-Bautista, M. López-López. Neumonía nosocomial. Manual de diagnóstico y terapéutica en neumología. 525-535. https://www.neumosur.net/publicaciones_ebooks_contenidos.php?id=12
- [26] A. Manzur, M.S. Ruiz, J. Fernández, A. Bustos, R. Amuchastegui, G. Fonseca, M. Padilla, S. Ferrari, B. Salanitro. Bacteriemia nosocomial en servicios de cuidados críticos y en sala general. Actualizaciones en Sida e Infectología. 2013; 21(80):42-47.
- [27] F. Cobo-Martínez y P. Manchado-Mañas. Bacteriemia nosocomial: epidemiología y situación actual de resistencias a antimicrobianos. Rev Clin Esp. 2005; 205(3):108-12
- [28] B. Allegranzi, S.B. Nejad, C. Combescure, W. Graafmans, H. Attar, L. Donaldson, D. Pittet. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. 2011; 377(9761):228-241
- [29] S. Sengupta, P. Barman, J. Lo. Opportunities to overcome implementation challenges of infection prevention and control in low-middle income countries. Current Treatment Options in Infectious Diseases. 2019; 11:267-280.
- [30] <https://www.gob.mx/salud/prensa/programa-de-entrenamiento-para-control-de-infecciones-nosocomiales>. Acceso: 13 marzo 2021.
- [31] Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Manual de integración y funcionamiento del comité para la detección y control de infecciones nosocomiales. 2016. http://www.iner.salud.gob.mx/descargas/normatecainterna/MIcomites/COMITEDETECCIONCONTROLINFECCIONESNOSOCOMIALES_15072016.pdf
- [32] Secretaría de salud. Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud. 2011.
- [33] INEGI. Clasificación de instituciones de salud – histórica. 2005.
- [34] R. Arias-Flores, U. Rosado-Quiab, A. Vargas-Valerio, C. Grajales-Muñiz. Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2016; 54(1):20-24.

- [35] Secretaría de Salud. Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones Públicas de salud. México: SSA; 2011. [citado 19 Mar 2014]. Disponible en http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dess/descargas/estudios_especiales/NOSOCOMIAL_IF.pdf
- [36] D.M. Sievert, P. Ricks, J.R. Edwards, A. Schneider, J. Patel, A. Srinivasan. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013; 34(1):1-14.
- [37] P. Zarb, B. Coignard, J. Griskeviciene, A. Muller, V. Vankerckhoven, K. Weist, et al. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro Surveill.* 2012; 17(46):20316.
- [38] WHO (2018). E. coli. Accessed: 4 de abril de 2021.
- [39] Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(3):603-661.
- [40] A. Kramer, I. Schwebke, G. Kampf. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases.* 2006; 6:130.
- [41] J.L. Castañeda-Narváez, J.O. Ortega. La supervivencia de los gérmenes intrahospitalarios en superficies inanimadas. 2014; 27(107):394-396.
- [42] P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller. (2013). *Medical microbiology.* Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- [43] J.M. Boyce. Alcohols as Surface disinfectants in helthcare settings. *Infection Control & Hospital Epidemiology.* 2018; 39(3):323-328.
- [44] W.A. Rutala, D.J. Weber. Disinfection, sterilization, and antisepsis: an overview. *Am J Infect Control* 2016; 44:1–6.
- [45] M. Halm, K. Sandau. Skin impact of alcohol-based hand rubs vs handwashing. *Am J Crit Care.* 2018; 27(4):334-337.

- [46] <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/568denaturation.html>
- [47] <https://thebumblingbiochemist.com/365-days-of-science/hand-sanitizer/>
- [48] W.A. Rutala, D.J. Weber. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. Infection Control Practices Advisory Committee. 2008:1-163.
- [49] R.E. Cowan, A.P. Manning, G.A.J. Ayliffe, A.T.R. Axon, J.S. Causton, N.F. Cripps, R. Hall, P.J.V. Hanson, J. Harrison, R.J. Leicester, C. Neumann, J. Wicks. Aldehyde disinfectants and health in endoscopy units. Gut. 1993; 34:1661-1665.
- [50] Scott EM, Gorman SP. Glutaraldehyde. In: Block SS, ed. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:361-81.
- [51] Scott EM, Gorman SP. Glutaraldehyde. In: Block SS, ed. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:596-616.
- [52] G.J. Roode and K.W. Buton. A descriptive study of chlorhexidine as a disinfectant in cleft palate surgery. 2018; 16(1-2):9-15.
- [53] J.M. Tanzer, A.M. Slee, B.A. Kamay. Structural requirements of guanide, biguanide, and busbiguanide agents for antiplaque activity. 1977; 12(6):721-729.
- [54] T. Kuyyakanond y L.B. Quensnel. The mechanism of action of chlorhexidine. FEMS Microbiology Letters. 1992:211-216.
- [55] K.S. Lim, P.C.A. Kam. Chlorhexidine-pharmacology and clinical applications. Anaesth Intensive Care. 2008, 36:502-512.
- [56] G.J. Hucker, W. Eseltine. A review of the biological aspects of the quaternary ammonium compounds. J Milk and Food Technol. 1948; 11(300):269-300.
- [57] P.J. Schaeufele. Advances in quaternary ammonium biocides. JAOCS. 1984; 61(2):387-389.
- [58] Study of the activity of quaternary ammonium compounds in the mitigation of biofouling in heat exchangers-condensers cooled by seawater. Biofouling. 2013, 29(9):1139–1151.

- [59] P.I. Hora, S.G. Pati, P.J. McNamara, W.A. Arnold. Increased use of quaternary ammonium compounds during the SARS-CoV-2 pandemic and beyond: consideration of environmental implications. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2020; 7(9):622-631.
- [60] P. Gilbert, L.E. Moore. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology.* 2005; 99(4):703-715.
- [61] Maris P. Modes of action of disinfectants. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1995,14(1):47-55.
- [62] W. Gottardi. Iodine as disinfectant. Chapter 20. 2015:375-410.
- [63] K. Suttiponparnit, J. Jiang, M. Sahu, S. Suvachittanont, T. Charinpanitkul, P. Biswas. Role of surface area, primary particle size, and crystal phase on titanium dioxide nanoparticle dispersion properties. *Nanoscale Res Lett.* 2011; 6:1-8.
- [64] I. Khan, K. Saeed, I. Khan. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. 2019; 12(7): 908-931.
- [65] C. Voelker, M. Oetken, J. Oehlmann, The biological effects and possible modes of action of nanosilver. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2013; 223:81-106.
- [66] A. Khezerlou, M. Alizadeh-Sani, M. Azizi-Lalabadi, A. Ehsani. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. *Microbial Pathogenesis.* 2018; 123:505-526.
- [67] FDA. UV Lights and Lamps: Ultraviolet-C Radiation, Disinfection, and Coronavirus. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/uv-lights-and-lamps-ultraviolet-c-radiation-disinfection-and-coronavirus>
- [68] G. Katara, N- Hemvani, S. Chitnis, D.S. Chitnis. Surface disinfection by exposure to germicidal UV light. *Indian Journal of Medical Microbiology.* 2008; 26(3):241-242.
- [69] T. Dai, M.S. Vrahas, C.K. Murray and M.R. Hamblin. Ultraviolet C irradiation: an alternative antimicrobial approach to localized infections? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012; 10(2):185-195.
- [70] P.A. Cox, S. King. Bioprospecting. *Encyclopedia of Biodiversity.* 2013:588-599.

- [71] E. Bormashenko, Y. Bormashenko, T. Stein, G. Whyman, E. Bormashenko. Why do pigeon feathers repel water? Hydrophobicity of pennae, Cassie–Baxter wetting hypothesis and Cassie–Wenzel capillarity-induced wetting transition. 2007; 311(1):212-216.
- [72] M.M. Querido, L. Aguiar, P. Neves, C.C. Pereira, J.P. Teixeira. Self-disinfecting surfaces an infection control. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019; 178:8-21.
- [73] O. Rzhepishevskaya, S. Hakobyan, R. Ruhul, J. Gutrot, D. Barbero, M. Ramstedt. The surface charge of anti-bacterial coatings alters motility and biofilm architecture. *Biomaterials Science*. 2013; 1(6):1-14.
- [74] A.C. Pinho, A.P. Piedade. Polymeric coatings with antimicrobial activity: A short review. *Polymers*. 2020; 12:20469.
- [75] E. Beltrán-Partida, B. Valdez-Salas, M. Curiel-Álvarez, S. Castillo-Urbe, A. Escamilla, N. Nedev. Enhanced antifungal activity by disinfected titanium dioxide nanotubes via reduced nano-adhesion bonds. *Materials Science and Engineering: C*. 2017; 76(1):56-65.
- [76] X. Fan, L. Yahia, E. Sacher. Antimicrobial properties of the Ag, Cu nanoparticle system. 2021; 10(2):137.
- [77] K. Chen, S.P. Nikam, Z.K. Zander, Y.H. Hsu, N.Z. Dreger, M. Cakmak, M.L. Becker. Continuous fabrication of antimicrobial nanofiber mats using post-electrospinning functionalization for roll-to-roll scale-up. *ACS Appl. Polym. Mater.* 2020; 2(2):304-316.
- [78] U. Joost, K. Juganson, M. Visnapuu, M. Mortimer, A. Kahru, E. Nommiste, U. Joost, V. Kisand, A. Ivask. Photocatalytic antibacterial activity of nano-TiO₂ (anatase)-based thin films: Effects on *Escherichia coli* cells and fatty acids *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2015; 142:178-185.
- [79] N. Assas, Z. Elbahri, M. Batiche, F. Djerboua. Effects of some process parameters on the niflumic acid controlled release polymeric microspheres: Optimization using designs of experiments. *Asian-Pacific Journal of Chemical Engineering*. 2019; 14(2):1-19.
- [80] H.W. Chen, G.B. Hong, Z.J. Chen. Moisture sorption isotherm characteristics and Taguchi analysis of rice bran extraction parameters. *Asian-Pacific Journal of Chemical Engineering*. 2017; 12(1):33-41.

- [81] I.M. Fukuda, C.F. Pinto, C.S. Moreira, A.M. Saviano, F.R. Lourenco. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Braz. J. Pharm. Sci.* 2018; 54:1-16.
- [82] Y. Li, S. Guo, H. Zhu. Statistical optimization of culture medium for production of exopolysaccharide from endophytic fungus *bionectria ochroleuca* and its antitumor effect in vitro. *EXCLI Journal*. 2016; 15:211-220.
- [83] Design of experiments application, concepts, examples: state of art. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*. 2017; 5(3):421-439.
- [84] S. Beg, S. Swain, M. Rahman, S. Hasnain, S.S. Imam. Application of design experiments (DoE) in pharmaceutical product and process optimization. 2019:43-64.
- [85] M. Yolmeh, S.M. Jafari. Applications of reponse surface methodology in the food industry processes. *Food and Bioprocess Technology*. 2017; 10:413-433.
- [86] Y.B. Sahin, E.A. Demirtas, N. Burnak. Mixture design: a review of recent applications in the food industry. 2016; 22(4):297-304.
- [87] R. Davis, P. John. Application of Taguchi-based design of experiments for industrial chemical processes in: *Statistical Approaches with Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes*. 2018.
- [88] J.L.J. Jing, T.P. Yi, R.J.C. Bose, J.R. McCarthy, N. Tharmalingam, J.R. Madheswaran. Hand sanitizers: A review on formulation aspects, adverse effects, and regulations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020; 17:3326.
- [89] <http://rbnainfo.com/product.php?productLineId=360>. Acceso: 19 Feb 21.
- [90] <https://www.jacobi.co.il/wp-content/uploads/2019/06/item-11300-desytol-disinfectant-multi-use-750-ml-marca-dated-15.6.2017.pdf> Acceso: 19 Feb 21.
- [91] G. McDonell, A.D. Rusell. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin. Microbiol Rev.* 1999; 12(1):147-179.
- [92] G. Kampf. Efficacy of ethanol against viruses in hand disinfection. *Journal of Hospital Infection*. 2018; 98:331-338.

- [93] P. Maris. Modes of action of disinfectants. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.* 1995; 14(1):47-55.
- [94] *Disinfectants and Disinfectants by-Products*. WHO. 2000. ISBN 9241572167.
- [95] D.C. Sabate, M.C. Audisio. Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. *Microbiol Res.* 2013; 168:125–129.
- [96] N.A. Falk. Surfactants as Antimicrobials: A Brief Overview of Microbial Interfacial Chemistry and Surfactant Antimicrobial Activity. *Journal of Surfactants and Detergents.* 2019; 22(5):1119-1127.
- [97] A. Pratelli. Action of Disinfectants on Canine Coronavirus Replication in Vivo. *Zoonoses and Public Health.* 2007; 54:383-386.
- [98] P. Gerba. Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. *Applied and Environmental Microbiology.* 2015; 81(2):464-469.
- [99] J. Regös, O. Zak, R. Solf, W.A. Vischer, E.G. Weirich. Antimicrobial spectrum of triclosan, a broad-spectrum antimicrobial agent for topical application. II. Comparison with some other antimicrobial agents. *Dermatologica,* 1979; 158(1):72–79.
- [100] Z.X. Wang, C.P. Jiang, Y. Cao, Y.T. Ding. Systematic review and meta-analysis of triclosan coated sutures for the prevention of surgical-site infection. *BJS (British Journal of Surgery),* 2013; 100(4):465-473.
- [101] S.P. Deshmukh, S.M. Patil, S.B. Mullani, S.D. Delekar. Silver nanoparticles as and effective disinfectant: A review. *Mater Sci Eng C Biol Appl.* 2019; 97:954-965.
- [102] M. Vincent, R.E. Duval, P. Hartemann, M. Engels-Deutsch. Contact killing and antimicrobial properties of copper. *Journal of Applied Microbiology.* 2017; 124(5):1032-1046
- [103] C.J. Loannou, G.W. Hanlon, S.P. Denyer. Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007; 51(1):296-306.
- [104] G. Kampf. Efficacy of ethanol against viruses in hand disinfection. *Journal of Hospital Infection.* 2018; 98:331-338.

- [105] P. Maris. Modes of action of disinfectants. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.* 1995;14(1):47-55.
- [106] M. Alauddin, T. Parvin, T. Begun. Effect of organic additives on the cloud point of triton x-100 micelles. *Journal of Applied Sciences.* 2009; 9(12):2301-2306.
- [107] H. Schott. Effect of inorganic additives on solutions of nonionic surfactants: x. micellar properties. *Journal of Colloid and Interface Science.* 1995; 173(2):265-277.
- [108] K. Tasaki. Poly(oxyethylene)-water interactions: A molecular dynamic study. *J. Am. Chem. Soc.* 1996; 118(35):8459-8469.
- [109] H. Schott. Foaming of nonionic surfactant solutions: effect of surfactant concentration and temperature. *JAOCs.* 1998; 65(5):816-819.
- [110] B. Lindman, B. Medronho, G. Karlstrom. Clouding of nonionic surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 2016; 22:23-29.
- [111] Z. Huang, T. Gu. The effect of mixed cationic-anionic surfactants on the cloud point of nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science.* 1990; 138(2):580-582.
- [112] R.C. Darton, K.H. Sun. The effect of surfactant on foam and froth properties. *chemical engineering research and design.* 1999; 77(6):535-542.
- [113] J.A. Kitchener, C.F. Cooper. Current concepts in the theory of foaming. *Q. Rev. Chem. Soc.* 1959; 13(1):71-97.
- [114] J. Han, G. Li, H. Gao. Foaming mechanisms of different foaming agents and their effects on the microstructures of porous magnesia ceramics. *J Aust Ceram Soc.* 2020; 56:1005–1011.
- [115] D. Langevin. Aqueous foams and foam films stabilized by surfactants. *Gravity-free studies.* 2017; 345(1):47-55.
- [116] X. Yu, N. Jiang, X. Miao, R. Zong, Y. Sheng, C. Li, S. Lu. Formation of stable aqueous foams on the ethanol layer: synergistic stabilization of fluorosurfactant and polymers. *Colloids and Surface A.* 2020; 591:124545.
- [117] A. Bonfillon-Collin, D. Langevin. Why do ethoxylated nonionic surfactants not foam at high temperature. *Langmuir.* 1997; 13(4):599-601.

- [118] A. Colin, J. Giermanska-Kahn, D. Langevin, B. Desbat. Foaming properties of modified ethoxylated nonionic surfactants. *Langmuir*. 1997; 13(11):2953-2959.
- [119] K. Ranozek-Soliwoda, E. Tomaszewska, E. Socha, P. Krzyczmonik, A. Ignaczak, P. Orłowski, M. Krzyzowska, G. Celichowski, J. Grobelny. The role of tannic acid and sodium citrate in the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. 2017; 19:273.
- [120] T. Dadosh. Synthesis of uniform silver nanoparticles with a controllable size. *Materials Letters*. 2009; 63(26):2236-2238.
- [121] A. Bagheri, P. Khalili. Synergism between non-ionic and cationic surfactants in a concentration range of mixed monolayers at an air–water interface. 2017; *RSC Adv*. 2017; 7:18151-18161.
- [122] K. Pytlakowska, P. Zerzucha, R. Czoik. Influence of mixed cationic-nonionic surfactant systems on the spectral properties of c.i. mordant blue 29 and its complexes with iron(iii). *Japan Society for Analytical Chemistry*. 2011; 27:555-560.

Apéndice

Apéndice 1 ANOVA de turbidez de 4 términos

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|---|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo | 15 | 220.372 | 14.6915 | * | * |
| Lineal | 4 | 80.437 | 20.1092 | * | * |
| Alcohol | 1 | 16.892 | 16.8921 | * | * |
| Agua | 1 | 16.281 | 16.2812 | * | * |
| S. Catiónico | 1 | 6.175 | 6.1752 | * | * |
| S. No iónico | 1 | 41.088 | 41.0881 | * | * |
| Interacciones de 2 términos | 6 | 114.602 | 19.1003 | * | * |
| Alcohol*Agua | 1 | 57.532 | 57.5322 | * | * |
| Alcohol*S. Catiónico | 1 | 2.088 | 2.0880 | * | * |
| Alcohol*S. No iónico | 1 | 6.605 | 6.6049 | * | * |
| Agua*S. Catiónico | 1 | 11.560 | 11.5600 | * | * |
| Agua*S. No iónico | 1 | 5.736 | 5.7360 | * | * |
| S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 31.081 | 31.0806 | * | * |
| Interacciones de 3 términos | 4 | 25.020 | 6.2551 | * | * |
| Alcohol*Agua*S. Catiónico | 1 | 0.292 | 0.2916 | * | * |
| Alcohol*Agua*S. No iónico | 1 | 14.938 | 14.9382 | * | * |
| Alcohol*S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 9.579 | 9.5790 | * | * |
| Agua*S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 0.212 | 0.2116 | * | * |
| Interacciones de 4 términos | 1 | 0.314 | 0.3136 | * | * |
| Alcohol*Agua*S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 0.314 | 0.3136 | * | * |

| | | | | | |
|--------------|----|---------|---|--|--|
| Error | 0 | * | * | | |
| Total | 15 | 220.372 | | | |

Apéndice 2 ANOVA de turbidez de 3 términos

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Modelo | 14 | 220.059 | 15.7185 | 50.12 | 0.110 |
| Lineal | 4 | 80.437 | 20.1092 | 64.12 | 0.093 |
| Alcohol | 1 | 16.892 | 16.8921 | 53.87 | 0.086 |
| Agua | 1 | 16.281 | 16.2812 | 51.92 | 0.088 |
| S. Catiónico | 1 | 6.175 | 6.1752 | 19.69 | 0.141 |
| S. No iónico | 1 | 41.088 | 41.0881 | 131.02 | 0.055 |
| Interacciones de 2 términos | 6 | 114.602 | 19.1003 | 60.91 | 0.098 |
| Alcohol*Agua | 1 | 57.532 | 57.5322 | 183.46 | 0.047 |
| Alcohol*S. Catiónico | 1 | 2.088 | 2.0880 | 6.66 | 0.235 |
| Alcohol*S. No iónico | 1 | 6.605 | 6.6049 | 21.06 | 0.137 |
| Agua*S. Catiónico | 1 | 11.560 | 11.5600 | 36.86 | 0.104 |
| Agua*S. No iónico | 1 | 5.736 | 5.7360 | 18.29 | 0.146 |
| S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 31.081 | 31.0806 | 99.11 | 0.064 |
| Interacciones de 3 términos | 4 | 25.020 | 6.2551 | 19.95 | 0.166 |
| Alcohol*Agua*S. Catiónico | 1 | 0.292 | 0.2916 | 0.93 | 0.512 |
| Alcohol*Agua*S. No iónico | 1 | 14.938 | 14.9382 | 47.63 | 0.092 |
| Alcohol*S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 9.579 | 9.5790 | 30.55 | 0.114 |
| Agua*S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 0.212 | 0.2116 | 0.67 | 0.562 |

| | | | | | |
|--------------|----|---------|--------|--|--|
| Error | 1 | 0.314 | 0.3136 | | |
| Total | 15 | 220.372 | | | |

Apéndice 3 ANOVA de espumado de 4 términos

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Modelo | 15 | 89.3886 | 5.9592 | * | * |
| Lineal | 4 | 58.3144 | 14.5786 | * | * |
| Alcohol | 1 | 37.3627 | 37.3627 | * | * |
| Agua | 1 | 17.5352 | 17.5352 | * | * |
| S. Catiónico | 1 | 1.1289 | 1.1289 | * | * |
| S. No iónico | 1 | 2.2877 | 2.2877 | * | * |
| Interacciones de 2 términos | 6 | 20.1159 | 3.3527 | * | * |
| Alcohol*Agua | 1 | 11.8164 | 11.8164 | * | * |
| Alcohol*S. Catiónico | 1 | 3.2852 | 3.2852 | * | * |
| Alcohol*S. No iónico | 1 | 0.6602 | 0.6602 | * | * |
| Agua*S. Catiónico | 1 | 3.1952 | 3.1952 | * | * |
| Agua*S. No iónico | 1 | 0.0827 | 0.0827 | * | * |
| S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 1.0764 | 1.0764 | * | * |
| Interacciones de 3 términos | 4 | 9.8294 | 2.4573 | * | * |
| Alcohol*Agua*S. Catiónico | 1 | 6.4389 | 6.4389 | * | * |
| Alcohol*Agua*S. No iónico | 1 | 0.1702 | 0.1702 | * | * |
| Alcohol*S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 0.1139 | 0.1139 | * | * |
| Agua*S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 3.1064 | 3.1064 | * | * |

| | | | | | |
|---|----|---------|--------|---|---|
| Interacciones de 4 términos | 1 | 1.1289 | 1.1289 | * | * |
| Alcohol*Agua*S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 1.1289 | 1.1289 | * | * |
| Error | 0 | * | * | | |
| Total | 15 | 89.3886 | | | |

Apéndice 4 ANOVA de turbidez de 3 términos

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|------------------------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Modelo | 14 | 88.2597 | 6.3043 | 5.58 | 0.321 |
| Lineal | 4 | 58.3144 | 14.5786 | 12.91 | 0.205 |
| Alcohol | 1 | 37.3627 | 37.3627 | 33.10 | 0.110 |
| Agua | 1 | 17.5352 | 17.5352 | 15.53 | 0.158 |
| S. Catiónico | 1 | 1.1289 | 1.1289 | 1.00 | 0.500 |
| S. No iónico | 1 | 2.2877 | 2.2877 | 2.03 | 0.390 |
| Interacciones de 2 términos | 6 | 20.1159 | 3.3527 | 2.97 | 0.417 |
| Alcohol*Agua | 1 | 11.8164 | 11.8164 | 10.47 | 0.191 |
| Alcohol*S. Catiónico | 1 | 3.2852 | 3.2852 | 2.91 | 0.338 |
| Alcohol*S. No iónico | 1 | 0.6602 | 0.6602 | 0.58 | 0.584 |
| Agua*S. Catiónico | 1 | 3.1952 | 3.1952 | 2.83 | 0.341 |
| Agua*S. No iónico | 1 | 0.0827 | 0.0827 | 0.07 | 0.832 |
| S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 1.0764 | 1.0764 | 0.95 | 0.508 |
| Interacciones de 3 términos | 4 | 9.8294 | 2.4573 | 2.18 | 0.465 |
| Alcohol*Agua*S. Catiónico | 1 | 6.4389 | 6.4389 | 5.70 | 0.252 |
| Alcohol*Agua*S. No iónico | 1 | 0.1702 | 0.1702 | 0.15 | 0.764 |

| | | | | | |
|--|----|---------|--------|------|-------|
| Alcohol*S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 0.1139 | 0.1139 | 0.10 | 0.804 |
| Agua*S. Catiónico*S. No iónico | 1 | 3.1064 | 3.1064 | 2.75 | 0.345 |
| Error | 1 | 1.1289 | 1.1289 | | |
| Total | 15 | 89.3886 | | | |

Anexo

Anexo 1

LA VOZ DE LA FRONTERA Mexicali, 29 de marzo de 2021

LOCAL - POLICIACA - MÉXICO - REPÚBLICA - MUNDO - FINANZAS - ANÁLISIS - GOSSIP - CÍRCULOS - CULTURA - DOBLE VÍA - DEPORTES - C

TENDENCIAS > Mexicali Policiaca Secuestro Rebrote Covid-19 Vacuna Covid-19 Cateo Baja California Semana Santa

LOCAL / LUNES 6 DE ABRIL DE 2020

¡SANITIZANTE CIMARRÓN! Ingenieros de la UABC crean desinfectante especial para COVID-19

Es totalmente donado a las instituciones públicas de salud para desinfectar las áreas de atención de casos de coronavirus

Foto | Valeria Llamas | La Voz de la Frontera

LO+VISTO

- POLICIACA** 1 Fallece hombre en volcadura en Valle de Mexicali
- POLICIACA** 2 Encapuchados matan hombre sobre carretera Ahumada
- LOCAL** 3 Esconden en Ayuntamiento documento de municipalización de San Felipe Rosales
- POLICIACA** 4 Asegura Ejército millonario cargamento de drogas en San Felipe

<https://www.lavozdelafrontera.com.mx/local/sanitizante-cimarron-ingenieros-de-la-uabc-crean-desinfectante-especial-para-covid-19-5067344.html>

Anexo 2



<http://gaceta.uabc.mx/notas/academia/rocion-sanitizante-cimarron-en-espacios-publicos-de-la-uabc>

Anexo 3



<http://www.campusmilenio.mx/notasd/150620uabcsanitizan.html>

Anexo 4

Fotos: Angélica Gómez e Isaac Coronado

Galería relacionada

Desarrollan investigadores cimarrones sanitizante para prevenir contagios de COVID-19



<http://gaceta.uabc.mx/notas/academia/desarrollan-investigadores-cimarrones-sanitizante-para-prevenir-contagios-de-covid>

BRINDAN PROTECCIÓN A LA COMUNIDAD UNIVERSITARIA

Rocián desinfectante Cimarrón en espacios públicos de la UABC

Redacción CAMPUS

Se realizó la desinfección de la Unidad Universitaria Mexicali I de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por parte del Instituto de Ingeniería, bajo la dirección de Mario Alberto Curiel Álvarez, con el objetivo de brindar una protección adicional a los trabajadores universitarios y personas de la comunidad que hacen uso de las áreas públicas de la institución.

Cerca de 100 litros de sanitizante Cimarrón concentrado fueron rociados utilizando motobombas de aspersión, comentó el doctor Curiel Álvarez, quien agregó que se cubrieron entradas y exteriores de los edificios, así como parada de autobuses, banquetas y lugares donde exista posible concentración de individuos.

En esta ocasión se formuló una variación de amplio espectro y larga duración del sanitizante Cimarrón, con base en cuaternarios de séptima y cuarta generación con nanopartículas de plata, cobre y



- Limpieza. El líquido limpiador se aplicó mediante motobombas de aspersión.

A CONCIENCIA.
CADA UNIDAD RECIBIÓ
OTRO TIPO DE ANTI-
SÉPTICO PARA AULAS
Y LABORATORIOS.

dióxido de titanio, fabricadas en el laboratorio del Instituto de Ingeniería de la UABC.

Por su parte, Benjamín Valdez Salas, jefe del Departamento de Corrosión y Materiales Avanzados del Instituto, señaló: “Esta variación del sanitizante Cimarrón está diseñada para una duración de tres semanas y mientras no haya un lavado excesivo en estas áreas, la duración se puede extender a tres meses, la idea es continuar después con una dosis más diluida y que el campus se mantenga sanitizado”.

<http://imageninstitucional.uabc.mx/node/67910>

Promotion of Surgical Masks Antimicrobial Activity by Disinfection and Impregnation with Disinfectant Silver Nanoparticles

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of Nanomedicine

Benjamin Valdez-Salas^{1,2}
Ernesto Beltran-Partida^{1,2}
Nelson Cheng³
Jorge Salvador-Carlos²
Ernesto Alonso Valdez-Salas¹
Mario Curiel-Alvarez²
Roberto Ibarra-Wiley²

¹Laboratorio de Biología Molecular y Cáncer, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico; ²Laboratorio de Corrosión y Materiales Avanzados, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico; ³Magna International Pte Ltd, Singapore

Background: The COVID-19 pandemic is requesting highly effective protective personnel equipment, mainly for healthcare professionals. However, the current demand has exceeded the supply chain and, consequently, shortage of essential medical materials, such as surgical masks. Due to these alarming limitations, it is crucial to develop effective means of disinfection, reusing, and thereby applying antimicrobial shielding protection to the clinical supplies.

Purpose: Therefore, in this work, we developed a novel, economical, and straightforward approach to promote antimicrobial activity to surgical masks by impregnating silver nanoparticles (AgNPs).

Methods: Our strategy consisted of fabricating a new alcohol disinfectant formulation combining special surfactants and AgNPs, which is demonstrated to be extensively effective against a broad number of microbial surrogates of SARS-CoV-2.

Results: The present nano-formula reported a superior microbial reduction of 99.999% against a wide number of microorganisms. Furthermore, the enveloped H5N1 virus was wholly inactivated after 15 min of disinfection. Far more attractive, the current method for reusing surgical masks did not show outcomes of detrimental amendments, suggesting that the protocol does not alter the filtration effectiveness.

Conclusion: The nano-disinfectant provides a valuable strategy for effective decontamination, reuse, and even antimicrobial promotion to surgical masks for frontline clinical personnel.

Keywords: surgical mask, antimicrobial, SARS-CoV-2, nanobiotechnology, COVID-19, nanoparticles

Introduction

The current alarming pandemic outbreak-associated to the new severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) results in coronavirus disease 2019 (COVID-19). In worst cases, the COVID-19 causes a severe respiratory disease, which could lead to the death of the patients.¹ Despite COVID-19 reported a lower fatality rate than other SARS-based coronaviruses,¹ the global impact regarding SARS-CoV-2 outstands in its exceptional ability to spread in different communities efficiently.² COVID-19 can lead patients to critical illness or, in the worst scenario, to severe secondary infections by opportunistic microorganisms,³⁻⁵ even when using several protection schemes.⁶⁻⁸ Furthermore, SARS-CoV-2 could be present in asymptomatic infected populations, but with a potential probability to transmit


Correspondence: Benjamin Valdez-Salas
Tel/Fax +526865664154 Ext. 150
Email berval@uabc.edu.mx

submit your manuscript | www.dovepress.com/

Dovepress    
<https://doi.org/10.1177/0924646021101111>

International Journal of Nanomedicine 2021:16 2689-2702

2689

 © 2021 Valdez-Salas et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <https://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution - Non Commercial (unported, v4.0) license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). By accessing this work you hereby accept the Terms. Non-commercial use of this work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 42 and 51 of our Terms (<https://www.dovepress.com/terms.php>).

this viral agent.⁹ Therefore, it is imperative to develop novel and outstanding protective strategies in order to reduce or avoid the transmission of this lethal infection disease.

A critical impact factor raised by the COVID-19 outbreak has been the international dwindled supply chain of protective masks and respirators,¹⁰ which are fundamental to guard healthcare personal and the community. Moreover, the traditional manufacturer design of medical surgical masks is limited to a single use, which strongly influences the items reduced availability. Therefore, a contemporary challenge is an imperative mean to develop efficient decontamination and antimicrobial protocols that can be universally accessible. Several decontamination processes have been applied to reuse surgical masks and respirators, including UV germicidal irradiation, ethylene oxide, dry and steam sterilization in the autoclave, and ionized hydrogen peroxide.¹⁰⁻¹² However, it is important to highlight that those strategies are expensive; some require high-trained personnel, could result in detrimental effects to the masks and are not universally available in hospital installations as well for the social community. Consequently, an exemplary method is one that is simultaneously rigorous enough to afford maximal decontamination and yet provides antimicrobial activity. Interestingly, the textiles of the masks must be effectively decontaminated, incorporating human-safe antimicrobial agents, in order to avoid persistent microorganisms (eg, spore-forming bacteria) on the masks.¹⁰ Nanotechnology has offered a substantial platform to design high surface-to-volume ratio configured materials capable of being fine-tuned for surface textiles, to achieve an optimal antimicrobial effectiveness. Moreover, nanotechnology could play a pivotal role in fighting against nosocomial microbial infections, such as SARS-CoV-2 and its surrogates. For example, AgNPs have been well documented to takedown different viruses by collapsing the envelopment integrity and disaggregation of the viral content,¹³ a hallmarking advantage of AgNPs. Far more critical, metal-loaded nanocomposites into healthcare personnel polymeric equipment (eg, mouth masks) could effectively attenuate the viral viability and the prolonged SARS-CoV-2 persistence.¹⁴ Furthermore, AgNPs have shown important applications in developing broad-spectrum antibacterial coatings,¹⁵ anticancer strategies,¹⁶ and biosensor systems.¹⁷ Thus, an important and innovating option for the shielding of surgical mask fibers with advanced antimicrobial promotion is incorporating AgNPs

functionalized in a high-efficient disinfectant solution. Interestingly, in a previous study, Li et al fabricated surgical masks incorporated with top-down synthesized AgNPs.¹⁸ The AgNPs modified surgical masks illustrated an effective antibacterial action. However, the authors reported that the AgNPs were present as a coating instead of an impregnation process, which can result in a detrimental skin cytotoxicity.¹⁸ Considering the above-stated information, we rely on a promising strategy to formulate a broad-spectrum disinfectant, incorporated with antiviral-off metallic nanoparticles capable of bringing unique antimicrobial properties to the mask textile fibers with only an easy, accessible, and fast application. Therefore, we developed an alcohol-based disinfectant containing quaternary ammonium compounds and surfactants, as an exceptional platform for impregnating and retaining AgNPs in the surgical mask fibers.

This work aims to synthesize high-dispersed spherical 5-13 nm AgNPs by electrochemical dissolution of pure silver to formulate a novel broad-spectrum antimicrobial disinfectant. The nano-developed disinfectant was designed to uniformly coat hydrophobic surgical masks with AgNPs, promoting antimicrobial activity, as well as viral inactivation efficacy for healthcare protection. Our strategy further allows incorporating AgNPs to medical-grade textiles fibers of the surgical masks protecting against microbial penetration and adhesion. The present research has contributed as a novel, cost-effective, and accessible approach for the disinfection of medical textile mask materials to overcome the current limited supply chain that we are facing by the COVID-19. Far more attractive, the medical personnel of our institution and the school of medicine has been applying the present protocol.

Materials and Methods

Synthesis of Silver Nanoparticles

AgNPs were prepared by electrochemical synthesis following the method reported by Huang et al¹⁹ and Khaydarov et al²⁰ with slight modifications. In brief, two high-purity silver rod electrodes of 2 mm diameter (99.999%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) were mechanically polished, washed with double distilled water, fitted using a polypropylene cover, vertically placed face-to-face at a distance of 1 cm, and submerged into a 1-L glass reactor. Next, 1 L of an aqueous solution containing 5 mg/mL PVP (K30, Sigma-Aldrich,

St. Louis, MI, USA) was deposited in the glass reactor and stirred with a PTFE stirrer controlled at 500 RPM at 65 °C. The electrolysis was adjusted to a constant voltage of 20 V, applied between the two electrodes simultaneously, for 1 h using a direct current power supply. The time for alternating polarities between the anode and the cathode was set to 1 min using an alternating polarity control. Finally, the resulting AgNPs solution was filtered (Whatman, No. 4) and stored in an amber glass container at room temperature (RT).

Characterization of Silver Nanoparticles

High-Resolution Transmission Electron Microscopy (HR-TEM)

In order to analyze the structural morphology as well as the size and distribution of AgNPs we applied HR-TEM (JEM-2500SE, Jeol, Peabody, MD, USA). The AgNPs sample was placed drop-by-drop on carbon-coated copper grids and allowed to evaporate inside a controlled desiccator chamber, following a careful manipulation to avoid contamination. Next, the AgNPs were analyzed at 200 kV accelerating voltage to accomplish high-resolution imaging without any modifications, and the size distribution was calculated by counting nanoparticles ($n=80$) present in the micrograph. The interplanar distances were measured using the Image J software (1.48v, NIH, USA), taking the scale bar as a measure reference from the crystal lattices detected by HR-TEM. The ring pattern of the selected area electron diffraction (SAED) is presented for the Ag crystallographic structure.

Dynamic Light Scattering (DLS)

The size distribution (hydrodynamic diameter) and the Z-potential (ZP) of the AgNPs were studied using DLS. An aqueous suspension of AgNPs at pH 7.0 was filtered (Whatman, No. 4) and analyzed using a Nanotrak Wave II (Microtrac, North Wales, PA, USA) system with a delaying time of 30 s and a run time of 30 s at RT.

Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV-Vis)

The UV-Vis analysis of the AgNPs suspension in deionized water was acquired using a UV/Vis spectrophotometer (UV-2600, Shimadzu, Japan), applying a scanning in the wavelength region of 300–600 nm with a resolution of 1 nm at RT.

X-Ray Diffraction (XRD)

The pattern phases of the AgNPs were studied using a Bruker Advance D8 (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) diffractometer operated with a $\text{Cu K}\alpha$ radiation detector, a scatter screen height of 5 mm, a voltage of 30 kV and 30 mA. The scans were performed from 30° to 100° using a step size of 0.034° 2 θ .

Disinfectant Formulation and Surgical Mask Disinfection by AgNPs Impregnation

The present formulation represents the results of different chemicals tested for improving AgNPs incorporation and promoting antimicrobial activity into the surgical masks (part of the patent application No. 10202002135U). Therefore, we developed the disinfectant formulation by incorporating an aqueous solution of AgNPs (10% v/v) including 2% citric acid, into an ethanol aqueous solution (45% V/V ethyl alcohol) containing 0.03% triclosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA). Then, 0.2% of triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) and 0.3% lauryl alcohol ethoxylate (LAE, 9 moles ethylene oxide; Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) were added and thoroughly homogenized. Next, different concentrations of benzalkonium chloride (BC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) were incorporated, as indicated in Table 1, to evaluate the effect in the antimicrobial activity. The corresponding final volume was completed with superoxidized water solution (Microdacyn 60[®], Oculus Technologies, Guadalajara, México). In order to disinfect, impregnate AgNPs and promote antimicrobial activity to the surgical mask, we dipped the textile material into the disinfectant for 5 min at RT and dried in a controlled desiccator until complete dryness.

Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy (FT-IR) of the AgNPs-Impregnated Surgical Masks

To explore the chemical groups' modifications followed by impregnation with AgNPs, an attenuated total reflection (ATR) FT-IR spectrometer (Frontier, Perkin Elmer, USA) was used. The spectra were acquired at a resolution of 1 cm^{-1} applying a scanning range of 400–4000 cm^{-1} .

Table 1 Formulated Disinfectants for Antimicrobial Activity of Surgical Mask Fibers

| | Formulation a | Formulation b | Formulation c | Formulation d |
|----------------------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
| BC | 0 | 0.05 | 0.1 | 0.2 |
| Ethanol-water 45% V/V | 85 | 85 | 85 | 85 |
| Triclosan | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| AgNPs | 10 | 10 | 10 | 10 |
| LAE | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Triton X-100 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Citric acid | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Microdacyn 60 [®] | To complete 100% | | | |

Abbreviations: BC, benzalkonium chloride; AgNPs, silver nanoparticles; LAE, lauryl alcohol ethoxylate. Values are represented in percentage (%).

Field-Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM) of the AgNPs-Impregnated Surgical Masks

The impregnation of AgNPs into the surgical mask fibers was characterized using FE-SEM (LYRA 3, Tescan, Brno, Czech Republic), at 10 kV accelerating voltage with a backscattered electron detector. The surgical masks previously dipped in the disinfectant formulation containing AgNPs, and dried at RT in a controlled desiccator, were sampled on a double-sided adhesive carbon conductive tape before FE-SEM analysis.

Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX) of the AgNPs-Impregnated Surgical Masks

The chemical analysis was carried out by EDX (XFlash 6130 Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) coupled to the FE-SEM, at 10 kV with a large spot size to adjust a suitable count rate per second for spectrum collection.²¹

Water Contact Angle (WCA) of the Surgical Masks

The WCA of the experimental surgical masks was evaluated by depositing a 5 μ L droplet of deionized water at 25^o C and 45% relative humidity for 0s, 5s, and 10s.^{22,23} An automatized tensiometer (Theta Attension; Biolin Scientific, Gothenburg, Sweden) equipped with an X-Y syringe and a high-performance CCD camera was used to capture high-resolution images. The WCA values were quantified using the ONE Attension software (Biolin

Scientific, Gothenburg, Sweden) which enables a highly precise analysis of the two angles of the drop.²¹

Microbial Culture

Pathogenic models of nosocomial microbial infectious diseases strongly associated with secondary infections followed COVID-19 [3, 4] were used as supporting surrogates of SARS-CoV-2 for antimicrobial activity. The Gram-negative models tested were *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*, ATCC 13883) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, ATCC 27853). The Gram-positive bacterium was *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25923). A yeast infection model was *Candida albicans* (*C. albicans*), isolated from an oral denture candidiasis patient as previously described.^{21,24} In order to prepare the working microbial cultures, discrete colonies of freshly grown cells were inoculated each separately into newly prepared Tryptic soy broth (TSB; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) for bacteria and potato dextrose broth (PDB; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) for *C. albicans*. Furthermore, each inoculum was diluted in the corresponding newly broth to approximately 1×10^7 colony-forming units (CFU)/mL, which was used as microbial concentration for the antimicrobial studies.²⁵

Antimicrobial Activity of the Disinfectants by Recovery Media Evaluation

For the evaluation of the antimicrobial activity of the disinfectant formulation at different BC concentrations, we performed the neutralization and recovery of viable

cells technique reported by Dey and Engley with slight modifications.²⁶ One milliliter of the each formulated disinfectant (Table 1) was deposited into 8.9 mL of Dey and Engley (D/E) neutralizing broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), mixed thoroughly and incubated for 30 min at RT. Next, the mixture was inoculated with 0.1 mL of each working microbial culture in separate and incubated at 37°C for 48 h. Afterwards, each culture tube was carefully shaken for 15s, 0.1 mL of each culture mixture was plated on to a fresh D/E agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) plate. Each microbial evaluation was incubated at 37°C for 48h. After incubation, the recovered organism was counted and expressed as log₁₀ of CFU/mL.

Microbial Challenge Study

The microbial challenge was carried out following the Mexican Official Norm guidelines for germicidal testing NMX-BB-040-SCF1-1999.²⁷ This norm indicates that any germicide must reduce the initial viable microbial load of *E. coli* and *S. aureus* by 99.999% in 30 s of exposure, at the recommended dose. For the present study, we used the working microbial cultures, as stated above. Initially, 1 mL of each microbial suspension was transferred to 9 mL of the disinfectant formula containing 0.2% BC, using a sterile pipette. Consecutively, a calibrated time was immediately adjusted and initiated at different experimental times (0.5, 1.0, 5.0, and 10.0 min). Next, at the corresponding time points, each suspension was gently homogenized, and 1 mL of culture mixture was diluted with 9 mL of D/E neutralizing broth. Subsequently, 1 mL of the neutralized solution was plated and spread on tryptic soy agar (TSA; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) plates. Two plates per condition were used and incubated at 35°C for 48 h, in aerobic conditions. The resulting number of growing colonies on each plate was counted, and the reduction percentage was calculated using the initial microbial load. On the other hand, positive controls for each microorganism were tested in parallel using deionized water. The negative controls were the commercially available disinfectants Lysol® (Benckiser, México) and Dermocleen® (D.C.; Degasa, México) following the manufacturer's recommendations.

Agar-Diffusion Test of the Formulated Disinfectants

The antimicrobial diffusion activity of the formulated disinfectants was evaluated applying the agar diffusion

test.²⁶ Initially, 0.1 mL of separate test organisms were cultured on TSA plates (25 mL of liquid TSA per 100 mm petri dish). After 30 min, we generated 3 holes of 7 mm diameter and 4 mm depth per dish. Next, 50 µL of the corresponding testing disinfectant was loaded separately for each organism and incubated at 37°C for 24h. The resulting inhibition zones (IZ) were measured using an electronic digital caliper and digitalized on a dark field colony counter (Reichert, NY, NY, USA).

Agar-Diffusion Test of the AgNPs-Impregnated Surgical Masks

To perform the diffusion test from AgNPs-impregnated surgical masks, we soaked 0.5 cm² of textile materials into 10 mL disinfectant formula containing 0.2% BC and dried at RT. Next, 0.1 mL of each freshly prepared working organism was spread onto TSA plates. After 1h, three pieces of impregnated surgical masks were placed on the TSA and incubated at 37°C for 24 h.²⁶ The resulting IZ were measured using an electronic digital caliper and digitalized on a dark field colony counter (Reichert, NY, NY, USA).

Antiviral Activity of the Disinfectant

We used the enveloped H5N1 avian influenza virus model, as a viral surrogate of coronavirus, following the procedures described elsewhere,²⁸ with slight modifications. A viral stock at 10^{7.7} egg infectious dose 50 (EID 50) was propagated in the allantoic cavities of embryonated hen's eggs. Next, a diluted virus working culture (10^{5.0} EID 50) was prepared in PBS containing 500 units/mL penicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), 500 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), and 1.25 µg/mL amphotericin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA). Then, 250 µL of the diluted virus was mixed with 500 µL of a 1:1 dilution of the 0.2% B. C. formulated disinfectant (in sterile distilled water) and incubated for 15 min at 37°C. Then, 200 µL of the disinfectant mixture was injected into the allantoic cavities of three 11-day-old embryonated hen's eggs and incubated at 37°C till the embryos die. The allantoic fluid was aseptically separated and analyzed using a rapid hemagglutination test for avian influenza. The presence of hemagglutination was considered positive for H5N1 virus survival.

Statistical Analysis

Data analysis was performed using the results of three independent studies elaborated each in triplicate. The numerical information was expressed as the mean \pm standard deviation (SD) and analyzed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The significance of differences was tested using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison tests, and Student *t*-Test when appropriate.²⁹ A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results and Discussion

The current outbreak-associated with the COVID-19 is demanding novel strategies which generate solutions to assess the shortage of surgical masks and even different medical textile materials.² Our main objective was to develop a broad-spectrum disinfectant with high antimicrobial AgNPs for surgical masks shielding, which could be

accessible and easy to use for our medical staff and the population. Thus, we synthesized AgNPs using a simple electrochemical etching method. Initially, the AgNPs presented a spherical-like morphology, that were highly monodispersed (Figures 1A and S1), as expected.¹⁹ The HR-TEM characterization suggested that sphere NPs (Figure 1B) presented a detailed interplanar space of 2.33 Å (Figure 1C). Thus, suggesting the (111) crystallographic plane strongly referred to that of Ag⁰ species are composing the AgNPs.³⁰ This interesting observation matches to those observed in our SAED analysis (Figure 1D) and agrees with previous reports of AgNPs.^{30,31} Moreover, according to the TEM results, the size distribution of the AgNPs is 13.2 \pm 4 nm showing a narrow size curve, as indicated in Figure 1E. Furthermore, the surface plasmon resonance (SPR) of AgNPs was 405 nm (Figure 1F), further following a narrow peak-valley behavior advising a monodispersity distribution³¹ and part of the metallic state of Ag⁰

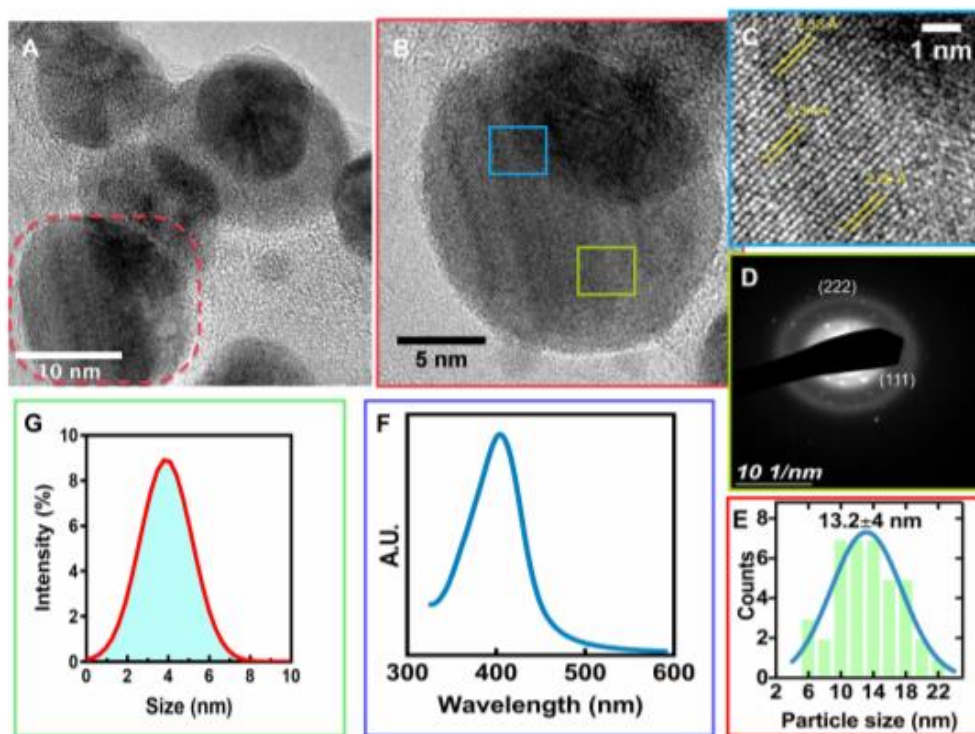


Figure 1 Physicochemical characterization of the AgNPs. (A) HR-TEM micrograph illustrating the morphology of AgNPs, the red dotted area illustrates a magnification represented in (B). (C) Interplanar distances of the AgNPs. (D) SAED patterns of AgNPs. (E) Particle size distribution by HR-TEM. (F) UV-Vis spectrum of the AgNPs. (G) DLS analysis of AgNPs.

species,²⁰ in accordance to Figure 1E and D. The DLS proposed that the AgNPs in solution showed a small diameter of 3.5 nm with a stable ZP of -112.2 mV. The present results point toward that the electrolysis technique designed for AgNPs fabrication initially involves the dissolution of the Ag rod by losing electrons to form Ag^+ , thus far, acting as a sacrificial anode.²⁰ Then, Ag^+ species could be reduced on the cathode, generating zero-valent Ag^0 and by van der Waals forces, the Ag^0 can nucleate and grow to AgNPs.¹⁹ In order to control the nucleation process, we included PVP in the synthetic protocol. The asymmetric chemical structure of the pyrrolidone group allows an excellent dispersant ability to control the nucleation of AgNPs³² and protects of extensive NPs agglomeration.

A critical issue for promoting antimicrobial effectiveness to clinical surgical masks is in an accurate, controlled, and dispersed deposition of AgNPs. Thus, we applied FE-SEM

on the experimental masks, discovering a well-homogenized AgNPs distribution with slight conglomeration of AgNPs (Figure 2A). Interestingly, the as-observed agglomeration zones may promote a better integration of the fibers with Ag^0 species (as suggested by SAED), which inversely can be translated in increased antimicrobial action (as discussed later). Moreover, the high-zoom presented in Figure 2B and C showed consistent outcomes of AgNPs coating over the broad surfaces of the fibers, and a dispersed deposition of smaller AgNPs as illustrated in Figure 2D (see insets). Interestingly, a nanoagglomeration phenomenon could be detected because of the drying effect applied to the coated fiber. Importantly, it has been wide documented that the stability of colloidal metallic nanoparticles (eg, AgNPs) are primarily dependent of the solvent suspension, the ionic strength, the pH, and the type of capping agent.³³ Those factors can provide steric and/or electrostatic repulsion,

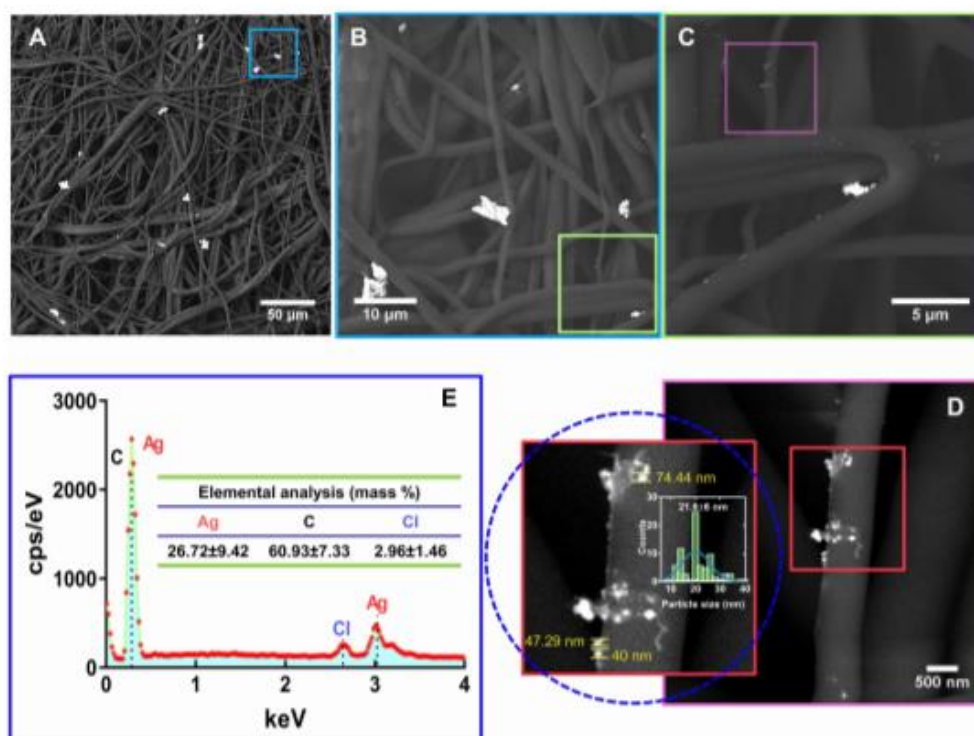


Figure 2 Physicochemical characterization of surgical mask fibers impregnated with AgNPs. (A) FE-SEM micrograph of incorporated AgNPs onto the fibers. (B) AgNPs deposition over the fibers at higher magnification. (C) High zoom illustration of the AgNPs deposition on the fibers. (D) Surface-contact interaction behavior between AgNPs and fiber surface, illustrating a homogenous NPs deposition. (E) EDX.

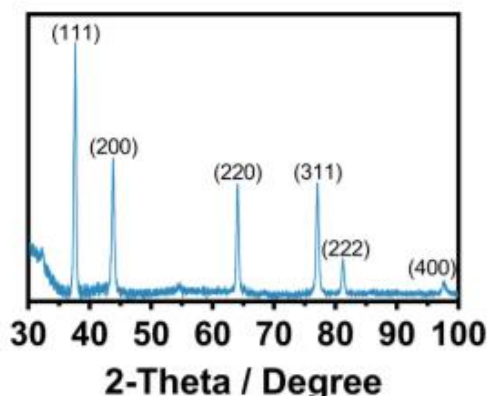


Figure 3 XRD patterns showing the face orientation of the AgNPs.

which substantially influence in preventing AgNPs agglomeration. However, when AgNPs are submitted to drying processes, most of the above-mentioned physicochemical parameters are avoided; therefore, AgNPs could not effort the required dispersing repulsive charges. Thus consequently, AgNPs become extremely susceptible to agglomeration and deposition.³⁴ In a previous study, I. Osório et al deposited AgNPs on cotton fibers, thus resulting in AgNPs deposition being dependent on the concentration.³⁵ However, the electrostatic energy provided by the fiber surfaces could increase the aggregation rate by declining the electrostatic energy barrier to conduct AgNPs aggregations.^{33,36} Therefore, our results suggested that the AgNPs distribution over the surgical mask were of 21.6±6 nm. It is important to highlight that our present study showed an efficient impregnation of AgNPs among the surface fibers, without the formation of a thick NPs coating that could raise detrimental alterations to the textile fibers. On the other hand, the EDX analysis illustrated the presence of silver element (26.72 ±9.42%) over the textile fibers (Figure 2E), far more supporting the presence of AgNPs. Our results are in accordance with Hiragond et al, which suggested the deposition of 9–14 nm AgNPs on the textile surgical mask surface.³⁷ The authors indicated an elemental Ag concentration of 12.93% by EDX, almost half of those observed here. This interesting behavior can be explained by considering two essential strategies: 1) AgNPs developed by chemical reduction vs our electrochemical AgNPs and 2) the coating of as-prepared AgNPs versus those formerly impregnated in our disinfectant containing surfactants. Surgical mask fibers are intended to

be hydrophobic, thus, surfactants are special chemical compounds that can act as a platform to reduce the surface tension between a liquid and a solid surface.³⁸ Therefore, the application of triton X-100, LAE, and BC (quaternary ammonium base) will serve as a cornerstone for efficient impregnation and dispersion of AgNPs into the fibers,^{39,40} without developing a cracking coating, as compared to those previously reported.³⁷ On the other hand, the electrochemical synthetic pathway results in the formation of mainly Ag⁰ (Figure 1D), enabling efficient incorporation of Ag⁰/Ag⁺. Consequently, the related protocol could exacerbate the formation of a rougher, thicker, and non-homogenous Ag layer that could detriment the mask properties. On the other hand, the XRD analysis of the AgNPs Figure 3 showed significant peaks corresponding to the centered cubic phase of Ag⁰. The peaks were assigned at 2θ of 37.61° (111), 43.79° (200), 64.06° (220), 77.05° (311), 81.19° (222) and 97.7° (400) indicating, the classical crystalline plane of Ag. The diffraction patterns are in agreement with the JCPDS 04–0783, our SAED results (Figure 1D), and previous works.⁴¹

As represented in Figure 4, we did not detect significant chemical shifting after incorporating the AgNPs with the surfactants at different BC concentrations. However, the FT-IR illustrated that the impregnation process does not alter the chemical configuration of the mask textiles, as we only identify some variable intensities. Interestingly, a decreased peak behavior was detected in the region of 1300–1100 cm⁻¹, suggesting a reduced C-O stretching bonding by the increment in the BC and better incorporation of the Ag⁰ species. Moreover, the heightened

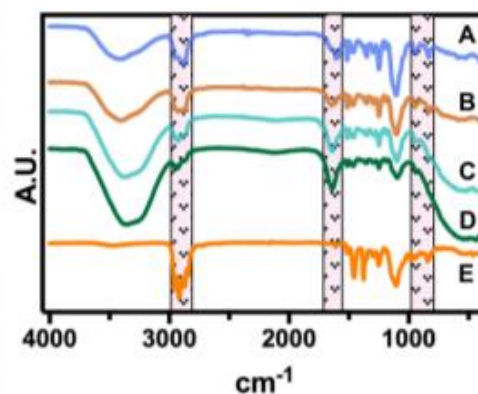


Figure 4 FTIR spectroscopy of the surgical mask fibers with AgNPs at different BC concentrations. (a) 0%, (b) 0.05%, (c) 0.1%, (d) 0.2% and (e) without surfactants.

concentration of BC correlates to the aromatic C–C vibration detected in the region of 1600 cm^{-1} , proposing that the quaternary ammonium has been incorporated. Similarly, the AgNPs did not show any significant chemical shifting, only highlighting the absence of the –OH in the region of $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$. Far more attractive, the classical C–H stretching in the region of $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ were almost similar between the different treatments. Taking together the FT-IR and FE-SEM analyses, we can hypothesize that the structural properties of the textile masks are not degraded after disinfectant incorporation.⁴² Far more attractive, Fisher et al studied the filtration effectiveness of N95 respirators decontaminated in several cycles of 70% ethanol immersions.⁴³ The results indicated that 70% ethanol disinfection did not significantly alter the filtration efficiency of the respirator. Thus, affording, a significant disinfection rate of SARS-CoV-2 for the ethanol solution. The front-line shreds of evidence provided by Liao et al showed that surgical mask fibers disinfected using extremely high temperatures under different humidity conditions do not compromise the filtration efficiency.⁴⁴ The authors discovered that almost 20 cycles of 100°C for 5 min were not enough to alter the pressure drop of the textile fibers.⁴⁴ Moreover, in a previous study Cui et al proposed that transparent nanofiber membranes of polyvinyl alcohol and sodium lignosulfonate could adequately filtrate particle matter of 2.5, even after 10 cycles of circulation filtration.⁴⁵ Far more important, we applied WCA over a 0.2% BC-impregnated mask and a control non-treated mask (Figure S2). The results advocated that the impregnation process does not promote a significant water uptake behavior, as the droplets' morphologies were similar (Figure S2A). On the other hand, the quantitative analysis did not indicate significant differences, further supporting a relevant hydrophobicity performance after the impregnation process (Figure S2B), thus in accordance to previous works.^{22,23} Hence, we suggest that the filtration capability by our decontamination process is not negatively compromised, as we did not detect morphological, chemical and wetting alterations. However, we recommend a future evaluation of aerosol filtration performance after several disinfecting cycles and mechanical test integrities.

The current SARS-CoV-2 outbreak has shown an impressive survival capability under different environmental conditions and surface materials. Moreover, recent studies have shown that SARS-CoV-2 can present a long half-life capability on common stainless steel and plastic

surfaces.⁴⁶ Furthermore, Chan et al suggested that SARS-CoV-2 conserve stable viability for 3–5 days under dry conditions, and as far as 7 days in solution conditions ($20\text{--}25^\circ\text{C}$).⁴⁷ Additionally, this research group described that SARS-CoV-2 could stay active for up to 14 days at 4°C , which indicates the prolonged viral capability to spread by contact with contaminated surfaces. Despite the noteworthy survival ability of this pathogen, it has been described that can be inactivated and eliminated using several disinfectants, such as those based on alcohol formulas.⁴⁸ Therefore, we designed a new disinfectant based on 45% ethanol solution with protein destabilizing surfactants, superoxidized water, triclosan and fortified with AgNPs, for surgical mask disinfection and shielding. Applying the recovery media technique proposed by Dey and Engley,²⁶ we detected that the BC, And, 0.2% formula completely eradicated the growing ability of Gram (+), and (–) bacteria (Figure 5). Moreover, this trend was also detected for *C. albicans*, an opportunistic yeast capable to develop nosocomial infections.²¹ Interestingly, the commercially acceptable disinfectant products showed similar outcome of disinfection; however, they diverge from AgNPs. It is important to highlight that the applied recovery media strategy essentially counteract the inhibitory action of the above selected chemicals, thus allowing the direct interaction with AgNPs (data not shown). Indicating that our new designed disinfectant is capable to eliminate an important number of microorganism associated with COVID-19 related secondary infections.^{3,4} A cornerstone for disinfectant effectiveness consists in a comprehensive reduction viability of 99.999% for up to 30 s. On this basis, we applied the microbial challenge test for 0.2% BC formulation, resulting in 99.999% reduction for the evaluated microorganisms.

In order to analyze the competing antimicrobial action between the disinfectants, we used the agar diffusion test (Figure 6). Interestingly, the Gram (–) bacterial models showed among comparable outcomes of antibacterial activity. Furthermore, the Gram (+) model indicated a similar behavior as those of Gram (–), which suggested remarked checkpoints of dose-dependent manner, as advocated by the increasing BC concentrations. However, in the *E. coli* and *C. albicans* models, we observed a superior action for our disinfectant even than those of the Lysol product (Figure 6). Taking together the results presented in Figures 5 and 6, we can highlight that these used microorganisms can be considered as effective surrogates of SARS-CoV-2. Bacteria, and of particular interest fungi, present a more complex structural

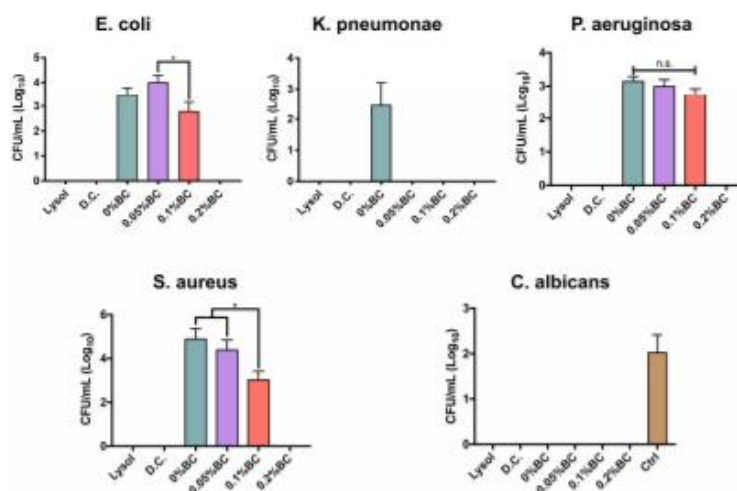


Figure 5 Broad-spectrum microbial viability assessment of the formulated disinfectants containing AgNPs and the corresponding commercial controls. The * indicates significant differences. n.s. shows non-significant changes.

Abbreviations: D.C., Dermoclean[®]; BC, benzalkonium chloride.

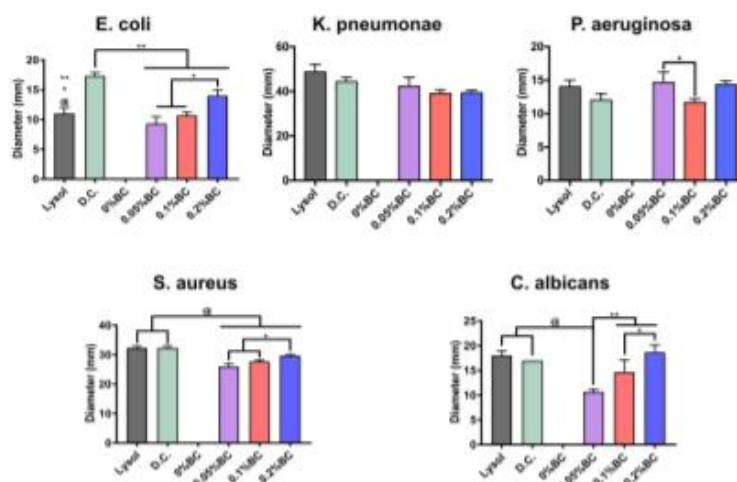


Figure 6 Antimicrobial activity of the formulated disinfectants with AgNPs including the commercial controls. The *, ** and ® indicates significant differences among the experimental formulations.

Abbreviations: D.C., Dermoclean[®]; BC, benzalkonium chloride.

physiology, which turned them less susceptible to chemical microbicidal processes than enveloped viruses, such as SARS-CoV-2.¹⁰ On the other hand, a featured trend of antimicrobial action was detected for the striking broad-spectrum generated by the AgNPs-impregnated surgical

mask textiles (Figure 7). As allocated for the textiles, the microbial models were extensively sensitive to direct contact evaluation. Concomitantly, the fungi organism presented an outstanding antifungal action, further compared to inferior complex bacterial models. Our results are in accordance with

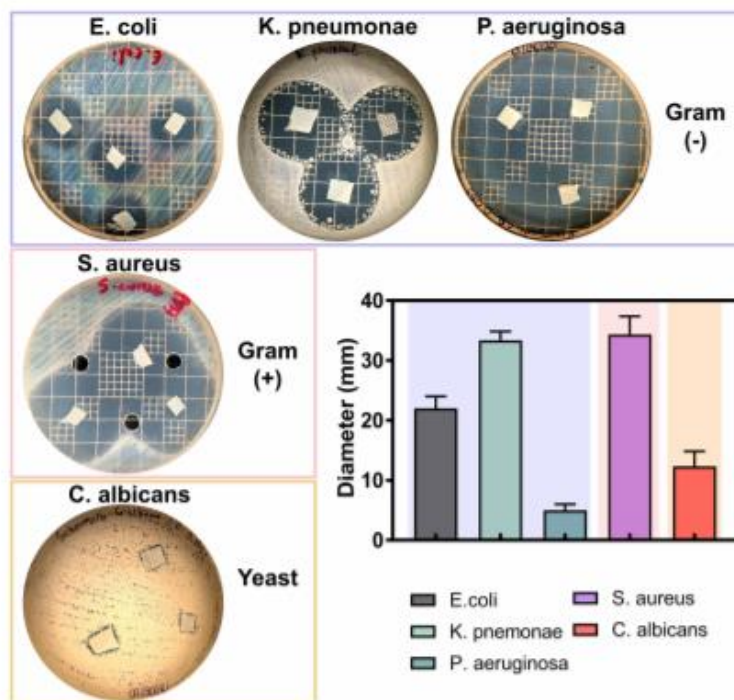


Figure 7 Antimicrobial activity of the impregnated surgical masks with 0.2% BC formulation containing AgNPs. Abbreviations: D.C., Dermoclean®; BC, benzalkonium chloride.

a previous work of antibacterial surgical mask developed with AgNPs and TiO₂NPs.¹⁸ The authors synthesized the metallic NPs using a top-down pulverization approach, which were coated using a textile rolling machine. Moreover, Hiragond et al used colloidal AgNPs by chemical reduction and generated a thick silver coating on surgical mask fibers.³⁷ The coating resulted in a promoted antibacterial action against *S. aureus* and *E. coli*. However, the application of those coating strategies could lead to an obliteration of the AgNPs, due to a most direct contact with the human skin and bulk delivery of silver.^{18,49} Similarly, a detrimental mask integrity, thus decreasing the filtration efficiency. Hence, a current trend is selecting an impregnation strategy that may improve the incorporation of the AgNPs into the textiles,⁴⁹ resulting in an improved antimicrobial and viral-off action due to the slow and continuous release of silver, as observed here. Importantly, our novel strategy supported a distributed incorporation of AgNPs among the textile fibers, which may strongly decrease the AgNPs leakage into the dermal contacting tissue.⁵⁰ Interestingly, AshaRani

et al suggested that starch-coated AgNPs (6–20 nm) could induce alterations in the morphology, viability, metabolic activity, and reactive oxygen species activation in human fibroblasts.⁵¹ However, the authors indicated that its required concentrations higher than 50 µg/mL and direct contact periods longer than 48h to reduce almost 20% of the ATP activity.⁵¹ Furthermore, a previous study of commercially available spherical 20 nm AgNPs (≈ 7 ppm) proposing 80% reduction in the L929 mouse fibroblasts metabolic activity after 24h of continuous contact.⁵² On the other hand, it has been documented that AgNPs could exacerbate a given ecological impact, principally when infused into soil and water systems.⁵³ Nonetheless, despite the controversial effect of AgNPs on microbiota and plant systems, studies have indicated that long-lasting AgNPs regimens are mainly linked to overcoming toxic and imbalanced ecosystem impairments.⁵⁴ Therefore, it is substantial to highlight that the AgNPs concentration used for the impregnation formulation is several folds lower than those previously reported of harmful effects. Further proposing that our formulation is

ecofriendly and the level of AgNPs used is tolerable for mammalian cells. Hence, supporting that the impregnation process could decrease the AgNPs leakage could provide a future alternative for recycling surgical masks, reducing the environmental pollution.

Importantly, our disinfectant solution suggested a complete inactivation of the H5N1 virus activity, as non-hemagglutination was detected. It is essential to highlight that H5N1 avian influenza shares an enveloped structure that conserves stability against different chemical and environmental conditions.^{55,56} Thus, illustrating similar trends of viral behavior such as SARS-CoV-2. Therefore, considering that the H5N1 highly pathogenic pandemic strain was inactivated using our nano-formulation, we can firmly state that our decontamination process will give confidence in an appropriate safety margin for sufficient SARS-CoV-2 inactivation and additional benefits of disinfecting other viral pathogens.

Due to the information we recollected, this work presents the performance of an affordable, simple method for the formulation and impregnation of a nano-disinfectant within surgical masks. This novel strategy will provide an outstanding effort to decontaminate and reuse surgical masks in clinical environments, as an endeavor to attend to the current shortage of the supply chain. Moreover, we believe that the insertion of AgNPs will significantly reduce the transmission of broad-spectrum pathogens, thanks to the viral-off activity demonstrated here. Our novel method could be extended for N95 respirators and different medical grade textiles; however, more studies to demonstrate improved effectiveness are under work.

Conclusion

The current outbreak-associated with the SARS-CoV-2 transmission has resulted in an alarming increment of COVID-19 cases. Moreover, a countering side-effect that is facing the healthcare staff has been the shortage in the supply chain regarding the minimal protective equipment. Therefore, in the present study, we developed a new nano-formulation intended to promote antimicrobial activity into surgical mask fibers by impregnating AgNPs as a safety increasing factor. Our nano-disinfectant application resulted in a firm and controlled impregnation of AgNPs without illustrating fiber alterations, suggesting conserved filtration effectiveness. Far more attractive, our results communicate an extensive antimicrobial activity against secondary associated COVID-19 bacterial infections and *C. albicans*, a problematic nosocomial opportunistic yeast. Moreover, the antiviral efficiency of

our nano-disinfectant showed effective viral inactivation outcomes against H5N1, a pandemic enveloped surrogate of SARS-CoV-2. A significant step forward was the effective antimicrobial action of the impregnated fibers, suggesting a substantial shielding by the AgNPs impregnation. Given the importance of engineering the personnel protective equipment, the present work brings an affordable, effective, and integrated approach for improving the reuse of surgical masks. Likewise, our contribution has potential applications for N95 respirators and different clinical textile materials.

Acknowledgments

The authors wish to thank the program No. A1-S-38368, "Proyecto Apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación" CB2017-2018, SEP-CONACYT, for financial support. The authors also acknowledge Dr Minerva Guerra-Balcazar for her valuable support for the XRD analysis and interpretations.

Author Contributions

All authors made substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; took part in drafting the article or revising it critically for important intellectual content; agreed to submit to the current journal; gave final approval of the version to be published; and agree to be accountable for all aspects of the work.

Disclosure

Dr Benjamin Valdez-Salas and Dr Ernesto Beltran-Partida report grants from Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnologia, during the conduct of the study. The authors declare no other competing interest regarding the publication of this work.

References

1. Sun P, Qie S, Liu Z, Ren J, Li K, Xi J. Clinical characteristics of hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection: a single arm meta-analysis. *J Med Virol*. 2020;92(6):612–617. doi:10.1002/jmv.25735
2. Wang L, Didelot X, Yang J, et al. Inference of person-to-person transmission of COVID-19 reveals hidden super-spreading events during the early outbreak phase. *Nat Commun*. 2020;11(1):5006. doi:10.1038/s41467-020-18836-4
3. Salehi M, Ahmadikia K, Badali H, Khodavaisy S. Opportunistic fungal infections in the epidemic area of COVID-19: a clinical and diagnostic perspective from Iran. *Mycopathologia*. 2020;185(4):607–611.

4. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2020;81(2):266–275. doi:10.1016/j.jinf.2020.05.046
5. Manohar P, Loh B, Nachimuthu R, Hua X, Welburn SC, Leptihn S. Secondary bacterial infections in patients with viral pneumonia. *Front Med*. 2020;7:420. doi:10.3389/fmed.2020.00420
6. Eikenberry SE, Mancuso M, Iboi E, et al. To mask or not to mask: modeling the potential for face mask use by the general public to curtail the COVID-19 pandemic. *Infect Dis Model*. 2020;5:293–308. doi:10.1016/j.idm.2020.04.001
7. Chu DK, Akl EA, Duda S, et al. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2020;395(10242):1973–1987. doi:10.1016/S0140-6736(20)31142-9
8. Bartoszko JJ, Farooqi MAM, Alhazzani W, Loeb M. Medical masks vs N95 respirators for preventing COVID-19 in healthcare workers: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Influenza Other Respi Viruses*. 2020;14(4):365–373. doi:10.1111/irv.12745
9. Pascarella G, Strumia A, Piliego C, et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *J Intern Med*. 2020;288(2):192–206. doi:10.1111/joim.13091
10. Pascoe MJ, Robertson A, Crayford A, et al. Dry heat and microwave-generated steam protocols for the rapid decontamination of respiratory personal protective equipment in response to COVID-19-related shortages. *J Hosp Infect*. 2020;106(1):10–19. doi:10.1016/j.jhin.2020.07.008
11. Zulauf KE, Green AB, Nguyen Ba AN, et al. Microwave-generated steam decontamination of N95 respirators utilizing universally accessible materials. *mBio*. 2020;11(3):e00997–00920. doi:10.1128/mBio.00997-20
12. Cheng YCC, Wong SC, Kwan GSW, Hui WT, Yuen KY. Disinfection of N95 respirators by ionized hydrogen peroxide during pandemic coronavirus disease 2019 (COVID-19) due to SARS-CoV-2. *J Hosp Infect*. 2020;105(2):358–359. doi:10.1016/j.jhin.2020.04.003
13. Talebian S, Wallace GG, Schroeder A, Stellacci F, Conde J. Nanotechnology-based disinfectants and sensors for SARS-CoV-2. *Nat Nanotechnol*. 2020;15(8):618–621. doi:10.1038/s41565-020-0751-0
14. Sportelli MC, Izzi M, Kukushkina EA, et al. Can nanotechnology and materials science help the fight against SARS-CoV-2? *Nanomaterials*. 2020;10(4):802. doi:10.3390/nano10040802
15. Ma Z, Liu J, Liu Y, Zheng X, Tang K. Green synthesis of silver nanoparticles using soluble soybean polysaccharide and their application in antibacterial coatings. *Int J Biol Macromol*. 2021;166:567–577. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.214
16. Liu X, Shan K, Shao X, et al. Nanotoxic effects of silver nanoparticles on normal HEK-293 cells in comparison to cancerous HeLa cell line. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:753–761. doi:10.2147/IJN.S289008
17. Koyappayil A, Lee M-H. Ultrasensitive materials for electrochemical biosensor labels. *Sensors*. 2021;21(1):89. doi:10.3390/s21010089
18. Li Y, Leung P, Yao L, Song QW, Newton E. Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. *J Hosp Infect*. 2006;62(1):58–63. doi:10.1016/j.jhin.2005.04.015
19. Huang Z, Jiang H, Liu P, et al. Continuous synthesis of size-tunable silver nanoparticles by a green electrolysis method and multi-electrode design for high yield. *J Mater Chem A*. 2015;3(5):1925–1929. doi:10.1039/C4TA06782G
20. Khaydarov RA, Khaydarov RR, Gapurova O, Estrin Y, Schepel T. Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *J Nanoparticle Res*. 2009;11(5):1193–1200. doi:10.1007/s11051-008-9513-x
21. Valdez-Salas B, Beltrán-Partida E, Nedeu N, et al. Controlled anti-fungal behavior on Ti6Al4V nanostructured by chemical nanopatterning. *Mater Sci Eng C*. 2019;96:677–683. doi:10.1016/j.msec.2018.11.086
22. Ma W, Li Y, Gao S, et al. Self-healing and superwetable nanofibrous membranes with excellent stability toward multifunctional applications in water purification. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(20):23644–23654. doi:10.1021/acsami.0c05701
23. Ma W, Li Y, Zhang M, et al. Biomimetic durable multifunctional self-cleaning nanofibrous membrane with outstanding oil/water separation, photodegradation of organic contaminants, and antibacterial performances. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(31):34999–35010. doi:10.1021/acsami.0c09059
24. Beighton D, Ludford R, Clark DT, et al. Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. *J Clin Microbiol*. 1995;33(11):3025. doi:10.1128/JCM.33.11.3025-3027.1995
25. Valdez-Salas B, Beltrán-Partida E, Zlatev R, et al. Structure-activity relationship of diameter controlled Ag@Cu nanoparticles in broad-spectrum antibacterial mechanism. *Mater Sci Eng C*. 2021;119:111501. doi:10.1016/j.msec.2020.111501
26. Dey BP, Engley FB. Neutralization of antimicrobial chemicals by recovery media. *J Microbiol Methods*. 1994;19(1):51–58. doi:10.1016/0167-7012(94)90025-6
27. Secretaría de Economía, Diario Oficial de la Federación N-B-S. General methods for analysis of antimicrobial activity. Determination of germicidal activity. Norma Oficial Mexicana. 1999.
28. Eisfeld AJ, Neumann G, Kawakita Y. Influenza A virus isolation, culture and identification. *Nat Protoc*. 2014;9(11):2663–2681. doi:10.1038/nprot.2014.180
29. Beltrán-Partida E, Valdez-Salas B, Pérez-Cortéz G, Nedeu N. Synthesis, characterization, and in situ antifungal and cytotoxicity evaluation of ascorbic acid-capped copper nanoparticles. *J Nanomater*. 2019;2019:5287632. doi:10.1155/2019/5287632
30. Glover RD, Miller JM, Hutchison JE. Generation of metal nanoparticles from silver and copper objects: nanoparticle dynamics on surfaces and potential sources of nanoparticles in the environment. *ACS Nano*. 2011;5(11):8950–8957. doi:10.1021/nm2031319
31. Garcia PRAF, Prymak O, Grasmik V, et al. An in situ SAXS investigation of the formation of silver nanoparticles and bimetallic silver-gold nanoparticles in controlled wet-chemical reduction synthesis. *Nanoscale Adv*. 2020;2(1):225–238. doi:10.1039/C9NA00569B
32. Wang H, Qiao X, Chen J, Wang X, Ding S. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. *Mater Chem Phys*. 2005;94(2):449–453. doi:10.1016/j.matchemphys.2005.05.005
33. Badawy AME, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ Sci Technol*. 2010;44(4):1260–1266. doi:10.1021/es902240k
34. Barani H. Surface activation of cotton fiber by seeding silver nanoparticles and in situ synthesizing ZnO nanoparticles. *New J Chem*. 2014;38(9):4365–4370. doi:10.1039/C4NJ00547C
35. Osório I, Igreja R, Franco R, Cortez J. Incorporation of silver nanoparticles on textile materials by an aqueous procedure. *Mater Lett*. 2012;75:200–203. doi:10.1016/j.matlet.2012.02.024
36. Li X, Lenhart JJ, Walker HW. Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Langmuir*. 2010;26(22):16690–16698. doi:10.1021/la101768n
37. Hiragond CB, Kshirsagar AS, Dhapte VV, Khanna T, Joshi P, More PV. Enhanced anti-microbial response of commercial face mask using colloidal silver nanoparticles. *Vacuum*. 2018;156:475–482. doi:10.1016/j.vacuum.2018.08.007
38. Kowalczyk D, Kaminska I. Effect of pH and surfactants on the electrokinetic properties of nanoparticles dispersions and their application to the PET fibres modification. *J Mol Liq*. 2020;320:114426. doi:10.1016/j.molliq.2020.114426
39. Chamakura K, Perez-Ballesteros R, Luo Z, Bashir S, Liu J. Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;84(1):88–96. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.12.020

40. Cheikhrouhou W, Ferrara AM, Botelho Do Rego AM, Ferreira Machado I, Vieira Ferreira LF, Boufi S. Cotton fabrics decorated with nanostructured Ag/AgX (X:Cl,Br) as reusable solar light-mediated bactericides: a comparative study. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;196:111342. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111342
41. Li C, Wang X, Chen F, et al. The antifungal activity of graphene oxide-silver nanocomposites. *Biomaterials*. 2013;34(15):3882-3890. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.02.001
42. Zhao Z, Zhang Z, Lanzarini-Lopes M, et al. Germicidal ultraviolet light does not damage or impede performance of N95 masks upon multiple uses. *Environ Sci Technol Lett*. 2020;7(8):600-605. doi:10.1021/acs.estlett.0c00416
43. Fischer R, Morris D, van Doremalen N, et al. Effectiveness of N95 respirator decontamination and reuse against SARS-CoV-2 virus. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(9):2253. doi:10.3201/eid2609.201524
44. Liao L, Xiao W, Zhao M, et al. Can N95 respirators be reused after disinfection? How many times? *ACS Nano*. 2020;14(5):6348-6356. doi:10.1021/acsnano.0c03597
45. Cui J, Lu T, Li F, et al. Flexible and transparent composite nanofibre membrane that was fabricated via a "green" electrospinning method for efficient particulate matter 2.5 capture. *J Colloid Interface Sci*. 2021;582:506-514. doi:10.1016/j.jcis.2020.08.075
46. van Doremalen N, Bushmaker I, Morris DH, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*. 2020;382(16):1564-1567. doi:10.1056/NEJMc2004973
47. Chan KH, Sridhar S, Zhang RR, et al. Factors affecting stability and infectivity of SARS-CoV-2. *J Hosp Infect*. 2020;106(2):226-231. doi:10.1016/j.jhin.2020.07.009
48. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect*. 2020;104(3):246-251. doi:10.1016/j.jhin.2020.01.022
49. Furno F, Morley KS, Wong B, et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(6):1019-1024. doi:10.1093/jac/dkh478
50. Palmieri V, Papi M. Can graphene take part in the fight against COVID-19? *Nano Today*. 2020;33:100883. doi:10.1016/j.nantod.2020.100883
51. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009;3(2):279-290. doi:10.1021/nm800596w
52. Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(36):9810-9817. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.085
53. Sweet MJ, Singleton I. Soil contamination with silver nanoparticles reduces bishop pine growth and ectomycorrhizal diversity on pine roots. *J Nanoparticle Res*. 2015;17(11):448. doi:10.1007/s11051-015-3246-4
54. Yan A, Chen Z. Impacts of silver nanoparticles on plants: a focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1003. doi:10.3390/ijms20051003
55. Otter JA, Donskey C, Yezli S, Douthwaite S, Goldenberg SD, Weber DJ. Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination. *J Hosp Infect*. 2016;92(3):235-250. doi:10.1016/j.jhin.2015.08.027
56. Figueroa A, Hauck R, Saldias-Rodriguez J, Gallardo RA. Combination of quaternary ammonia and glutaraldehyde as a disinfectant against enveloped and non-enveloped viruses. *J Appl Poult Res*. 2017;26(4):491-497. doi:10.3382/japr/pfx021

International Journal of Nanomedicine

Dovepress

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science & Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec

Structure-activity relationship of diameter controlled Ag@Cu nanoparticles in broad-spectrum antibacterial mechanism



Benjamín Valdez-Salas^{a,b,*}, Ernesto Beltrán-Partida^{a,b}, Roumen Zlatev^c, Margarita Stoytcheva^c, Daniel Gonzalez-Mendoza^d, Jorge Salvador-Carlos^b, Aldo Moreno-Ulloa^e, Nelson Cheng^f

^a Laboratorio de Biología Molecular y Cáncer, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico

^b Laboratorio de Corrosión y Materiales Avanzados, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico

^c Laboratorio de Biosensores y Electroquímica Aplicada, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico

^d Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico

^e Departamento de Innovación Biomédica, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, Mexico

^f Magna International Pte Ltd, Singapore

ARTICLE INFO

Keywords:

Core-shell
Bimetallic
Antibacterial
Nanoparticles
Broad-spectrum
Cytotoxicity
Cytoviva

ABSTRACT

Current outbreaks associated with drug-resistant clinical strains are demanding for the development of broad-spectrum antibacterial agents. The bactericidal materials should be eco-friendly, economical and effective to suppress bacterial growth. Thus, in this work, diameter controlled spherical Cu_{core}-Ag_{shell} nanoparticles (Ag@CuNPs) with diameter ranging from 70 to 100 nm by one-step co-reduction approach were designed and synthesized. The Ag@CuNPs were homogenous, stable, and positively charged. The 70 nm Ag@CuNPs showed a consistent and regular Ag shielding. We observed the 100 nm Ag@CuNPs achieved symmetrical doped Ag clusters on the Cu core surface. We used Gram-positive and Gram-negative models strains to test the wide-spectrum antibacterial activity. The Ag@CuNPs showed detrimental microbial viability in a dose-dependent manner; however, 70 nm Ag@CuNPs were superior to those of 100 nm Ag@CuNPs. Initially, Ag@CuNPs attached and translocated the membrane surface resulting in bacterial eradication. Our analyses exhibited that antibacterial mechanism was not governed by the bacterial genre, nonetheless, by cell type, morphology, growing ability and the NPs uptake capability. The Ag@CuNPs were highly tolerated by human fibroblasts, mainly by the use of starch as glucosidic copper and stabilizer, suggesting optimal biocompatibility and activity. The Ag@CuNPs open up a novel platform to study the potential action of bimetallic nanoparticles and their molecular role for biomedical, clinical, hospital and industrial-chemical applications.

1. Introduction

In recent years, there has been an increasing emergency by drug-resistant strains, severe deadly bacterial infections, and ancient diseases that are coming back due to the inefficiency of currently prescribed antibiotics [1,2]. Moreover, the intensive care units are the most susceptible to facing patients with poor or inadequate antibacterial therapeutic responses [3]. Thus, it is necessary the development of new antimicrobial therapies, with the broad-spectrum capability.

An strategy to approach the role of growing danger-resistant infections is the development and management of antibacterial metallic nanoparticles (NPs). Silver (Ag) and copper (Cu) are metals with important bactericidal properties [4,5]. On the other hand, when bulk Ag and Cu are nanostructured, the surface area to volume ratio is

increased, enhancing their physicochemical and biological characteristics. Additionally, AgNPs and CuNPs have been applied for food-packaging [6], catalysis [7], textile industry [8], sensors [9], optoelectronics [10], and more importantly, as antimicrobial agents [11]. Different techniques have been reported for the synthesis of AgNPs and CuNPs. Some examples are microwave, electrolysis, and chemical reduction [12]. Of particular interest, chemical reduction allows versatile control of the size, morphology, crystallinity, and surface chemical composition of NPs [12,13]. Furthermore, it is important to highlight that chemical reduction is a cost-effective, facile, scalable approach and it supports the use of green reagents without the need for any expensive equipment [14–16]. However, AgNPs and mostly CuNPs are extremely susceptible to the formation of oxide species (due to low stability, and high ambient oxygen reactivity), which inversely disrupts the beneficial

* Corresponding author at: Laboratorio de Biología Molecular y Cáncer, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, Mexico.

E-mail address: benval@uabc.edu.mx (B. Valdez-Salas).

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111501>

Received 8 July 2020; Received in revised form 2 September 2020; Accepted 7 September 2020

Available online 12 September 2020

0928-4931/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

bactericidal effects [17,18]. Therefore, it is prominent to design synthetic strategies that can protect AgNPs and CuNPs from oxidation, taking together the advantages that bring both elements into one functional nanomaterial.

An outstanding effort to develop nanostructured materials that combines the qualities of two or more elements is the design and synthesis of bimetallic NPs [19]. Interestingly, bimetallic NPs can be synthesized with different atomic and structural configurations in order to obtain an outstanding synergic effect of the incorporating elements with controlled reactivity [20]. Among the different structural organizations, the core-shell array has shown exceptional characteristics for controlled positioning of the coating (shell) and coated (core) elements [19,20]. Far more attractive is that the core-shell elemental orientation can be achieved by chemical reduction [20,21]. In terms of elemental orientation, galvanic displacement is a method that can be afforded for an accurate atomic positioning [20,22]. Most importantly, the galvanic displacement reaction between two elements with significant reduction potential differences (e.g., Ag^+/Ag^0 and $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^0$) can orchestrate accurate atomic arrangement [18]. In essence, galvanic displacement has shown to be a dynamic and effective mechanism to nucleate or deposit a second metal that displays a higher redox potential for constructing bimetallic structures [23,24]. In a recent study, Lee et al. improved the oxidation stability of CuNPs by performing seed-mediated Cu@Ag arrayed NPs via galvanic replacement increasing conductivity [25]. It was reported in a previous study that the Cu-AgNPs produced by thermal reduction could improve the conversion of methylchlorosilanes into chloromethane as a superior catalyst in the Rochow reaction compared to those of CuNPs [26]. It was suggested that the electronic attraction provided by the presence of Ag resulted in lower $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+}$ and increased Cu^0 species, which indicates its protection to oxidation and enabled catalytic active sites [26]. From an antimicrobial perspective, it was recently reported that Ag/CuNPs fabricated by chemical reduction assisted using microwave heating promoted bactericidal properties against *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) [11]. The authors claimed that the Ag/CuNPs showed a positive surface charge, which was mainly responsible for the improved antibacterial action [11]. Moreover, Dos Santos et al. suggested that citrate-mediated Au-AgNPs improves the classic antibiotic treatments against *E. coli* and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) by generating a possible synergic effect [27]. However, those works did not evaluate the specific mechanism of action, the effects at morphological levels, the localization of the NPs, and the path for NPs diffusion and membrane destruction. Therefore, more analytical evaluations are required for elucidating the antimicrobial action, as well as the application of alloy configured bimetallic NPs, principally to those of Ag@CuNPs [28]. Considering the information stated before, here we tested for the first time the hypothesis that Ag@CuNPs can be synthesized using chemical reduction with galvanic replacement (chemical co-reduction). Moreover, the Ag@CuNPs will breakdown the bacterial growing capability by cell-membrane dislocation, leading by this way to bacterial leakage and cell death.

The objective of the present study was to synthesize spherical Ag@CuNPs of 100 nm and 70 nm by designing a simple, cost-effective, modified chemical reduction with controlled galvanic replacement (chemical co-reduction process). Furthermore, part of the bactericidal mechanism of the Ag@CuNPs is elucidated by the evaluation of delayed bacterial growth. To analyze and localize in situ the structural effects caused by Ag@CuNPs in the bacterial cells without chemical modifications (i.e. fixing procedures) we used dark-field hyperspectral microscopy (Cytoviva). Our work suggests for the first time that the bactericidal activity of Ag@CuNPs is due to a selective membrane attachment by the NPs, which disrupts the surface-membrane integrity, that leads to cellular leakage, which ends in dead bacteria. Our results highlighted that the NPs diameter and chemical core@shell configuration (Ag@CuNPs) modulate the bactericidal fate.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of Ag@CuNPs

For the synthesis of ≈ 100 nm Ag@CuNPs, we design and carry out a chemical reduction and a galvanic replacement (co-reduction) approach. Initially, AgNO_3 (10 mM, Sigma-Aldrich, USA) and CuCO_3 (10 mM, Sigma-Aldrich, USA) were dissolved separately in 25 mL of deionized water (DI) and mixed into a round-bottomed flask with a magnetic stirrer bar under dark conditions. Then, 20 mL of starch (750 mg, Sigma-Aldrich, USA) aqueous solution were added as a capping agent. The solution was heated to reflux. In order to start the reduction and galvanic displacement reaction, 10 mL of ascorbic acid (A.A., 0.45 M, Sigma-Aldrich, USA) solution was added dropwise (to produce dispersed NPs). The solution changes into a cream-pink color (indicating the formation of a Ag/Cu complex), and after 1 h, an intense pink color was detected (this is due to the creation of NPs). The reaction solution was then cooled to room temperature (RT), ultrasonicated for 30 min, and left for 24 h to complete the reaction. The solution turns from pink to a dark violet shade with metallic finish (indicating the formation of complex-coordinated NPs). The Ag@CuNPs were centrifuged at 10,000 RPM, followed by three consecutive washes with double distilled water and absolute ethanol for dehydration. These NPs are named here as Ag@CuNPsRX1.

In order to synthesize Ag@CuNPs ≈ 70 nm, the synthetic procedure was modified by discarding the use of starch and replacing with 20 mL of DI. The reaction solution after the co-reduction resulted in a black color, suggesting the formation of Ag@CuNPs of 70 nm. Those NPs will be indicated here as Ag@CuNPsRX2.

2.2. Physicochemical characterization of Ag@CuNPs

The morphology, homogeneity, and size of the synthesized Ag@CuNPs (RX1 and RX2) were evaluated using Field-Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM; LYRA 3, Tescan, Brno, Czech Republic), at 10 kV accelerating voltage with a secondary electron detector. The Ag@CuNPs were suspended in absolute ethanol, sampled on a double-sided adhesive carbon conductive tape, dried at RT, and analyzed employing FE-SEM. The chemical analysis was performed by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX, Tescan) coupled to the FE-SEM, at 10 kV with a large spot size to adjust a suitable count rate per second for spectrum collection. The ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy analysis was acquired using a UV/Vis spectrophotometer (UV-2600, Shimadzu, Japan). The Ag@CuNPs were suspended into DI, and scanned in the wavelength region of 300 to 600 nm with a resolution of 1 nm at RT. In order to evaluate the size distribution (hydrodynamic diameter), and zeta potential (Z-Potential) of the Ag@CuNPs (RX1 and RX2), we applied dynamic light scattering (DLS). An aqueous NPs suspension of 0.5 mg/L of NPs at pH 7 was sonicated in an ultrasonic bath (Branson, Branson, MO, USA) at RT, 120 W for 30 min. Then, the suspension was filtered (Whatman, No. 4) and analyzed using a Nanotrak Wave II (Microtrac, North Wales, PA, USA) system with a delaying time of 30 s and a run time of 30 s at RT [29].

2.3. Bacterial culture

The pathogenic bacterial models for antibacterial activity were *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*; ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 25923), *Serratia marcescens* (*S. marcescens*; ATCC 8100), *Salmonella enterica* (*S. enterica*; ATCC 14028) and *E. coli* (ATCC 25922). For the preparation of each working culture, discrete colonies of freshly grown bacteria were inoculated separately into newly prepared Tryptic soy broth (TSB; Becton Dickinson, USA), and incubated overnight under standard aerobic conditions. Afterwards, each inoculum was diluted in TSB to approximately 1×10^8 colony-forming units (CFU)/mL, which was used as bacteria concentration for antibacterial studies.

2.4. Z-potential evaluation of the bacterial models

To analyze the electrostatic surface charge of the bacterial models, we used the DLS technique to generate the Z-potential values. We prepared pure cultures for every bacterial suspension, as previously indicated. Next, the bacterial cultures were individually washed three times with DI (pH 7) and suspended to a bacteria density of about 1×10^6 CFU/mL, previous to each measurement. We utilized DI for bacterial samples preparations, in order to avoid the conductivity provided by salts present in buffers or culture mediums [30]. Finally, each bacterial suspension was immediately analyzed using a Nanotracs Wave II (Microtrac, North Wales, PA, USA) system with a delaying of 30 s and a run time of 30 s at RT.

2.5. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC of each bacterial model for the Ag@CuNPs (RX1 and RX2) was determined using the microdilution method [29]. Initially, 100 μ L of fresh TSB was deposited into individual wells of a 96-well flat-bottom culture polystyrene plate (Corning, USA). Then, 20 μ L of the previously prepared bacteria inoculums were deposited into each well (containing the experimental NPs) of the 96-well plate (separate plates for each bacteria) and incubated under static and standard conditions for 24 h. Afterwards, each plate of the corresponding bacterial culture was placed in a microplate reader (Thermoskan, Thermo Fisher Scientific, USA), and the optical density (O.D.) was measured at 600 nm. The concentrations of Ag@CuNPs (RX1 and 2) were established from 15.6 to 500 μ g/mL. Separate cultures of medium free of each Ag@CuNPs and TSB containing the designed concentrations of Ag@CuNPs without bacterial inoculums were incubated under similar conditions and used as control and baseline control, respectively.

2.6. Time-dependent survival rate analysis

For the evaluation of the bacterial growth behaviors at different periods [31], we cultured the bacterial models in contact with Ag@CuNPs (RX1 and RX2). Initially, individual stocks of Ag@CuNPsRX1 and Ag@CuNPsRX2 at 1 mg/mL were prepared into sterile TSB and diluted to 125 μ g/mL (sublevel of MIC). Then, 100 μ L were transferred into separate wells of a 96-well culture plate for each bacterial treatment using a multichannel pipette. Afterward, 20 μ L of fresh bacterial suspensions (1×10^6 CFU/mL) were inoculated into separate 96-well cell culture plates, corresponding to each bacterial treatment. The plates were incubated at 37 ± 0.1 °C for a period of 24 h. During the incubation, the corresponding O.D. measurements were taken at 600 nm every 60 min at 37 ± 0.1 °C, using a microplate reader equipped with a controlled incubator and orbital shaker system (Thermoskan, Thermo Fisher Scientific, USA). A reference bacterial growth was analyzed, without the presence of Ag@CuNPs. The background signals were determined using Ag@CuNPs without bacteria at each checkpoint and normalized subtracting the background [31,32].

2.7. In situ antibacterial mechanism by Cytoviva

For the in situ evaluation of the cellular uptake, localization, and binding capability between the experimental Ag@CuNPs (RX1 and RX2) and the bacterial models, we used high-resolution dark-field hyperspectral microscopy (Cytoviva). After treating each microbial culture to 125 μ g/mL of Ag@CuNPsRX1 and Ag@CuNPsRX2 (in separate), the cells were washed twice with warm $1 \times$ phosphate-buffered saline (PBS). Each cellular suspension was then deposited (7 μ L) on a clean glass slide (VWR, USA), covered with a 0.145 mm thick glass coverslip (VWR, USA) and adhered using nail polish [29]. The prepared slides were mounted and analyzed under an Olympus BX-41 microscope using the Cytoviva system (Cytoviva, Auburn, AL) equipped with a high numerical $100 \times /1.30$ oil Iris (Iris 1.3–0.6) immersion objective, and an

illumination system that improves up to 10 times the signal-to-noise ratio. The present configuration permits the visualization of NPs (down to ≈ 10 nm) for high-resolution imaging. The Cytoviva is equipped with a hyperspectral system that allows the acquisition of UV/Vis spectrum (400–1000 nm) within each pixel of the scanned field of view, which allows the verification and localization of the Ag@CuNPs into the cells.

2.8. Cytotoxicity (viability) assessment of the Ag@CuNPs

The cytotoxicity of the synthesized Ag@CuNPs (RX1 and RX2) was evaluated by using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) viability assay. We used primary cultures of human gingival fibroblasts (HGFs) as a cornerstone model of cellular cytotoxicity [29,33]. The HGFs were isolated from the gingival tissue of a young male patient (15 years old), without evidence of periodontal disease [34,35]. Initially, 1×10^4 HGF/well in passage four were harvested and cultured in complete medium constituted of Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific, USA) and 100 units/mL of penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, USA) in a 96-well culture flat-bottom polystyrene plate (Corning, USA) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator for 24 h, to form a monolayer. Afterward, the monolayers were carefully washed twice for 5 min with warm PBS and incubated for 24 h with serial dilutions (500 μ g/mL–15.62 μ g/mL) of the experimental NPs dissolved in a complete culture medium. Furthermore, the Ag@CuNPs treatments were removed, and the cells were carefully washed twice with warm PBS, in order to eliminate any artifact present in the cultures. For the cytotoxicity tests, 100 μ L of MTT (Sigma Aldrich, USA) in complete medium (5 mg/mL) was added to each well of the cultured 96-well plate and incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator for 3 h. The resulting formazan crystals (generated by mitochondrial activity) were dissolved by removing the remaining medium containing MTT, and transferring the 96-well plate into an orbital shaker at 200 rpm and 37 °C with 200 μ L of dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich) into each well for 20 min. The O.D. of the dissolved crystals was then recorded at 590 nm using a microplate reader (Thermoskan, Thermo Fisher Scientific, USA). The baseline controls were measured in a series of culture wells containing Ag@CuNPsRX1 and Ag@CuNPsRX2 in separate, which were carried out for MTT without HGF as described above. Also, cells without any testing material were selected as a negative control of cytotoxicity. Moreover, the dose concentration-dependent data at which 50% of cell growth viability is inhibited (IC₅₀) was calculated by applying a nonlinear regression curve fit using GraphPad Prism 7.03.

2.9. HGFs morphology by phase-contrast microscopy

For the analysis of the structural alterations generated by the Ag@CuNPs treatments, the HGFs were harvested and cultured in individual wells of a 6-well polystyrene culture plate (Corning, USA) at a density of 25×10^4 cells/well into complete culture medium for 24 h. Next, the HGFs were washed twice with warm PBS for 5 min and exposed in separate with Ag@CuNPsRX1 and Ag@CuNPsRX2 (125 μ g/mL, in complete medium) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator for 24 h. The materials were then carefully removed, and the HGFs were washed three times with PBS for 5 min. Finally, the 6-well culture plate was analyzed and photographed using a phase-contrast microscope (ZOE, Bio-Rad, USA).

2.10. Statistical analysis

The experimental results were analyzed by two-tailed unpaired Student's t-test. A $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments performed each in triplicate. GraphPad Prism

7 software (GraphPad Inc., USA) was used as the statistical package.

3. Results

In Fig. S1 is represented a schematic flowchart showing the whole experimental processes followed in our work. The application of our controlled synthetic strategy results in the formation of homogenous NPs (Fig. 1). It was clearly observed that spherical-shaped Ag@CuNPs were obtained after the co-reduction synthesis (Fig. 1A-B). The corresponding FE-SEM micrographs at high-zoom (red and green squares), illustrated the presence of well-dispersed NPs with diameter sizes of 90 ± 16 nm and 70 ± 6 nm for Ag@CuNPsRX1 and Ag@CuNPsRX2 (Fig. 1C), respectively. Moreover, the UV/Vis spectrum strikingly showed an intense surface plasmon resonance (SPR) peak at 320 nm for the Ag@CuNPsRX1 material (Fig. 1D). Also, it was identified that the stronger peak zone for the Ag@CuNPsRX2 was shifted to ≈ 400 nm, suggesting the deposition of a new element. On the other hand, the hydrodynamic diameter generated by means of DLS was 100 ± 5 nm for Ag@CuNPsRX1 and 98 ± 5 nm for RX2 (Fig. 1E). Interestingly, the surface charge of the Ag@CuNPsRX1 and Ag@CuNPsRX2 were 21 ± 1.8 mV and 26.73 ± 1.1 mV (Fig. 1F), respectively, showing significant differences probably by the stability generated by capping with ascorbic acid; although, positively charged [36]. Moreover, the DLS scanning showed regular size distribution as well as dispersed homogeneity among the Ag@CuNPs (Fig. 1G), without differences in the distribution behavior between the Ag@CuNPs materials.

From the chemical point of view, we detected that the elemental orientation of the Ag@CuNPsRX1 and Ag@CuNPsRX2 by SEM-EDX scanning profiles supports the formation of Ag@CuNPs (Fig. 2). By doing so, we were capable of identifying that in spherical Ag@CuNPsRX1, the Ag atoms are distributed in small clusters, which are shielded into short symmetrical islands on the Cu core atoms (Fig. 2A). Meanwhile, in Ag@CuNPsRX2 the Ag atoms were accommodated over the Cu atoms forming configured spheres that were mapped as a Cu core covered by a distributed homogenous shielding film of Ag atoms (Fig. 2B). Moreover, the quantitative EDX analysis of Ag@CuNPsRX1 indicated mainly 56% of Ag and 20% for Cu (Fig. 2C). Also, in the Ag@CuNPsRX2 it was quantified 64% for Ag and 15% for Cu (Fig. 2D). This information in part suggests that variation of the capping components (i.e. starch) contributed to different atomic distribution, resulting in varied elemental Ag:Cu ratio, and NPs size.

In order to test the surface charge of the bacterial models used in this work, we performed Zeta-Potential by DLS analysis (Table 1). The bacterial Zeta-Potential measurements were performed in DI water to discard the electrostatic effects provided by the presence of salts [30]. Our results suggested that *P. aeruginosa*, *S. marcescens* and *E. coli* posed negative charges; meanwhile, *S. aureus* and *S. enterica* illustrated a positive charge. Information that indicates different electrostatic behaviors between the bacterial models, instead of only the bacteria genre. On the other hand, the antibacterial assessment of the synthesized Ag@CuNPs showed impressive outcomes of bactericidal activity after 24 h of incubation (Fig. 3). Initially, it was appreciated a dose-

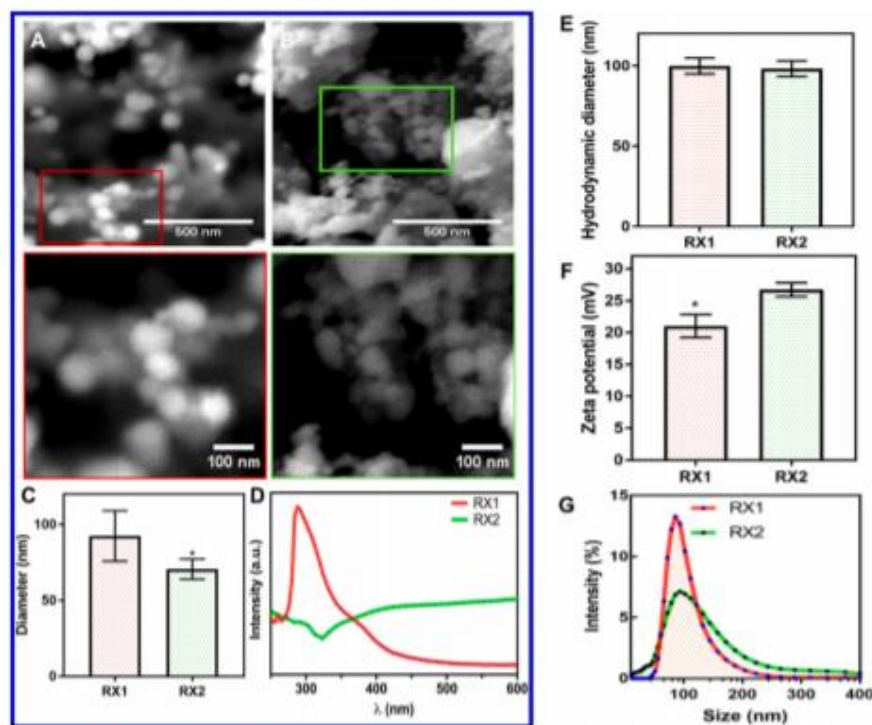


Fig. 1. Characterization of the synthesized Ag@CuNPs. A) FE-SEM micrographs showing the morphology of Ag@CuNPsRX1, the red squared image represents a high magnification. B) FE-SEM micrographs illustrating the morphology of Ag@CuNPsRX2, the green squared image represents a high magnification. C) Diameter of the experimental Ag@CuNPs calculated from the FE-SEM micrographs. D) UV-Vis analysis of the Ag@CuNPs. E) Hydrodynamic size evaluation of the Ag@CuNPs by DLS. F) Zeta-potential measurements of the Ag@CuNPs. G) Size distribution of the Ag@CuNPs. * shows statistical differences between Ag@CuNPsRX1 and Ag@CuNPsRX2. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

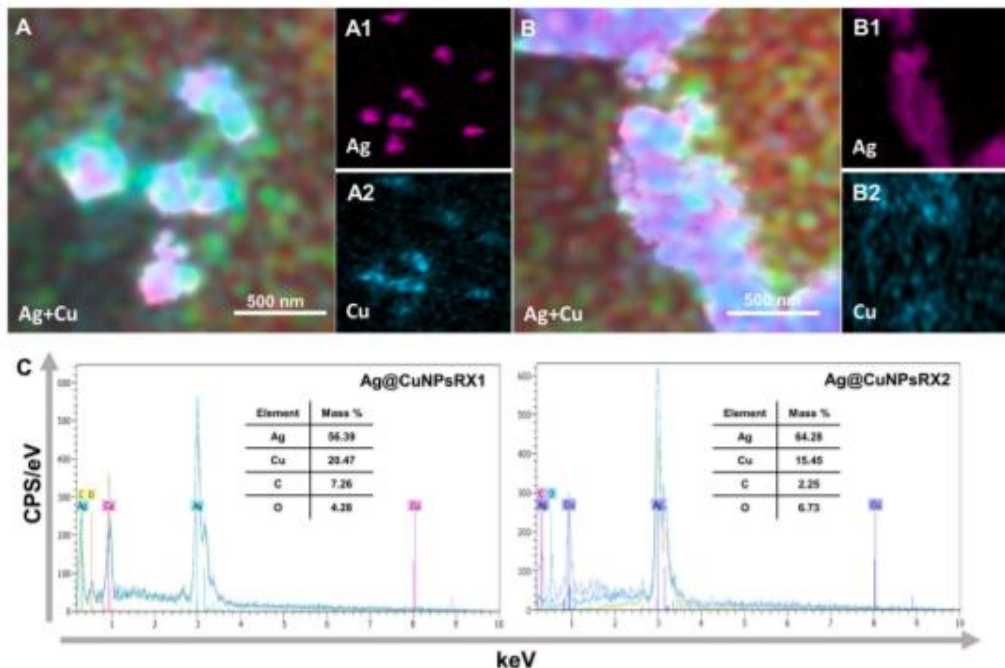


Fig. 2. EDX analysis and elemental mapping of the Ag@CuNPs. A) EDX-Mapping of Ag@CuNPsRX1 showing the merge of Ag (A1) and Cu (A2) elemental maps. B) EDX-Map of Ag@CuNPsRX2 taking together Ag (B1) and Cu (B2) elemental maps. C) EDX spectrums of the corresponding Ag@CuNPs (insets indicate the elemental compositions).

Table 1

Zeta-potential (mV) measurements of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains in DI water.

| Bacteria | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. marcescens</i> | <i>S. enterica</i> | <i>E. coli</i> |
|----------------|----------------------|------------------|----------------------|--------------------|----------------|
| Zeta potential | 18.36 ± 0.31 | -19.6 ± 2.59 | 24.96 ± 6.68 | -17.9 ± 0.1 | 27.9 ± 2.36 |

dependent manner behavior for all the bacterial models in contact with both Ag@CuNPs. In most of the antibacterial tests, we characterized an increased sensibility to the *P. aeruginosa* followed by *S. enterica*, and a similar dose-lethal concentration required for *S. aureus*, *S. marcescens*, and *E. coli*. Moreover, we observed an increased antibacterial action for the Ag@CuNPsRX2 than Ag@CuNPsRX1. However, at low Ag@CuNPs dosages we detected similar antibacterial behavior for both materials. Furthermore, the MIC experiments supported the fact of improved antibacterial activity for Ag@CuNPsRX2 (Table 2).

To analyze the dynamic effect of the NPs into the bacterial growing capability and the susceptibility over time, we periodically followed the microbial growth (see Fig. 4). During the exposure times, we observed diverse growing competences for the bacterial models. It was detected a striking inhibition for *P. aeruginosa*, as it presented almost 100% reduction without the formation of the typical rapid exponential growth phase compared to the positive control (Fig. 4A). Moreover, we observed that the antibacterial efficiency was strongly sustained from the first culture hours (Fig. 4A, in set); simultaneously, in the control we tracked the rapid formation of the exponential curve. For *S. aureus*, it was distinguished an extended lag phase of 10 h by Ag@CuNPsRX2 dose (Fig. 4C). Meanwhile, *S. aureus* with Ag@CuNPsRX1, witnessed an increased exponential phase compared to those of the control, aside from, a remarkable reduction of the maximal viability (~60%) at 24 h. Although, we appreciated a significantly extended lag phase of 11 h for

the Ag@CuNPsRX2 treatment, and a displaced lag phase of 5 h for Ag@CuNPsRX1; concluding with a viability reduction of 75% and 40%, respectively. It is essential to highlight that in the experimental materials, *S. enterica* was not able to reach its outstanding viability (by an oppressed log phase) as observed in the positive control, suggesting a decelerated growth of up to 80% induced by the NPs (Fig. 4E). In *E. coli* (Fig. 4B) and *S. marcescens* (Fig. 4D) we detected a similar grow behavior between the Ag@CuNPs cultures. However, *E. coli* showed a lag phase of 5 h larger during the NPs doses than the control, and a discrete exponential phase (Fig. 4B). Meanwhile, in *S. marcescens* we encountered a significant reduction of 50% between the materials treatments; that comes with inducing an early stationary phase of roughly 7 h (Fig. 4D). Information that indicated a prominent disturbing bacterial growth by the Ag@CuNPs doses, mainly by the treatment with Ag@CuNPsRX2.

The capability to directly evaluate the NPs trafficking into bacterial cells without applying any fixing technique, and fluorescence labeling, allows accurate characterization of part of the NPs antibacterial mechanism. Therefore, we employed Cytoviva microscopy in order to characterize in situ the bacterial-NPs contact interactions, and the Ag@CuNPs uptake and retention (Fig. 5). The application of the Ag@CuNPs with the bacterial cells resulted in important alterations of cellular morphology, and internalization of the NPs. In *P. aeruginosa*, we detected that Ag@CuNPsRX1 are mainly attached to the surface

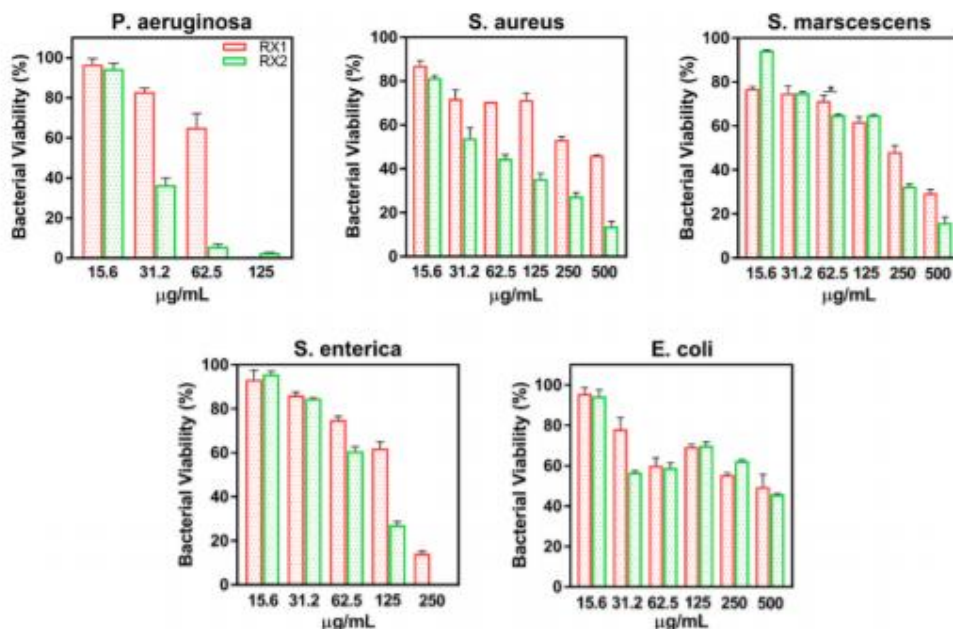


Fig. 3. Dose-response graphs representing the broad-spectrum antibacterial efficacy of the fabricated Ag@CuNPs against the bacterial models after 24 h of incubation. * shows statistical differences between Ag@CuNPsRX1 and Ag@CuNPsRX2.

Table 2
MIC analysis of the experimental Ag@CuNPs.

| Material | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | | | |
|-------------|--------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| | <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) | <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) | <i>S. marcescens</i> (ATCC 8100) | <i>S. enterica</i> (ATCC 14028) | <i>E. coli</i> (ATCC 25922) |
| Ag@CuNPsRX1 | > 125 | > 500 | > 500 | > 250 | > 500 |
| Ag@CuNPsRX2 | 125 | > 500 | > 500 | 250 | > 500 |

membrane (Fig. 5A). Similarly, this effect was encountered in *S. aureus* (Fig. 5C), *S. enterica* (Fig. 5D), and *E. coli* (Fig. 5E), as highlighted by the red dotted squads. Moreover, in *S. marcescens* we were able to detect that Ag@CuNPsRX1 treatment concludes with cell-membrane dislocation and cellular leakage, as depicted by the hyperspectral scattering (Fig. 5B). A similar effect was observed in *S. aureus*, as the cell-damage resulted in a wrinkled morphology generating the destruction of the cell membrane followed by bacterial leakage. Moreover, a striking transformation from a rod to a spherical-shaped morphology of *S. enterica* was clearly detected. Furthermore, the Ag@CuNPsRX2 can internalize and accumulate into *P. aeruginosa* (Fig. 5A), *S. aureus* (Fig. 5C), and *S. enterica* (Fig. 5D) as exposed in the green crosses. Consequently, the Ag@CuNPsRX2 appears to be far more susceptible to diffuse in to the membrane as numerous NPs were intracellularly confined, whereas, in the Ag@CuNPsRX1, we did not detect this phenomenon. The application of Ag@CuNPs induced detrimental changes, as an impressive aberrant transformation from bacillus to a circle-like morphology was promptly recognized. The given advantages of hyperspectral analysis allowed us to generate pixel-by-pixel spectra of the obtained micrographs. Hence, we analyzed and differentiated with accuracy and certainty the localization of the NPs into the cells.

In Fig. 6, is represented the cytotoxicity and morphology evaluation of HGFs targeted with the corresponding Ag@CuNPs. It is important to mention that we did not detect any outcomes of cellular aberrations by Ag@CuNPsRX1 after 24 h of culture (Fig. 6A). Moreover, we observed a preserved cellular morphology at the end of the experiment, as we encountered extended, aligned, and interconnecting filopodia with a fibrillary cell architecture. Furthermore, the Ag@CuNPsRX2 showed slight cellular alterations after 24 h of incubation (at 125 $\mu\text{g/mL}$). It is noteworthy, to characterize the cytotoxicity of nanomaterials treatments; therefore, checkpoints of metabolic cell activity were assessed by MTT (Fig. 6B). The MTT results advocated IC_{50} values for the experimental compounds of Ag@CuNPsRX1 (235 $\mu\text{g/mL}$) and Ag@CuNPsRX2 (51.72 $\mu\text{g/mL}$). It is imperative to highlight that at lower NPs doses, we appreciated significant differences in metabolic activity between each material; thus, outlining a concomitant viability reduction as increasing the NPs treatment (Fig. 6B). However, according to the MTT analysis, we can establish that the NPs follow a dose-dependent manner response.

4. Discussion

The increased bacterial resistance that is day-to-day reported worldwide has, thus far, requested for novel and versatile broad-spectrum antimicrobial agents [3]. Therefore, the application of metallic-based NPs has brought a promising approach for the development of highly competent and long-lasting bactericidal materials [11]. Currently, there have been titanic efforts to take approach of the antibacterial benefits provided by AgNPs and CuNPs [11,37–39]. However, there are few reports that aboard the synergic qualities of bimetallic Ag@CuNPs synthesized with a controlled core-shell elemental positioning. Therefore, we take the beneficial and versatile advantages of chemical reduction with in situ galvanic replacement (co-reduction process) for developing antibacterial and eco-friendly spherical

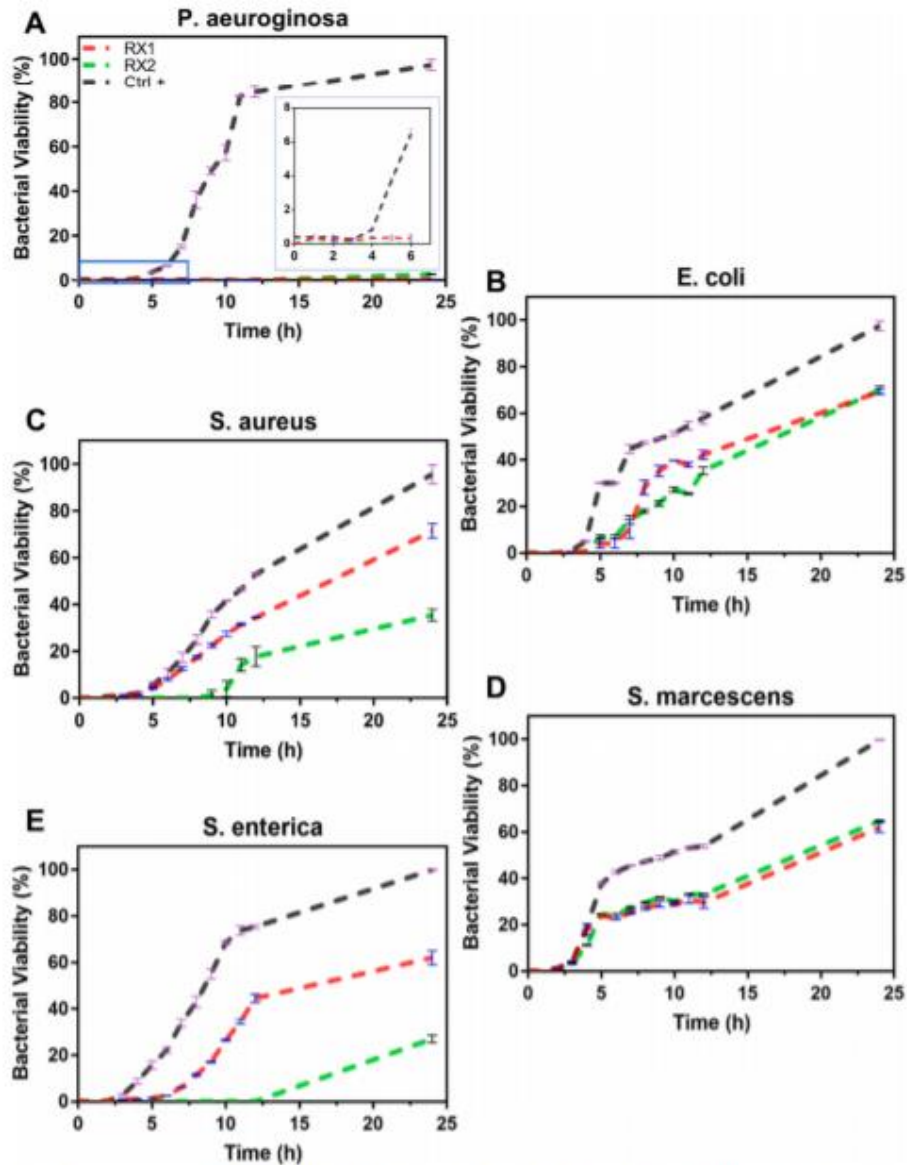


Fig. 4. Bacterial growth-curves showing the antibacterial behavior of the experimental Ag@CuNPs into sublethal doses (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) after 24 h of incubation. A) *P. aeruginosa*, the inset displays the initial bacterial behavior. B) *E. coli*, C) *S. aureus*, D) *S. marcescens* and E) *S. enterica*. Red line represents Ag@CuNPsRX1 (RX1), green line indicates Ag@CuNPsRX2 (RX2), and black line shows the positive control (Ctrl +). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

configured Ag@CuNPs. Moreover, galvanic replacement is a spontaneous reaction among an atomic metal that has a higher electrochemical potential difference with another metal, and it can be performed in aqueous solutions [24,40]. Thus, it can further support constructing a metallic platform for depositing a second metal on the outer surface, collectively tailoring the atomic diffusion between the created nanostructures, just controlling the potential differences of

metals, temperature, and the salt precursors [24]. Furthermore, we can regulate the size and morphology of the bimetallic nanostructure by this reaction. We reported the optimal parameters in order to carry out the Ag@CuNPs, as several experiments were performed at different precursor concentrations and reaction periods. We conducted two approaches in order to design the synthesis of Ag@CuNPs. Initially, the application of starch and A.A. as a template and reducer substances,

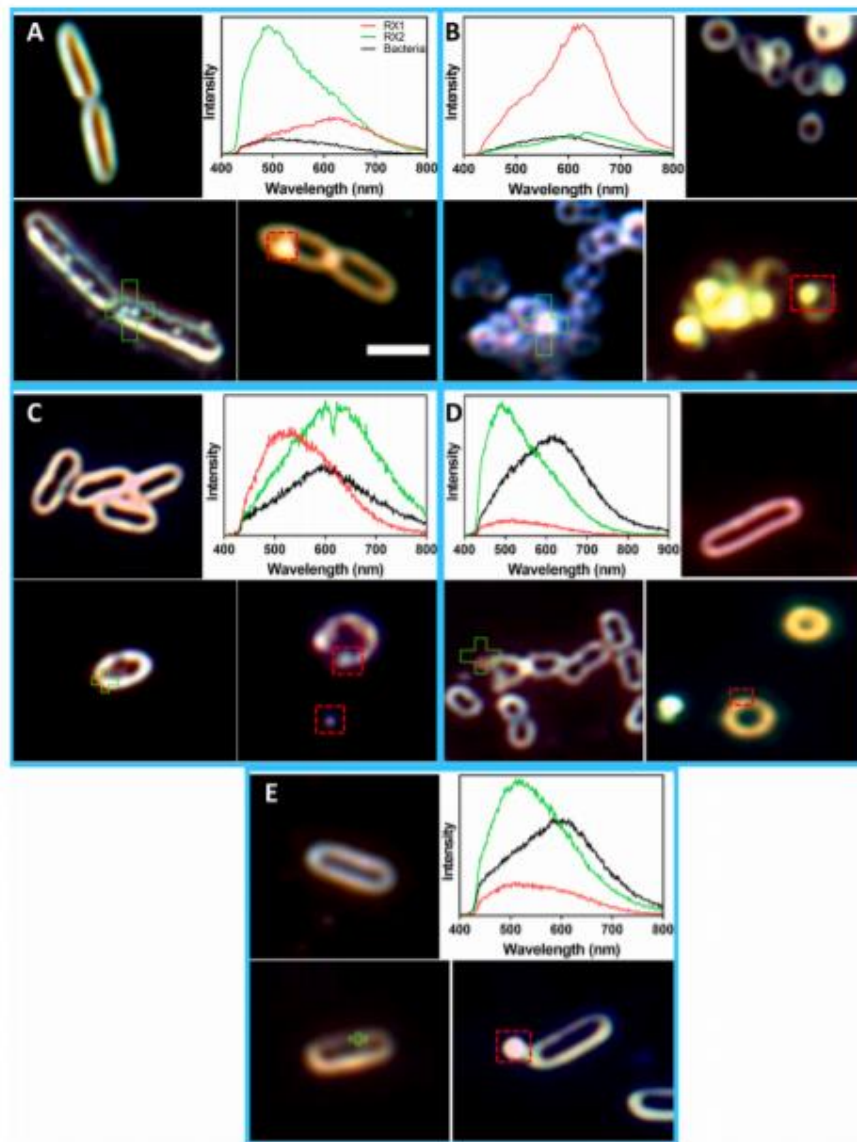


Fig. 5. Structural characterization by Enhanced Dark-Field Microscopy with hyperspectral analysis of the bacterial models. A) *P. aeruginosa*. B) *S. marcescens*. C) *S. aureus*. D) *S. enterica*. E) *E. coli*. The red dotted squads show the localization and interaction of Ag@CuNPsRX1 with the cells. The green crosses indicate the presence and contact of Ag@CuNPsRX2. The scale bar is 2 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

respectively, under reflux conditions, promotes the reduction and galvanic replacement between Ag and Cu atoms. In this step, we hypothesized that the reducing agents produced an initial intermediary complex with the glucoside residues provided by the starch template, and the carboxylate groups (R-COO^- by A.A.). Thus, the sustained oxidation of the glucoside and carboxylic groups during the reaction will collectively generate Ag^0 and Cu^0 species (formation of a pink-cream color). Whereas, the reaction was under reflux and stirring

conditions, consequently, the generated Cu^0 species will be thermodynamically active to develop a template for the required nucleation process for the galvanic replacement with the Ag^0 species. Concurrently, the reaction will be further harbored by thermal activation, and the standard reduction potential differences between the silver ($\text{Ag}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}^0$, $E^0 = 0.779 \text{ V}$), and copper ($\text{Cu}^{+2} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cu}$, $E^0 = 0.46 \text{ V}$) ions, conducting to an atomic diffusion efflux to an optimal fast formation of bimetallic Ag@CuNPs [25,30,41]. Importantly,

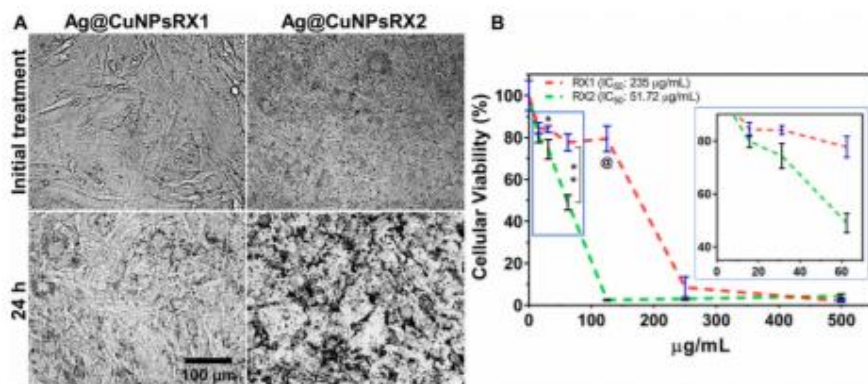


Fig. 6. Cellular morphology and viability analysis of the Ag@CuNPs. A) Phase-contrast microscopy showing the HGFs architecture at initial, and after 24 h of incubation with the test samples (125 µg/mL). B) Dose-response curve indicating the IC₅₀ values after 24 h of culture with the experimental materials. *, **, and @ illustrates significant differences between Ag@CuNPs@RX1 and Ag@CuNPsRX2.

Jing et al. suggested that 100 °C is the optimal reaction temperature to synthesize symmetrical Ag@PdNPs by galvanic replacement [42]. Furthermore, Muzikansky et al. synthesized spherical Cu@AgNPs using galvanic replacement with an amine reducer; in this work, they concluded that the temperature parameters regulated the Ag shielding thickness [23]. The aforesaid studies proposed that the replacement efficiency to accurately seed Ag on a metal such as Cu, was at = 100 °C (closely similar to ours), since, the Ag SPR band was shifted among 360–400 nm [23]. Furthermore, according to the type Ag atomic deposited layer (overgrowth and/or nucleated), it was shown that the SPR peak for Cu coated element could be shifted or even masked. Those results are remarkably close to ours, as we detected a similar SPR value for our NPs (330 nm and 420 nm, Fig. 1D) with an increased level of Ag (Fig. 2A and C) which suggested a thicker level of Ag island coatings (Fig. 2A). The thicker coating effect may explain the absence of Cu peak at 500–550 nm and the positive ZP (Fig. 2F). Importantly, Tanner et al. further reported for Ag-CuNPs a sharp SPR peak at 390–420 nm without evidence of the Cu SPR [18], information that strongly supports our findings. Additionally, to our shreds of evidence, in a previous report of Au@AgNPs it was proposed that the growth of thicker Ag shells on seeds of Au; uniformly, shifted the SPR to approximately 420 nm without detection of the Au core [43]. It was explained by means of high resolution transmission electron microscopy (HRTEM) that Ag shell was utterly uniform, although the resulting shape was spherical. Far more attractive, dos Santos et al. suggested that Au:AgNPs by co-reduction using sodium citrate, generated spherical NPs with only one SPR of 477 nm [27]. However, the above-stated works did not characterize the atomic positioning, as well as the elemental levels in the NPs. Moreover, it is relevant to indicate that the presence of starch may heighten the NPs dispersion. Since starch is considered a natural polymer, which can act as a steric capper [44,45], consequently promotes the dispersion and stability of Ag@CuNPsRX1 (see, Fig. 1A, F and G). The stated essential information is firmly in concordance with the homogeneous dispersed Ag@CuNPs observed here. The aforesaid information, further robust the growth mechanism of our homogeneous spherical Ag@CuNPsRX1 with the hallmarked SPR obtained here. Nonetheless, in Ag@CuNPsRX2 the absence of the steric stabilizer (starch) points toward increased surface energy accompanied by a thermodynamic instability [12,46,47], as we detected profound aggregation and lower dispersion of NPs (Fig. 1B and G). Consequently, it may also explain the observed shift at 400 nm and the elevated levels of Ag coating (Fig. 2B and C). From these results, we can propose that Ag@CuNPsRX2 follows a homogenous shaped core-shell structure, with controlled Cu core decorated with a thicker coordinated Ag layer, as

compared in previous studies [22]. However, we recommend performing more analyses in order to explain the thickness and crystallographic patterns of the atomic arrangements.

The MICs are essential analysis to test the bacterial sensibility of an antimicrobial substance. We detected that our experimental Ag@CuNPs showed similar MIC values (see Table 2). Far more attractive is that our bacterial models are constituted by Gram-positive and Gram-negative human pathogens, which furthermore, supports the fact of clinical broad-spectrum antibacterial activity by our novel nanomaterials. Moreover, it is important to highlight that the Ag@CuNPs followed a dose-dependent behavior for the tested bacteria (Fig. 3). Initially, our bacterial models showed different Zeta-Potential results, which is further consistent with the different structural, morphological, and molecular constituents (e.g., Gram-positive or negative). Additionally, our *S. aureus* model (Gram-positive) presented a thick peptidoglycan layer, which is extensively organized by teichoic-based acids that, in part are responsible for the negative Zeta-Potential [48,49]. This phenomenon should be in part, explained by the different surface physicochemical properties of our NPs, and the physiology of each bacterium. Thus, to the smaller diameter, higher levels of silver shielding and more stability contributed by Ag@CuNPsRX2 than those of Ag@CuNPsRX1 might promoted antibacterial effectivity. The action of the Ag@CuNPsRX2 could dislocate the β-1,4 glucosidic bonds of the peptidoglycan layer, thus, concluding in the transglycosylation and subsequent segregation of the *N*-acetylglucosamine resulting in the disaggregation of the peptidoglycan layer [32]. The Gram-negative models, which are structurally constituted by two-fluid membranes and a thin peptidoglycan layer [50,51], followed similar outcomes of antimicrobial activity as compared to *S. aureus* (Fig. 3). We need to highlight that *P. aeruginosa* has an excellent biofilm formation capability, metabolic versatility, and is responsible for critical nosocomial diseases [52]. Thus, we explored and detected a striking antibacterial activity against *P. aeruginosa* by the Ag@CuNPs treatments, mainly by Ag@CuNPsRX2 (see, Table 2 and Fig. 3). The smaller size (≈70 nm) and the synergic effect provided by the Ag and Cu elements of the Ag@CuNPsRX2, may act as a cornerstone to efficiently penetrate among the two layers, generating a platform for triggering long-lasting accumulation of the NPs (Fig. 5). Even more, the Ag@CuNPs could destabilize the lipopolysaccharide-binding membranes, which, therefore, could be oxidized by the action of the Ag layer and continuously permeating the wall-membranes by Cu⁺² ionic coordination [53,54]. This effect may also disrupt the interacting biomacromolecules (e.g., proteins, lipids, and carbohydrates) by the presence of Ag⁺/Ag⁰ [55,56], and destabilization of the nucleic based molecules by chelating with Cu⁰/Cu⁺² [53]. Further supporting the

highlighted evidence of morphological aberrations, and NPs localization given by the in situ real-time hyperspectral analyses (Fig. 6). Our results further propose that the antibacterial efficacy of the Ag@CuNPs are firmly directed to the differences between the type of cell wall (Fig. 3), as well as the surface charge (Table 1), instead of only the bacterial genre. In a previous study of Cu-AgNPs, the authors open the hypothesis that Gram-positive cell wall allows a promoted diffusion of small molecules compared to the complex Gram-negative wall, such as those of *E. coli* [57,58]. Moreover, Rousse et al. suggested that Cu-AgNPs produced by electrochemical synthesis with varied Ag atomic levels were capable to detriment the bacterial action against *E. coli* and *S. aureus* [57]. Far more attractive, is the synergic role with the bacterial surface Zeta-potential. A previous study, advocated that the bacterial adsorption capability of AgNPs was directly related to the cellular Zeta-potential [58]. Khan et al. proposed that the structural configuration of the bacterial wall, collectively with the cellular zeta-potential, act as a sustained platform for AgNPs adsorption and uptake, leading to microbial damage [58]. Our findings point toward as a proof of concept, as our Ag@CuNPs are substantially adsorbed on the bacterial surface (Fig. 5A-E), followed by NPs internalization and accumulation (Fig. 5); consequently, induce toxicological affections (Fig. 4A-E) that could also be modulated by the NPs size.

We conducted the bacterial growing behavior for 24 h under sub-MIC levels to detect any alterations in the bacterial maturation phases by the materials treatments. We suggested that morphological dislocations at the membrane level could slowly disrupt bacterial growing ability. Consequently, delaying several-folds the logarithmic phase of all the bacterial models compared to the control (Fig. 4). Similarly, Ruparelia et al. showed that increased amounts of AgNPs and CuNPs were capable of disrupting the logarithmic phase in different species of *E. coli*, *S. aureus*, and *B. subtilis* [37], as observed here. In a previous study of uncoated AgNPs, the authors reported increased kinetic production of the reactive oxygen species (ROS): $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ free radicals, which resulted, in the absence of a logarithmic phase in *E. coli* [59]. Extensive reports have also suggested that the focal mechanism of action of AgNPs and CuNPs are by promoting the endogenous generation of ROS [60,61]. Furthermore, it has been reported that NPs can conduct detrimental alterations of the membrane potential, increasing the cell-wall permeability that collapses the wall-membrane integrity [62,63]. From these results, we proposed that Ag@CuNPs restricted the growing capability by collapsing membrane potential and ROS overexpression in *P. aeruginosa* (Fig. 4A), *S. enterica* (Fig. 4E), and *S. marcescens* (Fig. 4D). ROS are capable of altering the bacterial integrity; thus consequently, our hypothesis is raised by the translocated morphological alterations accompanied by extensive destruction of the membrane integrity, as depicted here. However, for *S. aureus* and *E. coli*, we detected disturbing outcomes of bacterial viability; nonetheless, unaffected cell morphology. We hypothesized that our Ag@CuNPs might be capable of generating coordination bounds with phosphorylated enzymes and proteins, disrupting by this way, the energetic activity. Importantly, Zhao et al. proposed increased intracellular levels of ATP by antibacterial bimetallic AuPtNPs in *E. coli* [63]. The authors suggested that the increased ATP levels could lead to DNA damage-related genes and inhibition of the proteins associated with the ATP consumption. Moreover, a previous study suggested that different antibacterial treatments close to sub-MIC do not disrupt the bacterial morphology [64,65]; otherwise, promotes the overexpression of ATP [66]. Considering the above information, we proposed that our Ag@CuNPs models could alter energetic molecules associated with the ATP production and consumption, due to the reduced growing behavior but unaltered morphology.

Gingival tissue cells, such as those of fibroblasts, are considered good models for studying cellular toxicology and metabolic activity [67]. Thus, it is pivotal that antibacterial technologies should have reduced or null cytotoxicity properties against human cells. Importantly, our Ag@CuNPs showed impressive outcomes of reduced

cellular toxicity against HGF (Fig. 6). We detected a striking high tolerance of Ag@CuNPsRX1 dosages (IC_{50} : 235 $\mu\text{g}/\text{mL}$). This stimulating effect is closely related to possible protection offered by the starch platform. It has been reported that polymeric matrixes stabilizers could delay ions releases, such as those of Ag^+ and Cu^{2+} species [68]. Moreover, the polymeric matrixes (such as polyglucosides) prevent the overgrowth of aggregates, which further act as nucleophilic molecules [68,69]; simultaneously, conducting the reduction of metal ions. Hence, using this strategy, we could avoid the delivery of bulk metal ions into cells. In addition, the presence of the glucosidic groups can stabilize different biomacromolecules (e.g., membrane-associated proteins, cytoskeletal-based proteins), protecting the integrity of the cells [70]. Also, we detected that our Ag@CuNPs presented healthy outcomes of cellular biocompatibility, as well as antibacterial activity (Figs. 5 and 6). On the other hand, the Ag@CuNPsRX2 model was almost 4.5-folds less tolerated as compared to Ag@CuNPsRX1 (Fig. 6B). It is important to highlight that the main differences between those models were the size, the Zeta-Potential, and the Ag shelling resulting by the absence of the steric capper. Thus, the present results support our above-stated hypothesis. However, we must emphasize that our Ag@CuNPsRX2 reduced several folds the bacterial viability at the IC_{50} dosage. These interesting results open up a new road for researching the role of Ag-Cu bimetallic NPs in ATP-based proteins, and mitochondrial associated activity as well as the genome stability of human cells.

5. Conclusion

We have explored the broad-spectrum antibacterial activity of Ag@CuNPs against a wide number of human bacterial pathogens associated to different worldwide outbreaks. We developed a novel eco-friendly and fast chemical reduction approach, taking advantage of the reduction potential differences between Ag^+/Ag and Cu^{2+}/Cu to carry out galvanic replacement (co-reduction). Our strategy resulted in the synthesis of spherical Ag@CuNPs. The physicochemical analyses showed dispersed Ag@CuNPsRX1 of ~ 100 nm, positively charged, and doped with symmetrical Ag clusters on a Cu core. Moreover, the Ag@CuNPsRX2 displayed similar structural outcomes to those of Ag@CuNPsRX1; however, the diameter (~ 70 nm) and a configured homogenous Ag shielding are different. Our chemical strategy brings new results of the role of capping agents in the dispersion, and more importantly, the coating modulation for Ag@CuNPs. However, high-resolution TEM evaluations and XRD analyses are required to characterize the interplanar spacing and atomic distance configuration. Our antibacterial experiments revealed that the nano treatments successfully reduced the viability of Gram-positive and Gram-negative models of clinical importance. Interestingly, the detrimental effects generated by our bimetallic Ag@CuNPs suggested that the antibacterial pathway is not controlled by the bacterial genre (Gram-positive or negative). According to our biochemical and cell structural shreds of evidence, we further suggested that our Ag@CuNPs promotes overexpression of ROS followed by collapsing the membrane potential in *P. aeruginosa*, *S. enterica*, and *S. marcescens*. Moreover, for *E. coli* and *S. aureus*, we proposed that the Ag@CuNPs treatments could result in the disruption of energetic associated-proteins, which reduced the bacterial growing activity after 24 h. Finally, our results point toward that smaller size and homogenous silver shielding mainly interact as a cornerstone to orchestrate the broad-spectrum antibacterial action, dislocating the cell-wall architecture, and delaying the growing bacterial capability. The Ag@CuNPs, mainly, Ag@CuNPsRX1 showed high tolerance to HGFs, further supporting a decreased cytotoxicity for our materials. These results open up a new path for studying the mechanism of action at the whole-genome level (proteomic and metabolomic profiles), and the potential clinical applications. Similarly, for nosocomial disinfectants and different industries such as those of electronics, semiconductors, and pharmaceuticals.

Supplementary data to this article can be found online at <https://>

doi.org/10.1016/j.msec.2020.111501.

CRediT authorship contribution statement

B.V.S. and E.B.P. design the study and write the manuscript. E.B.P. and B.V.S. conducted the synthesis and characterization of the nanoparticles. E.B.P. performed the bacterial and cell culture evaluations. R.Z., M.S., D.G.M., N.C., and A.M.U. contributed with crucial and constructive reviews. J.S.C. collaborated with DLS analyses.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank the program No. A1-S-38368, "Proyecto Apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación" CB2017-2018, SEP-CONACYT, for the financial support.

References

- [1] Z. DeFilippis, P.P. Bloom, M. Torres Soto, M.K. Mansour, M.R.A. Sater, M.H. Huntley, S. Turbett, R.T. Chung, Y.-B. Chou, E.L. Hohmann, N. Engl. J. Med. 381 (2019) 2043–2050.
- [2] N. Jackson, L. Czaplewski, L.J.V. Piddock, J. Antimicrob. Chemother. 73 (2010) 1452–1459.
- [3] A. Lepape, A. Jeun, J. De Waele, A. Frigieri, A. Sovey, P. Vanhems, M.P. Gustin, D.L. Monnet, J. Garnacho-Montero, A. Kohlenberg, Antimicrob. Resistance & Infection Control 9 (2020) 1.
- [4] L. Wang, C. Hu, L. Shan, Int. J. Nanomedicine 12 (2017) 1227–1249.
- [5] V.N. Slavin, J. Assis, U.O. Häfeli, H. Bach, Journal of Nanobiotechnology 15 (2017) 65.
- [6] A. Llorens, E. Lloret, P.A. Picouet, R. Trbojevič, A. Fernández, Trends Food Sci. Technol. 24 (2013) 19–29.
- [7] C. Durante, V. Pirazzolo, L. Perini, M. Favaro, G. Grassi, A. Gemaro, Appl. Catal. B Environ. 150–159 (2014) 206–225.
- [8] A.M. Eremenko, I.S. Petrá, N.P. Smirnova, A.V. Rudenki, V.S. Markiva, Nanoscale Res. Lett. 11 (2016) 28.
- [9] X. Zhang, S. Xu, S. Jiang, J. Wang, J. Wei, S. Xu, S. Guo, H. Liu, H. Qiu, Z. Li, H. Liu, Z. Li, H. Li, Appl. Surf. Sci. 353 (2015) 63–70.
- [10] Y.-S. Li, Y.-C. Lu, K.-S. Chou, F.-J. Liu, Mater. Res. Bull. 45 (2010) 1837–1843.
- [11] N.M. Zain, A.G.F. Stapley, G. Shama, Carbohydr. Polym. 112 (2014) 195–202.
- [12] K.S. Tan, K.Y. Cheong, J. Nanopart. Res. 15 (2013) 1537.
- [13] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, Chem. Mater. 13 (2001) 2313–2322.
- [14] H. Duan, D. Wang, Y. Li, Chem. Soc. Rev. 44 (2015) 5778–5792.
- [15] P. Dandhad, M. Mukhopadhyay, Ind. Eng. Chem. Res. 55 (2016) 9557–9577.
- [16] C. Sharma, S. Ansari, M.S. Ansari, S.P. Satsatgao, M.M. Srivastava, Mater. Sci. Eng. C 116 (2020) 111153.
- [17] P.K. Khanna, S. Galkwad, P.V. Adhyapak, N. Singh, B. Marimuthu, Mater. Lett. 61 (2007) 4711–4714.
- [18] M. Tanner, N. Sary, I.G. Yulug, S. Suzer, J. Mater. Chem. 21 (2011) 13150–13154.
- [19] Y.-T. Pan, H. Yang, Nano Today (2020) 100832.
- [20] H. Jung, M.E. King, M.L. Pessoniak, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 40 (2019) 104–117.
- [21] K. Liu, D. Wang, Y. Li, Nano Today 7 (2012) 448–466.
- [22] C.J. DeSantis, R.G. Weiner, A. Radmilovic, M.M. Bower, S.E. Skrabalak, The Journal of Physical Chemistry Letters 4 (2013) 3072–3082.
- [23] A. Muzikansky, P. Nankubvili, J. Grubisic, D. Zhou, J. Phys. Chem. C 117 (2013) 3093–3100.
- [24] C.M. Cobley, Y. Xia, Materials Science and Engineering: R: Reports 70 (2010) 44–62.
- [25] C. Lee, N.R. Kim, J. Koo, Y.J. Lee, H.M. Lee, Nanotechnology 26 (2015) 455601.
- [26] Z. Zhang, Y. Ji, J. Li, Z. Zhong, F. Su, RSC Adv. 5 (2015) 54364–54371.
- [27] M.M. dos Santos, M.J. Queiroz, P.V. Baptista, J. Nanopart. Res. 14 (2012) 859.
- [28] Z. Guo, Y. Chen, Y. Wang, H. Jiang, X. Wang, J. Mater. Chem. B 8 (2020) 4764–4777.
- [29] E. Beltrán-Pareda, B. Valdez-Salas, E. Valdez-Salas, G. Pérez-Cortés, N. Nadev, Journal of Nanomaterials, 2019, (2019).
- [30] P.P. Estebe, A.T.A. Jenkins, T.C. Arnot, Colloids Surf. B: Biointerfaces 139 (2016) 87–94.
- [31] K. Theophil, V.J. Schacht, M. Schlüter, S. Schnell, C.-S. Stängu, R. Schaumann, M. Bunge, Frontiers in Microbiology, 5, (2014).
- [32] N. Huang, X. Chen, X. Zhu, M. Xu, J. Liu, Biomaterials 141 (2017) 296–313.
- [33] Y. Yang, F.-X. Reich, J. Shi, X. He, R. Hinkel, C. Högg, Dent. Mater. 34 (2018) 201–208.
- [34] K.J. Baek, Y. Choi, S. Ji, Arch. Oral Biol. 58 (2013) 1282–1292.
- [35] J.J. Aleo, F.A. De Ruzia, P.A. Farber, J. Periodontol. 46 (1975) 639–645.
- [36] S. Kumar, S.K. Mishra, A. Singh, M. Mishra, A. Tiwari, S. Chawla, P. Gupta, N. Satpati, H. Mohapatra, L. Goswami, C. Goswami, ACS Appl. Mater. Interfaces 11 (2019) 42998–43017.
- [37] J.P. Ruparella, A.K. Chatterjee, S.P. Duttagupta, S. Mukherjee, Acta Biomater. 4 (2008) 707–716.
- [38] L. Tang, L. Zhu, F. Tang, C. Yao, J. Wang, L. Li, Langmuir 34 (2018) 14570–14576.
- [39] J. Song, H. Kim, Y. Jang, J. Jang, ACS Appl. Mater. Interfaces 5 (2013) 11563–11568.
- [40] Y. Sun, Y. Xia, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 3892–3901.
- [41] N.T. Tran, H. Liao, X. Feng, J.K. Zhdanov, et al., Synthesis of highly branched hollow trimetallic PdAgCu nanoparticles, Nanotechnology 31 (18) (2020) 1–8 185601, <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab6225>, In this issue.
- [42] H. Jiang, H. Wang, Chem. Mater. 27 (2015) 2172–2180.
- [43] M. Banerjee, S. Shama, A. Chattopadhyay, S.S. Ghosh, Nanoscale 3 (2011) 5120–5125.
- [44] A. Bhowar, R.L. Shogren, D.G. Stevenson, J.L. Willert, P.K. Bhowmik, Carbohydr. Polym. 66 (2006) 546–550.
- [45] H.E. Emam, H.R. Ahmed, Carbohydr. Polym. 135 (2016) 300–307.
- [46] R. Zamiri, A. Zakaria, H.A. Ahsanur, M. Darroust, A.K. Zak, G.P.C. Drummen, J. Alloys Compd. 516 (2012) 41–48.
- [47] G. Sharma, D. Kumar, A. Kumar, A.A.H. Al-Muhtaseb, D. Pathania, M. Nuzhad, G.T. Mula, Materials Science and Engineering: C, 71 (2017), pp. 1216–1230.
- [48] P.J. Planet, A. Narechania, L. Chen, B. Mathema, S. Boundy, G. Archer, R. Kreiswirth, Trends Microbiol. 25 (2017) 153–166.
- [49] X. Yan, M. Cousserot, A. Charbit, A. Jamet, Trends Microbiol. 28 (2020) 6–9.
- [50] J. Cama, A.M. Henny, M. Winterhalter, J. Mol. Biol. 431 (2019) 3531–3546.
- [51] H. Dong, X. Tang, Z. Zhang, C. Dong, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1862 (2017) 1461–1467.
- [52] S. Chevalier, E. Bouffartigue, J. Bodilo, O. Maillot, O. Lesouffrier, M.-G.J. Psalidopoulos, N. Orange, A. Dufray, P. Cornet, PNAS Microbiol. Rev. 41 (2017) 698–722.
- [53] M.N. Patel, P.A. Doshi, B.S. Bhatt, Polyhedron 29 (2010) 3238–3245.
- [54] F. Conert, F. Heinrich, A. Greenwood, V.J. Silin, M. Cortes, E. Mihăilescu, Biophysical Journal, 118 (2020) 238a.
- [55] R. Ramalingam, T. Parandhaman, S.K. Das, ACS Appl. Mater. Interfaces 8 (2016) 4963–4976.
- [56] X. Yan, B. He, L. Liu, G. Qu, J. Shi, L. Hu, G. Jiang, Metallomics 10 (2018) 557–564.
- [57] C. Boume, J. Jussé, V. Mancel, B. Levi, S.C. Gaughoff, P. Fricotona, RSC Adv. 8 (2016) 50933–50940.
- [58] S.S. Khan, A. Mukherjee, N. Chandrasekar, Colloids Surf. B: Biointerfaces 87 (2011) 129–138.
- [59] W. Zhang, Y. Li, J. Niu, Y. Chen, Langmuir 29 (2013) 4647–4651.
- [60] G. Choi, Z. Hu, Environmental Science & Technology 42 (2008) 4583–4588.
- [61] S. Chen, Y. Guo, H. Zhong, S. Chen, J. Li, Z. Ge, J. Tang, Chem. Eng. J. 256 (2014) 238–246.
- [62] Y. Cai, Y. Zhao, Y. Tian, W. Zhang, X. Lü, X. Jiang, Biomaterials 33 (2012) 2327–2333.
- [63] Y. Zhao, C. Ye, W. Liu, B. Chen, X. Jiang, Angew. Chem. Int. Ed. 53 (2014) 8127–8131.
- [64] T.P.T. Cushnie, N.H. O’Driscoll, A.J. Lamb, Cell. Mol. Life Sci. 73 (2018) 4471–4492.
- [65] M. Hartmann, M. Berdtich, J. Hawecker, M.F. Ardakani, D. Gerthsen, A.S. Ulrich, Antimicrob. Agents Chemother. 54 (2010) 3132–3142.
- [66] D.A. Schneider, R.L. Gourse, J. Biol. Chem. 279 (2004) 8262–8268.
- [67] W. Gourron, F. Lehmann, W. Spahl, G. Leyhausen, J. Biomed. Mater. Res. 41 (1998) 474–480.
- [68] A. Travan, C. Pelillo, I. Donati, E. Marsich, M. Benincasa, T. Scarpa, S. Senerovic, G. Tureci, R. Gemaro, S. Pasletti, Biomacromolecules 10 (2009) 1429–1435.
- [69] E. Esmail, A. Suzuki, N. Alhara, E. Dait, K. Torigoe, Langmuir 14 (1998) 3157–3159.
- [70] X. Zhu, R.B. Schmidt, Angew. Chem. Int. Ed. 48 (2009) 1900–1934.