

13TCAm. Matrices de quitosano funcionalizadas con nanopartículas de cobre

Chitosan matrices functionalized with copper nanoparticles

Diego Marín-Silva^{1,2}, Nelson Romano¹, Adriana Pinotti^{1,2}

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), CONICET-CIC, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

²Facultad de Ingeniería, UNLP, La Plata (1900), Argentina.

e-mail: dm.alejandrosilva@live.com

Resumen

El quitosano (Q) es un polisacárido lineal formado predominantemente por unidades de glucosamina sintetizado a partir de la quitina. Una propiedad específica es su bioactividad y biocompatibilidad. En los últimos años se han desarrollado películas nanocompuestas incorporando nanopartículas metálicas (N_p) como estrategia para mejorar las propiedades de materiales biodegradables. Los objetivos del presente trabajo fueron: i) sintetizar nanopartículas de cobre en polivinil pirrolidona (PVP), ii) formular nanocompuestos incorporando distintas concentraciones de nanopartículas a soluciones filmogénicas de quitosano, iii) estudiar las propiedades estructurales, de barrera y antimicrobianas de los nanocompuestos formulados.

La correlación entre la concentración de nanopartículas de cobre y la absorbancia a 1650 o a 888 cm⁻¹ mostró un ajuste satisfactorio, concluyéndose que el método de PLS sería útil para clasificar nuevas muestras del conjunto externo de predicción. Mediante el uso de métodos quimiométricos se logró la diferenciación rápida de los nanomateriales en grupos o *clusters*.

La formación de una matriz interconectada por las interacciones establecidas entre el quitosano, el PVP y las nanopartículas explicarían los cambios evidenciados en la solubilidad y en las propiedades mecánicas de las matrices. Estos resultados demuestran que la inclusión de nanopartículas de cobre en películas biopoliméricas permitiría obtener materiales más hidrofóbicos y con mayor resistencia. Asimismo el efecto bacteriostático inhibitorio sobre *S.aureus* arrojó resultados promisorios para la implementación de estos nanomateriales como matrices antimicrobianas.

Palabras clave: quitosano, PVP, nanopartículas de cobre, ATR-FTIR, PCA

Abstract

Chitosan is a linear polysaccharide formed predominantly by glucosamine units synthesized from chitin. A specific property is its bioactivity and biocompatibility. In recent years, nanocomposite films have been developed incorporating metallic nanoparticles (N_p) as a strategy to improve the properties of biodegradable materials. The objectives of the present work were: i) to synthesize copper nanoparticles in polyvinyl pyrrolidone (PVP), ii) to formulate nanocomposites incorporating different concentrations of nanoparticles to filmogenic solutions of chitosan, iii) to study structure, barrier and antibacterial properties of the formulated nanocomposites.

The correlation among copper nanoparticle concentrations and the absorbance at 1650 or at 888 cm⁻¹ showed a satisfactory fit/ adjustment, concluding that PLS method would be useful to classify new samples of the external set of prediction. By means of the use of the chemometric methods, the rapid differentiation of the nanomaterials in groups or clusters was obtained.

The formation of an interconnected matrix by the interactions established among chitosan, PVP, and the nanoparticles would explain the changes demonstrated in the solubility and in the mechanical properties of the matrices. These results confirm that the incorporation of copper nanoparticles to biopolymeric films would allow obtaining more hydrophobic and resistant materials. Likewise, the bacteriostatic inhibitory effect on *S.aureus* yielded promissory results for the implementation of these nanomaterials like antimicrobial matrices.

Keywords: chitosan, PVP, copper nanoparticles, ATR-FTIR, PCA

1. Introducción

El quitosano (Q) es un polisacárido lineal formado predominantemente por unidades de glucosamina sintetizado a partir de la quitina, componente del

exoesqueleto de crustáceos e insectos, mediante una N-deacetilación en condiciones alcalinas. Una propiedad específica es su bioactividad y biocompatibilidad las que determinan sus aplicaciones farmacológicas, cosméticas y biotecnológicas (Ai *et al.* 2017).

La molécula de polivinilpirrolidona (PVP) contiene un componente hidrofílico (la porción polipirrolidona) y un grupo hidrofóbico (el grupo alquilo). Es un agente estabilizante capaz de controlar el tamaño previniendo la agregación de las nanopartículas debido a las fuerzas repulsivas de las cadenas carbonadas hidrofóbicas (Seyedsadjadi y Mashayekhishams 2012; Koczura y Mourdikoudis 2015).

En los últimos años se han desarrollado películas nanocompuestas incorporando nanopartículas metálicas (N_p) como estrategia para mejorar las propiedades de materiales biodegradables (Rouhi *et al.*, 2013, Arfat *et al.*, 2017a).

Las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas metálicas como las de cobre y plata han atraído considerable atención no sólo en el campo de envasado de alimentos sino también en aplicaciones biomédicas y biotecnológicas (Kyriacou *et al.*, 2004, Shankar *et al.*, 2014).

Los mecanismos de toxicidad que presentan las N_p s con acción bactericida dependerá de una amplia variedad de factores entre los que se pueden mencionar el tamaño y la forma de las N_p s, su composición química, el recubrimiento y su carga superficial potencial y la concentración de nanopartículas usada (Shah *et al.*, 2013).

Aplicar las herramientas de la quimiometría a los datos obtenidos por técnicas espectroscópicas de infrarrojo ha tornado más viable nuevos procedimientos analíticos, que se adquieren fácilmente y son no destructivos (Ferrao 2001).

El análisis por componentes principales (PCA) consiste en la transformación de una matriz de datos en un número menor de factores (Hair *et al.*, 2005). Asimismo, la regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS) se utiliza para encontrar las relaciones fundamentales entre las variables independientes y las variables dependientes.

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) sintetizar nanopartículas de cobre en polivinil pirrolidona (PVP), ii) formular nanocompuestos incorporando distintas proporciones de nanopartículas a soluciones filmogénicas de quitosano, iii) estudiar las propiedades estructurales, de barrera y antimicrobianas de los nanocompuestos formulados.

2. Materiales y métodos

2.1 Síntesis de nanopartículas de cobre

Para las síntesis de las nanopartículas (N_p Cu), el sulfato de cobre se solubilizó en una solución de PVP al 1%, se agregó ácido ascórbico y se llevó a

estufa a 90°C durante 6 horas a pH 7. El ácido ascórbico se agregó como agente antioxidante para proteger a las nanopartículas del proceso de oxidación. La aparición de una coloración rojiza indicó la formación de las nanopartículas de cobre. Las suspensiones obtenidas se sonicaron usando un equipo sonicador Sonic Vibra-Cell.

2.2 Caracterización de las nanopartículas de cobre

La observación microscópica de la morfología de las partículas se realizó por microscopía electrónica de barrido con un SEM FEI QUANTA 200 (Holanda). Un analizador de energía dispersiva de rayos X (EDX) fue usado para proporcionar información acerca de la composición química de las muestras.

El tamaño promedio de las nanopartículas fue determinado por medio de un equipo SZ-100 (Horiba, USA).

2.3 Formulación y caracterización de las películas a base de quitosano

La solución de quitosano (Q) con una concentración de 1% se preparó por solubilización en ácido acético al 1%. A continuación, la solución de Q y la suspensión de N_p Cu en PVP se mezclaron a fin de obtener las relaciones N_p Cu (1, 2, 3, 4): Q 0.075: 0.15: 0.225: 0.30: 1.

Las películas nanocompuestas formuladas se obtuvieron por moldeo de las suspensiones filmogénicas y secado a 37°C y se caracterizaron mediante ensayos de tracción, ángulo de contacto, permeabilidad al vapor de agua y solubilidad.

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se cuantificó según el método descrito por Rivero *et al.* (2010). El esfuerzo (MPa) y la elongación a la ruptura (%) de las películas nanocompuestas se determinaron usando un Texturómetro TA.XT2i–Stable Micro Systems (Surrey, Inglaterra).

Para estudiar la hidrofiliicidad de las matrices, la medición del ángulo de contacto se llevó a cabo mediante un goniómetro Ramé-Hart Model 21AC (Ramé-Hart Instrument Co., USA) a temperatura ambiente.

2.4 Espectroscopía de infrarrojo (ATR-FTIR)

Los espectros ATR-FTIR de las muestras se registraron por medio de un equipo Nicolet, iS10 Thermo Scientific (Madison, USA) en el rango 4000-400 cm^{-1} por acumulación de 32 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} , sobre un cristal de diamante (Smart iTX accessory).

Los espectros fueron analizados por medio del Omnic 8 (Thermo Scientific, Madison, USA). Para evaluar las diferencias entre las muestras conteniendo diferentes proporciones de nanopartículas, los espectros obtenidos fueron

evaluados por métodos estadísticos multivariantes como análisis de componentes principales (PCA) y regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), usando el programa The Unscrambler 8 (CAMO, Norway).

2.5 Cepa y condiciones de cultivo

Staphylococcus aureus ATCC 25923, patógeno bacteriano Gram positivo, fue obtenido de la colección de patógenos alimentarios del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA). 10 μ l de un cultivo concentrado se inoculó en caldo nutritivo, composición típica (g/L): peptona, 10; extracto de carne, 10; NaCl, 5, pH 7.3.

La incubación se realizó a 37 °C en aerobiosis durante 16 h hasta alcanzar una concentración de microorganismos aproximada de 10^{10} UFC/ml (cultivo inicial). Para obtener el cultivo de trabajo se inoculó 10 μ l del cultivo inicial en 10 ml de caldo nutritivo e incubó en las condiciones ya descriptas.

2.6 Actividad antimicrobiana

A partir del cultivo de trabajo se realizaron diluciones 1:10 en NaCl 0.85% para obtener una concentración aproximada de 10^8 UFC/ml. Alícuotas de 100 μ l de la suspensión diluida se inocularon en la superficie de placas de Petri conteniendo agar nutritivo.

Se esparció el líquido cuidadosamente sobre el medio hasta cubrir toda la superficie de las placas. Para evaluar la susceptibilidad de *S. aureus* ATCC 25923 se empleó el método de difusión en disco modificado (Lamarra *et al.*, 2017).

Para analizar la actividad antimicrobiana de las películas de quitosano cargadas con nanopartículas de cobre, se cortaron discos de 1.5 cm de diámetro de cada una de las formulaciones. Tres discos de cada formulación fueron dispuestos sobre la superficie de las placas de Petri previamente inoculadas con el patógeno.

Placas sin películas fueron incluidas como control de crecimiento del patógeno. Las placas se incubaron a 37°C y se tomaron fotografías a las 24 y 48 h. Las zonas de inhibición se determinaron usando el software Image J (NIH, Estados Unidos).

A partir del análisis gráfico de las placas, se determinaron el diámetro total de inhibición (Dti), el área del halo de inhibición (Ahi), considerada como el área de inhibición adyacente a la película y el porcentaje de inhibición del patógeno (Pi) determinado a partir del cociente entre la suma de áreas de inhibición total correspondiente a los 3 discos dispuestos sobre la placa de Petri y el área de crecimiento del patógeno sobre la placa (112.6 ± 1.3 cm²). Para garantizar la reproducibilidad de los resultados el ensayo se realizó por triplicado.

2.7 Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos se empleó el test de comparación de medias de Fisher (LSD) y análisis de varianza (ANOVA), utilizando el paquete estadístico Systat (versión 10, USA), con un nivel de significación de 0,05.

3 Resultados y discusión

3.1. Formación de las nanopartículas de cobre

En la Figura 1 se muestran las curvas de absorbancia en función del tiempo, indicando la formación de nanopartículas de cobre. Se tomaron muestras de la suspensión a 90°C cada 15 min, detectándose la formación de un pico definido después de 3 h de calentamiento.

La formación de las NpCu se confirmó por la detección de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) a 560 nm. De acuerdo a Morioka *et al.* (2016), el pico deriva de la resonancia del plasmón de superficie de las nanopartículas de cobre.

3.2. Caracterización de las nanopartículas

El tamaño de las nanopartículas formadas se determinó por el método de dispersión dinámica de luz (DLS), dando un valor de 310 nm.

La formación y el tamaño de las partículas se confirmaron por observación microscópica por SEM. Asimismo la morfología de las partículas obtenidas se muestra en la Figura 2a que exhibe N_ps aproximadamente esféricas. La Figura 2b muestra el análisis de la composición de las nanopartículas.

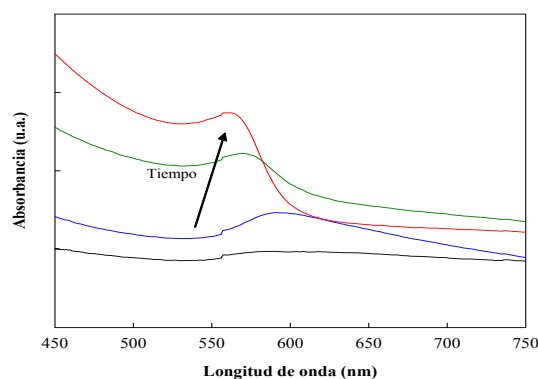


Figura 1. Formación de nanopartículas de Cu en función del tiempo.

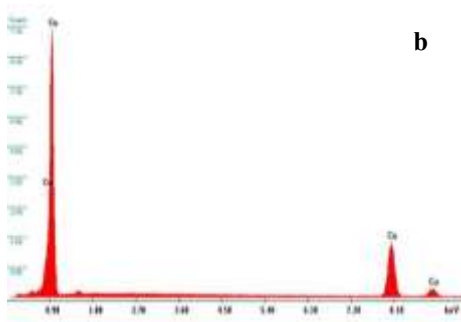
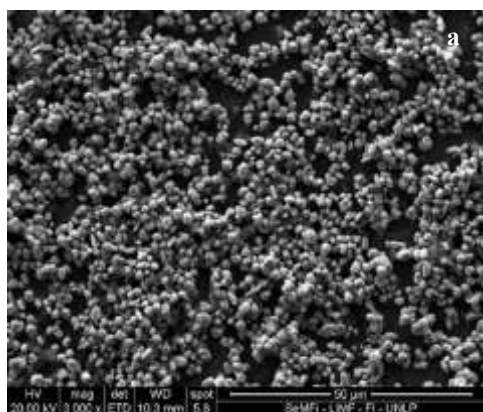


Figura 2 Micrografía de las nanopartículas de Cu obtenidas por SEM (a), análisis elemental de la superficie por EDX (b).

las N_pCu metálicas en la matriz polimérica resultando en un incremento de la hidrofobicidad superficial.

Tabla 1. Humedad, solubilidad, ángulo de contacto y permeabilidad al vapor de agua de películas de quitosano con inclusión de nanopartículas de cobre

	$N_pCu:Q$ (p/p)	Humedad %	Solubilidad %	Angulo de contacto	WVPx10 ¹¹ (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
Q	-	14.3 (0.7)	49.0 (3.1)	72.5° (5.0)	5.1 (0.2)
N_pCu1	0.075:1	27.1 (1.1)	8.7 (1.0)	80.7° (4.0)	5.3 (0.5)
N_pCu2	0.15:1	23.5 (1.2)	6.6 (0.4)	82.6° (1.5)	5.4 (0.3)
N_pCu3	0.225:1	23.0 (1.8)	3.4 (0.2)	85.5° (2.1)	2.7 (0.1)
N_pCu4	0.30:1	21.8 (1.4)	2.9 (0.2)	80.5° (1.3)	3.5 (0.1)

3.3 Propiedades mecánicas, de barrera y ángulo de contacto

En la Tabla 1 se muestran los valores de humedad, solubilidad, ángulo de contacto y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de matrices a base de quitosano con incorporación de nanopartículas de cobre (N_pCu).

Los valores de solubilidad de los nanocompuestos disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) con el incremento en la concentración de N_p .

Por otra parte, se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) de la humedad con la incorporación de las nanopartículas.

La determinación de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) juega un rol preponderante en la preservación y vida útil de los alimentos (Lizundia *et al.*, 2017). Los valores de WVP de nanocompuestos con mayor proporción de nanopartículas (N_pCu3 y N_pCu4) resultaron significativamente diferentes de los de Q, N_pQ1 y N_pQ2 ($p < 0.05$).

El ángulo de contacto de las películas con N_pCu incorporadas sufrió un incremento en relación a las películas de Q como puede verse en la Figura 3.

De acuerdo a Rhim *et al.*, 2013 y Shankar *et al.*, 2014, el aumento del ángulo de contacto de los nanocompuestos se puede atribuir a la inclusión de

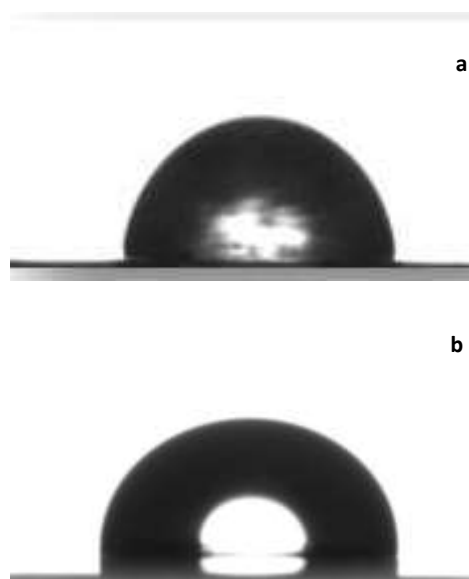


Figura 3. Ángulo de contacto de las películas control Q (a) y las matrices N_pCu2 (b)

Las curvas fuerza-deformación de las películas de Q control mostraron el patrón mecánico típico de un material dúctil. En las películas compuestas con la inclusión de nanopartículas de N_pCu se observó una disminución de la elongación y un aumento de la fuerza a la ruptura con respecto a las películas de quitosano como consecuencia de las interacciones entre la matriz y las N_p como puede verse en la Figura 4.

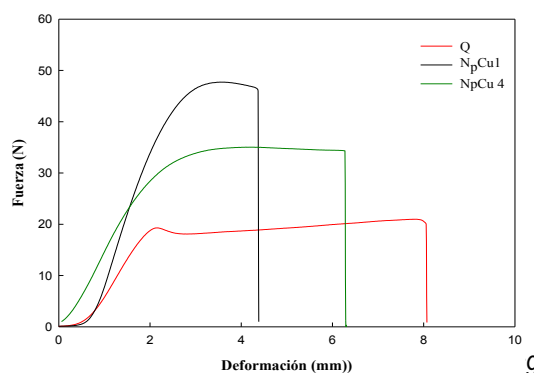


Figura 4. Perfiles mecánicos de las películas de Q y las matrices nanocompuestas N_pCu1 v

3.4. Análisis térmico

La temperatura de transición vítrea es una propiedad fundamental de los materiales amorfos ya que representa un cambio en la movilidad de las cadenas (Arfat *et al.*, 2017b).

En la Figura 5, se muestra el flujo de calor reversible del primer calentamiento de las películas de quitosano y de la matriz N_pCu_3 . Las curvas exhibieron temperaturas de transición vítrea localizadas a 37.7 y 92.1°C y 54.5 y 97.4°C, respectivamente. Las T_g s de los nanocompuestos no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p>0.05$). De acuerdo a Arfat *et al.* (2017b), la T_g de las N_p aumenta con la carga de nanopartículas, lo que restringe la movilidad de las cadenas del polímero.

Adicionalmente, la mayor rigidez podría estar influenciada por la interacción entre el quitosano y las N_p a través de puentes de hidrógeno (Arfat *et al.*, 2017a).

Para el segundo barrido de calentamiento, la T_g se corrió hacia mayores temperaturas atribuible a la mayor remoción del agua absorbida.

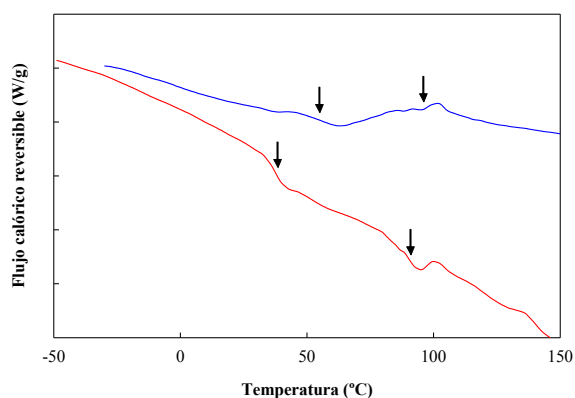


Figura 5. Temperaturas de transición vítrea (T_g) de películas de Q y N_pCu_3 obtenidas a partir del primer ciclo del flujo de calor reversible.

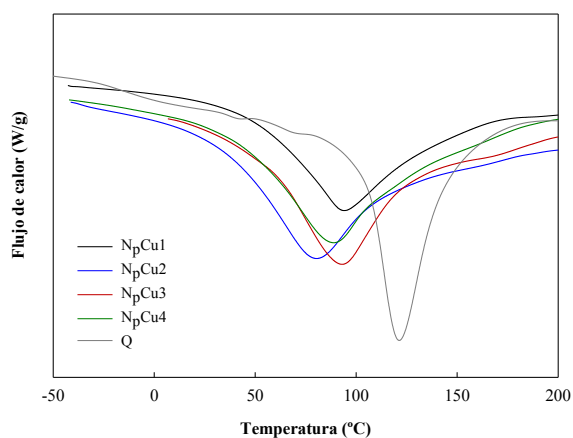


Figura 6. Termogramas de las matrices N_pCu obtenidas por MDSC.

En la Figura 6 se exhiben los termogramas obtenidos por DSC mostrando las temperaturas de fusión (T_f) de las películas de Q y de los nanocompuestos. La T_f del Q fue significativamente diferente ($p<0.05$) a la de los N_pCu , independientemente de la concentración de cobre.

Similar tendencia siguió la entalpía correspondiente a este evento endotérmico como puede observarse en la Tabla incluida en la Figura 6.

De acuerdo a Bunjes y Unruh (2007), la disminución en la temperatura de fusión es particularmente pronunciada en el rango de tamaño nanométrico y la polidispersabilidad lleva a un ensanchamiento del pico de fusión, relacionado con la distribución del tamaño de las nanopartículas ya que las diferentes fracciones funden a diferentes temperaturas.

3.5 Análisis por ATR-FTIR

La técnica ATR-FTIR es un método conveniente y sensible para detectar interacciones entre grupos moleculares. La interacción entre el Q, PVP y las nanopartículas sintetizadas mostró cambios significativos en relación a las películas de Q.

En la Figura 7a y b se pueden observar los espectros de la película Q control y las formuladas con diferentes proporciones de N_pCu .

El espectro de las películas de quitosano exhibió los picos característicos a 1650 cm^{-1} (C=O tensión de la amida I del grupo acetamida) y a 1531 cm^{-1} (protonación parcial del grupo amino $-NH_2$). La banda de absorción a 1333 cm^{-1} se atribuye a la amida III mientras el pico localizado a 1016 cm^{-1} (vibraciones del esqueleto que involucran a la tensión C-O) es propio de la estructura del polisacárido (Rivero *et al.*, 2010). El corrimiento del pico del PVP localizado a 1634 cm^{-1} hacia menores números de onda permitió inferir la interacción del PVP y las nanopartículas (Tu, 2008).

En el espectro de las matrices nanocompuestas, las intensidades de las bandas de la región $1600\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ sufrieron una significativa disminución, observándose asimismo la aparición de un pico localizado a 1299 cm^{-1} y la desaparición de la banda a 1255 cm^{-1} (Figura 7).

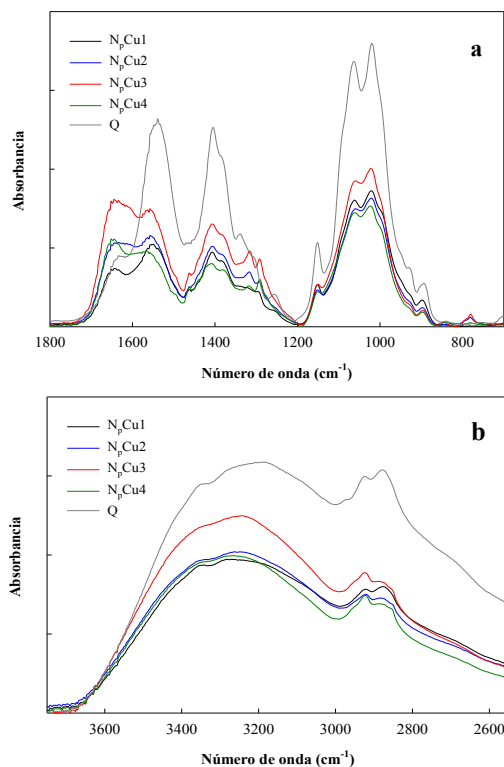


Figura 7. Espectros de nanocompuestos a base de quitosano obtenidos por medio de ATR-FTIR mostrando diferentes regiones: (a) 1800-800 cm^{-1} v (b) 3600-2600 cm^{-1} .

3.6 Análisis por PCA y PLS

El PCA es un método matemático bilineal multivariable donde los datos originales se transforman en una combinación lineal de variables no correlacionadas entre sí, llamadas componentes principales (PCs). Los primeros PCs son los que describen la mayor variación en los datos, que se asocia a la información más relevante.

La Figura 8a exhibe los gráficos biplot de PCA, de los que puede inferirse que las distintas proporciones de nanopartículas produjeron una separación de las muestras en grupos o *clusters* bien definidos.

El análisis se realizó considerando los resultados obtenidos mediante ATR-FTIR en la región del espectro 1400-1800 cm^{-1} . Los datos experimentales exhibieron varianzas residuales similares entre sí, confirmando el ajuste satisfactorio del modelo.

Por otra parte, el análisis PLS se llevó a cabo con el fin de correlacionar la concentración de nanopartículas (cN_p) con las absorbancias (λ) correspondientes a picos que sufrieron cambios significativos debido a las interacciones entre los componentes del sistema. En la Figura 8b y c, se muestra la relación de la absorbancia de las bandas ubicadas a 1650 y a 900 cm^{-1} con la concentración cN_p que condujo a un ajuste satisfactorio, con un $R^2 > 0.85$

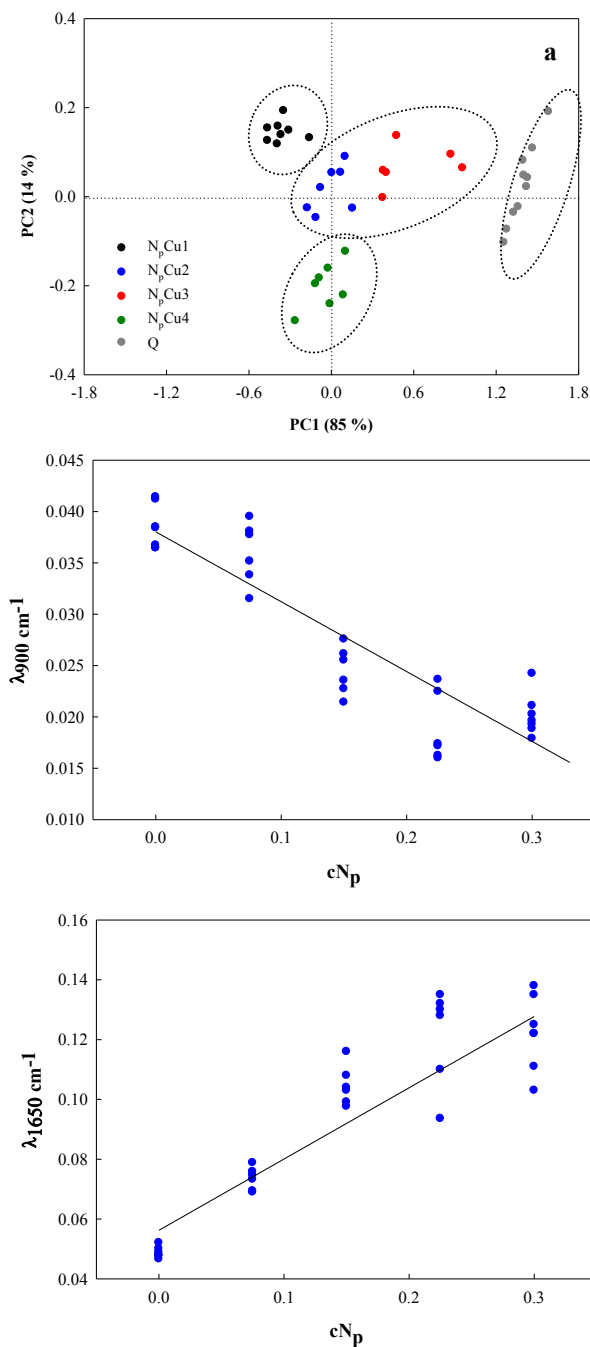


Figura 8. Análisis de componentes principales (PCA) en matrices con distintas relaciones $N_pCu:Q$ (a), regresión parcial por mínimos. Cuadrados (PSL) entre la absorbancia a 900 (b) y 1650 cm^{-1} y la concentración de cN_p (c).

3.7 Propiedades antimicrobianas

La actividad antimicrobiana de las películas de quitosano cargadas con nanopartículas de cobre se muestra en la Figura 9. P_i y D_{ti} representan la capacidad antimicrobiana de las películas contra *S. aureus* ATCC 25923 y se muestran en la Tabla 2. Todas las películas cargadas con nanopartículas de cobre y en contacto directo con el patógeno presentaron un efecto bacteriostático contra *S. aureus* ATCC 25923 (Tabla 2). Las películas con

menor concentración de nanopartículas permitieron mayor desarrollo de halos de inhibición [A_{hi} : $3.2 \pm 0.5 \text{ cm}^2$ ($N_p\text{Cu1}$), A_{hi} : $1.6 \pm 0.3 \text{ cm}^2$ ($N_p\text{Cu2}$)] (Tabla 2, Figura 9). Las películas control de quitosano sin adición de nanopartículas (Q), presentaron efecto inhibitorio parcial luego de 24 h de incubación (Figura 9).

En el trabajo de Lamarra *et al.* (2017) se informaron resultados similares. Los autores encontraron que películas de quitosano sin adición de nanopartículas produjeron menor efecto antimicrobiano contra *S. aureus* ATCC 25923 en comparación con aquellas cargadas con ácido gálico.

Tabla 2. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano cargadas con nanopartículas de cobre sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

NpCu1	3.9 (0.4) ^{a,*}	+	3.2 (0.5) ^a	29.7 (0.2)
NpCu2	3.8 (0.4) ^{a,*}	+	1.6 (0.3) ^b	22.6 (0.8)
NpCu3	3.1 (0.1) ^{b,*}	+	0 (0) ^c	21.1 (0.4)
NpCu4	3.0 (0.1) ^{b,*}	+	0 (0) ^c	18.6 (0.5)
Q	n.d.	-/+	n.d.	n.d.

D_i: diámetro total de inhibición. A_{hi}: área del halo de inhibición.
P_i: porcentaje de inhibición. I_c: inhibición por contacto
n.d.: no determinado. +: representa inhibición; -/+ : inhibición parcial.

(^{a,b,c}) Letras diferentes indican diferencias significativas entre las formulaciones ($p < 0.05$).

La formulación de películas de quitosano con nanopartículas de cobre resultó en un incremento de las propiedades antimicrobianas del quitosano sobre *S. aureus* ATCC 25923. Otros autores obtuvieron resultados inhibitorios similares sobre cepas Gram positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*) para películas cargadas con nanopartículas de cobre (Azam *et al.*, 2012; Kruk *et al.*, 2015).

La formación de halos de inhibición fue dependiente de la concentración de nanopartículas incluidas en las películas. Este efecto se debería a que las nanopartículas en altas concentraciones modificarían las propiedades físicas de las películas provocando la reducción de la solubilidad (sección 3.3), y por ende disminuyendo la difusión de componentes antimicrobianos hacia el medio.

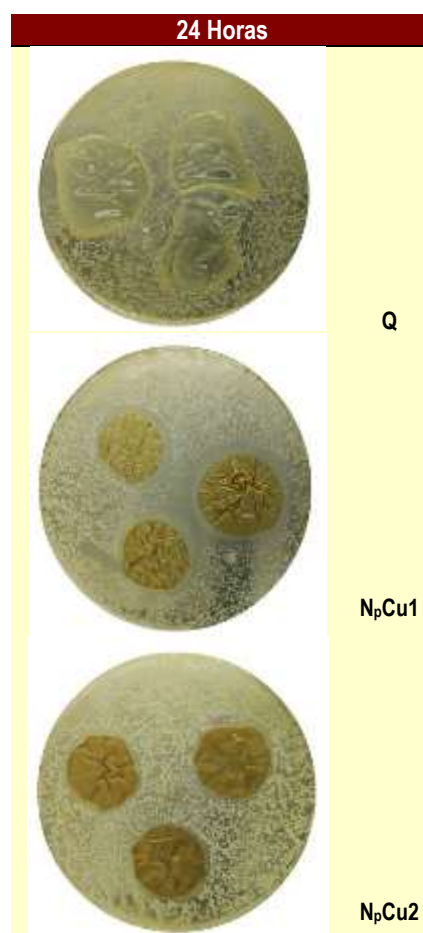


Figura 9. Propiedades anti-microbianas de películas de Q y nanocompuestos $N_p\text{Cu1}$ y $N_p\text{Cu2}$ sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4. Conclusiones

La correlación entre concentración de Q y la absorbancia a 1650 o a 900 cm^{-1} mostró un ajuste satisfactorio, concluyéndose que el método de PLS sería útil para clasificar nuevas muestras del conjunto externo de predicción. Mediante el uso de la quimiometría se consiguió la diferenciación rápida de los nanomateriales en grupos o *clusters*.

La formación de una matriz interconectada por las interacciones establecidas entre el quitosano, el PVP y las nanopartículas explicarían los cambios evidenciados en la solubilidad y en las propiedades mecánicas de las matrices. Estos resultados demuestran que la inclusión de nanopartículas de cobre en películas biopoliméricas permitiría obtener materiales más hidrofóbicos y con mayor resistencia.

Asimismo el efecto bacteriostático inhibitorio sobre *S.aureus* arrojó resultados promisorios para la implementación de estos nanomateriales como matrices antimicrobianas.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Proyecto PICT 2012-0415) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP 2013-0109).

6. Referencias

Ai, J.W.; Liao, W.; Ren, Z.L. (2017). *Enhanced anticancer effect of copper-loaded chitosan nanoparticles against osteosarcoma cancer*, Royal Society of Chemistry Advances 7(26), 15971-15977.

Arfat, Y.A.; Ahmed, J.; Hiremath, N.; Auras, R.; Joseph, A. (2017a). *Thermo- mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles*, Food Hydrocolloids 62, 191-202.

Arfat, Y.A.; Ahmed, J.; Jacob, Y. (2017b). *Preparation and characterization of agar- based nanocomposite films reinforced with bimetallic (Ag-Cu) alloy nanoparticles*, Carbohydrate Polymers 155, 382-390.

Azam, A.; Ahmed, A.S.; Oves, M.; Khan, M.S.; Habib, S.S.; Memic, A. (2012). *Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study*, International Journal of Nanomedicine 7, 6003.

Bunjes, H.; Unruh, T. (2007). *Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering*, Advanced Drug Delivery Reviews 59, 379-402.

Ferrao, M.F. (2001). *Técnicas de reflexão no infravermelho aplicada na análise de alimentos*, Revista Tecnológica, Universidade de Santa Cruz do Sul – Unisc, Santa Cruz do Sul – RS.

Hair, J.F.; Black, W.C.; Babin, B.J.; Anderson, R.E.; Tatham, R.L. (2005). *Análise multivariada de dados*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman.

Kyriacou, S.V.; Brownlow, W.J.; Xu, X.H. (2004). *Using nanoparticle optics assay for direct observation of the function of antimicrobial agents in single live bacterial cells*, Biochemistry 43, 140-147.

Koczur, K.M.; Mourdikoudis, S.; Polavarapu, L.; Skrabalak, S.E. (2015). *Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis*, Dalton Transactions 44(41), 17883-17905.

Kruk, T.; Szczepanowicz, K.; Stefańska, J.; Socha, R.P.; Warszyński, P. (2015). *Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 128, 17-22.

Lamarra, J.; Giannuzzi, L.; Rivero, S.; Pinotti, A. (2017). *Assembly of chitosan support matrix with gallic acid-functionalized nanoparticles*, Materials Science and Engineering C. 79, 848-859.

Lizundia, E.; Vilas, J.L.; Sangroniz, A.; Etxeberri, A. (2017). *Light and gas barrier properties of PLLA/metallic nanoparticles composite films*, European Polymer Journal 91, 10-20

Morioka, T.; Takesue, M.; Hayashi, H.; Watanabe, M.; Smith, R.L. (2016). *Antioxidation properties and surface interactions of polyvinylpyrrolidone-capped zerovalent copper nanoparticles synthesized in supercritical water*, ACS Applied Materials & Interfaces 8(3), 1627-1634.

Rivero, S.; García, M.A.; Pinotti, A. (2010). *Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films*. Carbohydrate Polymers. 82, 270-276.

Rhim, J.W.; Wang, L.F.; Hong, S.I. (2013). *Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity*, Food Hydrocolloids 33, 327-335.

Rouhi, J.; Mahmud, S.; Naderi, N.; Ooi, C.R.; Mahmood, M.R. (2013). *Physical properties of fish gelatin-based bio-nanocomposite films incorporated with ZnO nanorods*, Nanoscale Research Letters 8(1), 364.

Seyedsadjadi, M.; Mashayekhisams, P. (2012). *The effect of polyvinylpyrrolidone on the formation of copper nanoplates in wet-chemical reduction method*. International Journal of Bio-Inorganic Hybrid Nanomaterials (4), 209-214.

Shah, A.; Javid, G.; Zargar, S.; Teli, F.; Khan, B.; Yattoo, G.; Gulzar, G.; Sodhi, J.; Khan, M.; Shoukat, A.; Saif, R. (2013). *Safety and efficacy of 1-week levofloxacin-based triple therapy in first-line treatment for Helicobacter pylori-related peptic ulcer disease in Kashmir*, Indian Journal of Gastroenterology (32), 32-36.

Shankar, S.; Teng, X.; Rhim, J-W. (2014). *Properties and characterization of agar/CuNP bionanocomposite films prepared with different copper salts and reducing agents*, Carbohydrate Polymers 114, 484-492.

Tu, W.X.; Zuo, X.B.; Liu, H.F. (2008). *Study on the interaction between polyvinylpyrrolidone and platinum metals during the formation of the colloidal metal nanoparticles*, Chinese Journal of Polymer Science 26(01), 23-29.