



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

“Evaluación de la capacidad antimicrobiana de recubrimientos
nanométricos depositados sobre textiles de uso médico y
odontológico”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M en C. LORENA REYES CARMONA

TUTORAS:

DRA. ARGELIA ALMAGUER FLORES (Facultad de Odontología, UNAM)

DRA. SANDRA E. RODIL POSADA (Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DRA. PHAEDRA SILVA BERMUDEZ (Instituto Nacional de Rehabilitación)

DR. OMAR A. SEPÚLVEDA ROBLES (Centro Médico Nacional, Siglo XXI)

Ciudad Universitaria, CDMX. Enero, 2025.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“La science n'a pas de patrie, parce que le savoir est le patrimoine de l'humanité, le flambeau qui éclaire le monde”

"La ciencia no tiene patria, porque el conocimiento es patrimonio de la humanidad y es la antorcha que ilumina el mundo."

Louis Pasteur 1878

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Argelia Almaguer, por ser una guía invaluable en el ámbito de la investigación. Gracias por todas sus enseñanzas, su constante apoyo y sus consejos que me ayudaron a alcanzar mis metas académicas. También, le agradezco por todo el apoyo personal y la confianza que depositó en mí. Muchas gracias por todo Dra. Arge.

A mi cotutora la Dra. Sandra Rodil por su apoyo, confianza, por enseñarme su forma de trabajo. Gracias por estar al pendiente de mi formación académica, por su visión y orientación en el desarrollo de este proyecto.

A mi comité tutor a la Dra. Phaedra Silva Bermúdez y al Dr. Omar Sepúlveda Robles por todas las enseñanzas y siempre asesorarme ante cualquier duda.

A los doctores que integran el jurado para mi examen de grado, por aceptar formar parte de él y tomarse el tiempo de revisar esta tesis.

Al Prof. Nicola Cioffi, Prof. Rosana Picca, Dra. Chiara Sportelli, Dra. Margherita Izzi, del Departamento de Química de la Universidad de Bari por darme la oportunidad de visitar su laboratorio para aprender de ustedes y por la hospitalidad que me brindaron en la hermosa Bari, Italia. Grazie mille.

(To Prof. Nicola Cioffi, Prof. Rosana Picca, Dr. Chiara Sportelli and Dr. Margherita Izzi, for giving me the opportunity to visit your laboratory, to learn from you and for your kindness I received in beautiful Bari, Italy. Grazie mille).

Al Dr. Rafael Álvarez, por ser un ejemplo académico y una fuente constante de inspiración. Gracias por tu apoyo incondicional, por motivarme y guiarme en esta etapa del doctorado a lograr cada uno de mis objetivos. En especial, por todos los momentos personales y científicos que hemos compartido juntos, los cuales han hecho de este camino algo aún más significativo.

A los miembros de Laboratorio de Biointerfases, Dr. Víctor, Dra. Miryam, en especial a la Dra. Gina Prado por sus consejos, enseñanzas, así como por su apoyo académico y amistad invaluable. A Lupita, Ezequiel, Nicté y Marisol por su amistad, apoyo y compañerismo en esta etapa académica.

A la Dra. Elizabeth Hernández del Instituto de Geofísica de la UNAM, por el estándar de Ti para las mediciones en ICP. A la M en C. Francisca García del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, por las mediciones de ICP. Al Dr. Dimitris del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por la cepa *E. coli RfaB* y a Leticia Cruz de la FO, UNAM por la preparación de medios de cultivo.

Al SECIHTI antes CONAHCYT por la beca de doctorado otorgada (CVU: 917708), así como a la DGAPA por el financiamiento otorgado (proyecto PAPIIT-UNAM #IN207824). También a la CGEP-UNAM por la beca de movilidad para que pudiera realizar una estancia de investigación internacional.

Al PMDCMOS, a la Facultad de Odontología y en especial mi eterno agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme todos los recursos necesarios para mi formación académica y de investigación.

Finalmente, a mi familia, quienes con su apoyo incondicional me han encaminado a lograr esta meta, a mi hermano César Ricardo, mi mamá Esperanza Carmona y mi papá Ricardo Reyes, sé que estarías muy orgulloso de esta meta la cual me aconsejaste realizar en su momento, con todo mi cariño para ustedes.

Orgullosamente UNAM

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1. EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL (EPP)	3
1.1 Evolución histórica de los EPP	3
1.2 EPP en el área médica.....	4
1.3 Polipropileno (PP).....	5
2.MICROORGANISMOS TRANSMITIDOS POR AEROSOLAS.....	6
2.1 Bacterias de importancia médica y odontológica.....	7
2.1.1 Bacterias aerobias.....	8
2.1.2 Bacterias anaerobias.....	11
2.2 Virus de importancia médica y odontológica	15
2.2.1 Bacteriófagos.....	16
2.2.2 Bacteriófagos como subrogantes virales	19
3. NANOMATERIALES CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS	21
3.1 Metales antimicrobianos.....	22
3.1.1 Plata (Ag)	22
3.1.2 Cobre (Cu).....	23
3.1.3 Aleación plata-cobre (AgCu)	23
3.2 Óxidos metálicos antimicrobianos	24
3.2.1 Óxido de Zinc (ZnO).....	24
3.2.2 Dióxido de titanio (TiO ₂)	25
3.3 Recubrimientos Nanométricos.....	25
3.3.1 Magnetron Sputtering	26
3.4 Técnicas de caracterización de nanorecubrimientos.....	28
3.4.1 Microscopía óptica.....	28
3.4.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	29
3.4.3 Espectroscopía por dispersión de energía de RX (EDS)	31
3.4.4 Espectroscopía de fotoelectrones (XPS).....	32
3.4.5 Ángulo de contacto (WCA).....	34
3.4.6 Perfilometría óptica	35
3.4.7 Plasma Acoplado Inductivamente (ICP)	37
4. EFICIENCIA DE FILTRADO CON PARTÍCULAS DE NaCl	38
5. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA	40
5.1 Ensayos antibacterianos.....	40
5.1.1 Eficiencia de filtrado bacteriana (BFE)	40
5.1.2 Ensayo por contacto directo bacteriano (gota).....	41
5.2 Ensayos antivirales	43
5.2.1 Propagación de bacteriófagos	43
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	44
III. HIPÓTESIS	45
IV. OBJETIVOS	45
OBJETIVO GENERAL.....	45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45

V. MATERIALES Y MÉTODOS	46
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	46
2. DEPÓSITO DE NANORECUBRIMIENTOS.....	46
3. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANORECUBRIMIENTOS.....	47
3.1 Microscopía óptica.....	47
3.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y espectroscopía de dispersión de rayos X (EDS)	48
3.3 Espectroscopía de fotoelectrones (XPS)	48
3.4 Ángulo de contacto (WCA)	49
3.5 Perfilometría óptica	49
3.6 Espectrometría de masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS)	49
4. EFICIENCIA DE FILTRADO CON PARTÍCULAS DE NaCl	50
5. ENSAYOS ANTIMICROBIANOS	51
5.1 Evaluación antibacteriana.....	51
5.1.1 Viabilidad de aerosoles bacterianos.....	53
5.1.2 Ensayo por contacto directo bacteriano (gota)	54
5.2 Evaluación antiviral	55
5.2.1 Inactivación de aerosoles virales	58
5.2.2 Ensayo por contacto directo viral (gota)	58
VI. ANALISIS ESTADÍSTICO	59
VII. RESULTADOS	60
1. DEPÓSITO DE LOS NANORECUBRIMIENTOS.....	60
2. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANORECUBRIMIENTOS.....	60
2.1 Caracterización del nanorecubrimiento AgCu.....	62
2.2 Caracterización del nanorecubrimiento ZnO	63
2.3 Caracterización del nanorecubrimiento TiO ₂	65
3. EFICIENCIA DE FILTRADO CON PARTÍCULAS DE NaCl	66
4. LIBERACIÓN DE IONES METÁLICOS	66
5. EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA	67
5.1 Evaluación antibacteriana.....	67
5.1.1 Inhibición de aerosoles bacterianos.....	67
5.1.2 Inhibición bacteriana por contacto directo (gota)	70
5.2 Evaluación antiviral	72
5.2.1 Inactivación de aerosoles virales	72
5.2.2 Inactivación viral por contacto directo (gota)	73
VIII. DISCUSIÓN	76
IX. CONCLUSIONES	87
X. REFERENCIAS	89
XI. PRODUCTOS ACADÉMICOS	106
1. Publicaciones del proyecto de investigación	106
2. Congresos en los que se presentó el proyecto de doctorado	107
3. Proyecto desarrollado en estancia de investigación internacional.....	107

RESUMEN

Introducción: La principal transmisión de bacterias y virus respiratorios es a través de bioaerosoles conformados por microgotas de saliva expulsadas al hablar, toser o estornudar. En el caso de los profesionales de la salud, como médicos y odontólogos, están altamente expuestos a estos patógenos debido a la cercanía con los pacientes, al uso de instrumentos durante procedimientos convencionales y/o quirúrgicos. A pesar de que los cubrebocas quirúrgicos son efectivos, una vez contaminados pueden permanecer infectivos durante largos periodos de tiempo. Y hasta el momento no se han desarrollado equipos de protección médica con propiedades antimicrobianas por sí mismos.

Objetivo: Evaluar la capacidad antibacteriana y antiviral de nanorecubrimientos metálicos (AgCu) y óxidos metálicos (ZnO y TiO₂) depositados sobre textiles de polipropileno.

Materiales y Métodos: Los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂ se depositaron mediante la técnica de magnetron sputtering sobre textiles de polipropileno. Los cuales fueron caracterizados por microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM), espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS), espectroscopía de fotoelectrones (XPS), ángulo de contacto (WCA), perfilometría óptica, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Para la evaluación antimicrobiana, se utilizaron ocho bacterias patógenas y cuatro virus subrogantes de virus respiratorios (bacteriófagos de RNA y DNA). Mediante dos metodologías; interacción de los nanorecubrimientos por corto tiempo contra aerosoles bacterianos y virales e interacción de mayor tiempo por contacto directo utilizando una gota bacteriana durante 24 h o gota viral durante 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 12 y 24 h. Los resultados se cuantificaron mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFCs) en bacterias o unidades formadoras de placas líticas (UFPs) en virus.

Resultados: Se depositaron de manera exitosa nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂ sobre PP mediante la técnica de magnetron sputtering. Los nanorecubrimientos fueron homogéneos, hidrofóbicos y la liberación de iones metálicos no rebaso los límites de citotoxicidad. La evaluación antibacteriana mostró que los nanorecubrimientos inhibieron significativamente el crecimiento bacteriano. En la interacción a corto tiempo con aerosoles bacterianos, se observaron inhibiciones en AgCu del 70-95 %, en ZnO del 26-95 % y en TiO₂ del 18-81 %. En el ensayo de contacto directo (gota) a mayor tiempo, las inhibiciones fueron en AgCu del 72-99 %, ZnO del 55-99 % y TiO₂ del 32-95 %. Respecto a la capacidad antiviral, los nanorecubrimientos de AgCu y ZnO inactivaron los aerosoles que contenían virus de RNA (38-64 %) y DNA (11-16 %). Sin embargo, TiO₂ no mostró inactivación de aerosoles virales (corto tiempo de exposición). Mientras que en el ensayo de mayor tiempo de interacción (gota), los fagos de RNA fueron inactivados en su totalidad por los tres tipos de nanorecubrimientos (AgCu a las 2 h, ZnO a las 12 h y TiO₂ a las 24 h). El fago de DNA no fue totalmente inactivado.

Conclusiones: Los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂ mostraron potencial antimicrobiano frente a bacterias patógenas y virus subrogados, tanto por contacto directo como en aerosoles. AgCu fue el más efectivo, seguido por ZnO, mientras que TiO₂ mostró menor inhibición. Estos nanorecubrimientos se proponen como posible alternativa para optimizar equipos de protección personal, que reduzcan y prevengan la transmisión de patógenos en entornos médicos y odontológicos.

ABSTRACT

Introduction: Respiratory bacteria and viruses are mainly transmitted through bioaerosols made up of saliva microdroplets expelled when talking, coughing, or sneezing. Health professionals such as doctors and dentists are highly exposed to these pathogens because of their proximity to patients and the use of instruments during conventional and/or surgical procedures. Although surgical facemasks are effective, once contaminated, they can remain infected for prolonged periods. No medical protective equipment with antimicrobial properties has been developed to date.

Aim: To evaluate the antibacterial and antiviral capacities of metallic nanocoatings (AgCu) and metal oxides (ZnO and TiO₂) deposited on polypropylene (PP) fabrics.

Materials and Methods: AgCu, ZnO, and TiO₂ nanocoatings were deposited on polypropylene fabrics by magnetron sputtering. They were characterized using optical and scanning electron microscopy (SEM), X-ray energy dispersive spectroscopy (EDS), photoelectron spectroscopy (XPS), water contact angle (WCA), optical profilometry, and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Eight pathogenic bacteria and four respiratory virus surrogates (RNA and DNA bacteriophages) were used for antimicrobial evaluation. Using two methodologies, short-time interaction of the nanocoatings against bacterial and viral aerosols and longer-time interaction by direct contact using a bacterial droplet for 24 h or viral droplets for 0.5, 1.5, 2, 4, 6, 12, and 24 h. The results were quantified by counting colony-forming units (CFUs) in bacteria or lytic plate-forming units (PFUs) in viruses.

Results: AgCu, ZnO, and TiO₂ nanocoatings were successfully deposited on PP by magnetron sputtering. The nanocoatings were homogeneous and hydrophobic, and the release of metal ions did not exceed their cytotoxicity limits. Antibacterial evaluation showed that the nanocoatings significantly inhibited bacterial growth. In the short-time interaction with bacterial aerosols, inhibition was observed for AgCu (70-95 %), ZnO (26-95 %), and TiO₂ (18-81 %). In the direct contact test (droplet) for a longer time, the inhibitions were 72-99 % for AgCu, 55-99 % for ZnO, and 32-95 % for TiO₂. Regarding antiviral capacities, AgCu and ZnO nanocoatings inactivated aerosols containing RNA (38-64 %) and DNA (11-16 %) viruses. However, TiO₂ did not inactivate viral aerosols (short exposure time). In the longer interaction time (droplet) assay, RNA phages were completely inactivated by all three types of nanocoatings (AgCu at 2 h, ZnO at 12 h, and TiO₂ at 24 h). The DNA phage was not completely inactivated.

Conclusions: The AgCu, ZnO, and TiO₂ nanocoatings showed antimicrobial potential against pathogenic bacteria and surrogate viruses. AgCu was the most effective, followed by ZnO, whereas TiO₂ showed less inhibition. These nanocoatings are proposed as a possible alternative to optimize personal protective equipment to reduce and prevent the transmission of pathogens in medical and dental environments.

I. INTRODUCCIÓN

1. EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL (EPP)

Los equipos de protección personal o denominados “EPP”, tienen la finalidad de proteger al individuo de daños ocasionados por agentes químicos, biológicos, físicos, radiológicos, eléctricos, mecánicos u otros peligros que puedan encontrarse realizando actividades habituales y/o en su lugar de trabajo (OSHA, 2010).

1.1 Evolución histórica de los EPP

En el área de la salud los EPP se han desarrollado debido a la presencia de brotes infecciosos a lo largo de la historia de la humanidad. Uno de los primeros registros del uso y desarrollo de equipos de protección fue durante la pandemia conocida como la “peste negra” en el siglo XIV (1347-1351) causada por la bacteria *Yersinia pestis*, que ocasionaba fiebre, dolor, debilidad y vómitos entre otros, conllevando a la muerte de las personas infectadas. Se creía que esta enfermedad se transmitía por el aire “envenenado”, por lo que los médicos de esa época empezaron a utilizar una túnica de cuero como ropa protectora, sombrero y una mascarilla médica, mejor conocida como “máscara negra con pico de pájaro” que en su interior portaba hierbas y aceites aromáticos con la finalidad de evitar el contacto con ese aire contaminado (Conti, 2020; World Health Organization, 2022) (**Figura 1A**). Asimismo, durante otros brotes infecciosos como la peste de Manchuria en 1910 (*Y. pestis*) (Lynteris, 2018) y la gripa española en 1918 (influenza tipo A H1N1), se reconoció la importancia de utilizar algún tipo de máscara protectora de manera rutinaria para evitar contagios entre el personal médico y los pacientes (Conti, 2020) (**Figuras 1B y C**). Años más tarde, a partir de 1960 se mejoraron diversos EPP en el sector médico. Sin embargo, fue hasta el 2003 y 2009 cuando surgieron dos brotes virales altamente infecciosos: la influenza aviar (H5N1) y la influenza tipo A (H1N1), donde se reforzaron las medidas de protección relacionadas con los EPP de manera permanente (**Figura 1D**). Esto último cobró mayor relevancia en el 2019 con la reciente pandemia por COVID-19 ocasionada por el

agente viral SARS-CoV-2 que ha provocado más de 6.6 millones de muertes en todo el mundo, de las cuales la OMS estima que aproximadamente 115,500 personas eran profesionales de la salud que atendieron la emergencia sanitaria (World Health, 2021b), confirmando la necesidad de mejorar los EPP utilizados por el personal de la salud (**Figura 1E**).



Figura 1. Equipo de protección personal (EPP) utilizado en diferentes periodos históricos por el personal de la salud hasta la actualidad (CDC, 2020; Conti, 2020; Lynteris, 2018; Spelce et al., 2017).

1.2 EPP en el área médica

Actualmente, la OMS recomienda que el personal de la salud como médicos, odontólogos y enfermeros utilicen guantes, bata quirúrgica, gorro, lentes de protección, caretas, cubrebocas o respirador, durante los procedimientos donde puedan estar expuestos a los agentes patógenos. Por lo tanto, es indispensable que el personal de la salud conozca el uso correcto de los EPP, así como sus limitaciones, cuidado, mantenimiento, vida útil y desecho adecuado (OSHA, 2010; World Health, 2020a, 2021a).

Se ha demostrado que con el uso correcto de los EPP se puede restringir la propagación de bacterias nosocomiales (Lambert, 2017) y virus como el SARS-CoV-2 o el H1N1 (Ippolito et al., 2020). Sin embargo, a pesar de la efectividad de los EPP para prevenir enfermedades infecciosas, ninguno tiene la capacidad de inactivar a los microorganismos

patógenos que viajan en forma de aerosoles o se alojan en las microgotas que se quedan depositadas sobre sus superficies. Esto último remarca la necesidad de optimizar los EPP, buscando nuevas alternativas para disminuir la transmisión de infecciones y generar una mayor protección al personal de salud.

1.3 Polipropileno (PP)

Uno de los materiales más utilizados para el desarrollo de los EPP es el polipropileno (PP), clasificado como un polímero termoplástico, cristalino, ampliamente utilizado para prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas (Hossain et al., 2024). El PP puede producirse a gran escala a partir del monómero “propileno” mediante polimerización por crecimiento en cadena. Al ser un polímero termoplástico, puede diseñarse de diversas maneras, como cubrebocas de un solo uso (5 g de PP) o bata quirúrgica desechable (10 g de PP) (Nghiem et al., 2021). Un cubrebocas quirúrgico está compuesto por tres capas de PP; las capas exteriores (PP no tejido fabricado por spunbond donde se extruyen filamentos del PP, se enfrían, se entrelazan y se consolidan mediante unión térmica), brindan resistencia mecánica, protección y repelencia al agua. La capa intermedia (PP fabricado por meltblown donde el polímero fundido se extruye a través de boquillas formando microfibras) permite el paso del aire y posee capacidad de filtración, mientras que la capa interior tiene funciones similares a la externa. Además, el PP también se utiliza para fabricar las correas elásticas de los cubrebocas. El hecho de que el PP sea el material de elección sobre otros textiles se debe a razones como su resistencia mecánica, ligereza, capacidad hidrofóbica, eficiencia de filtrado, facilidad de reproducir a gran escala y el bajo costo de producción (Nghiem et al., 2021).

2. MICROORGANISMOS TRANSMITIDOS POR AEROSOLES

Los bioaerosoles orales están compuestos de microgotas de saliva expulsadas del tracto respiratorio humano al toser, hablar o estornudar, y son una potencial vía de transmisión de bacterias y virus respiratorios. Las microgotas expulsadas, cuyo tamaño oscila en micrómetros, se desplazan por el aire y algunas de ellas (sobre todo aquellas con un tamaño que oscila $\sim 1 \mu\text{m}$), pueden quedar suspendidas en el ambiente durante un tiempo importante, mientras que las microgotas más grandes ($>5 \mu\text{m}$), se depositan más rápidamente sobre las superficies (**Figura 2**) (Harding et al., 2020; Joseph et al., 2022; Rowe et al., 2022; Tang et al., 2015; Wang et al., 2021).

Cabe destacar que, los bioaerosoles son la principal fuente de transmisión de microorganismos respiratorios, como el síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Tang et al., 2015; Wang et al., 2021; World Health, 2020b), los coronavirus (SARS y MERS), el virus de la rubéola (sarampión) (Zachariah & Stockwell, 2016), el virus de la influenza (Cowling et al., 2013; Tellier, 2009) o el virus de la varicela-zóster (Tang et al., 2005), que pueden transmitirse en el ambiente y en los hospitales (Chow & Mermel, 2017; La Rosa et al., 2013; Shen & Yao, 2023).

Además, los médicos y particularmente los odontólogos están muy expuestos a diversos patógenos transmitidos en los bioaerosoles generados durante los procedimientos dentales, ya que se utilizan instrumentos rotatorios o ultrasónicos que producen una gran cantidad de bioaerosoles potencialmente patógenos (Leggat & Kedjarune, 2001; Zemouri et al., 2017). Además, existen diversos factores como la temperatura en el ambiente, la humedad relativa, el material y las propiedades de la superficie, entre otros, que modifican la supervivencia de los virus o bacterias en los bioaerosoles y microgotas que quedan depositados en las superficies (Fernandez et al., 2019).

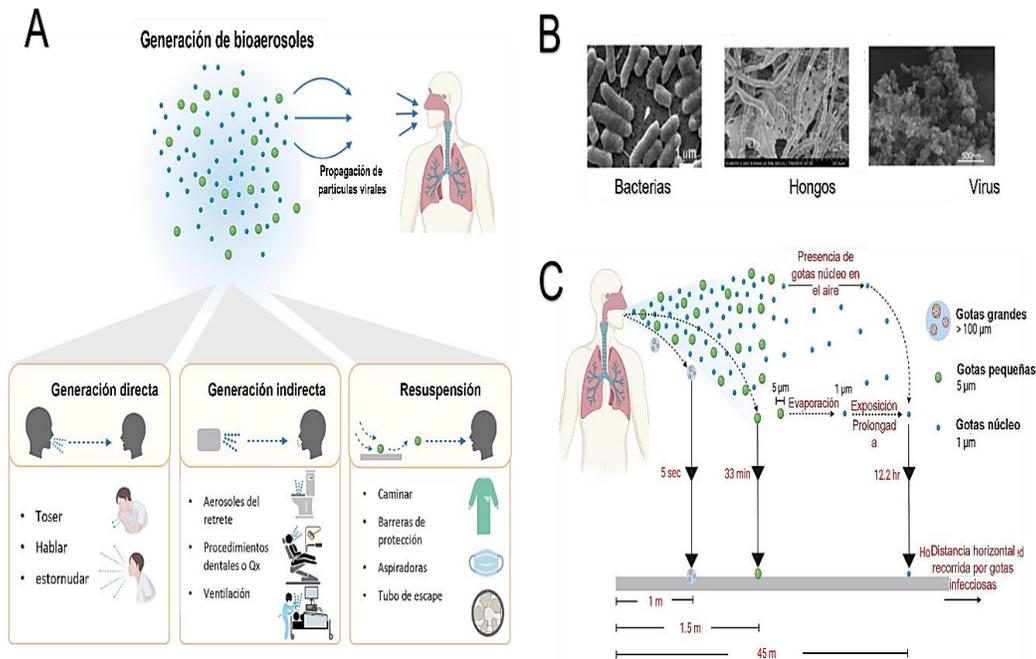


Figura 2. Generación de bioaerosoles, tiempo de exposición y microorganismos patógenos. **A.** Propagación de partículas virales y formas de transmisión. **B.** Microorganismos observados por medio de microscopía electrónica. **C.** Tiempo y tamaño de microgotas suspendidas en el aire que fueron generadas por bioaerosoles (Joseph et al., 2022; Sharma Ghimire et al., 2019).

2.1 Bacterias de importancia médica y odontológica

Las bacterias desempeñan un importante papel positivo en diversos ecosistemas terrestres y acuáticos como; ríos, mares, bosques, selvas etc. Y también interactúan de manera importante con diversos hospederos como vegetales, animales y humanos. Tal es el caso, del denominado “microbioma humano” cuya función principal es mantener un equilibrio dinámico en las diferentes estructuras del cuerpo humano (Ursell et al., 2012). Sin embargo, este microbioma es afectado constantemente por factores ambientales, estímulos externos o por el aumento de bacterias patógenas que desencadenan procesos infecciosos (Martín et al., 2014).

A lo largo de la historia de la humanidad, las enfermedades infecciosas causadas por bacterias han sido una causa importante de morbilidad y mortalidad. Una de las

principales etiologías de los procesos infecciosos, es la formación de biopelículas, las cuales forman parte de la patogénesis de muchas infecciones bacterianas subagudas y crónicas (del Pozo & Patel, 2007), ocasionando diversos efectos adversos en los entornos médicos y dentales (Melo, 2020).

Las biopelículas son la principal etiología de diversas infecciones bacterianas como; endocarditis, fibrosis quística, rinosinusitis, osteomielitis, heridas crónicas que no cicatrizan, meningitis, infecciones renales, caries dental, periodontitis, infecciones relacionadas con prótesis y en dispositivos biomédicos como implantes dentales. A continuación, se mencionan algunas bacterias de importancia médica y odontológica que participan en los diversos procesos infecciosos antes mencionados.

2.1.1 Bacterias aerobias

Escherichia coli (*E. coli*)

Descrito por primera vez por Theodor Escherich en 1885 (Lim et al., 2010), es un bacilo Gram negativo facultativo con un tamaño promedio de 1 a 2 μm que se encuentra de manera habitual en el intestino de los seres humanos y otros mamíferos (**Figura 3A**). Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* han desarrollado la capacidad de provocar enfermedades gastrointestinales, como la diarrea del viajero (*E. coli* enterotoxigénica) (Nataro & Kaper, 1998), colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (*E. coli* enterohemorrágica) (Vila Estapé & Zboromyrska, 2012), diarrea persistente (*E. coli* enteroagregante) (Nataro & Kaper, 1998) y la diarrea acuosa del lactante (*E. coli* enteropatógena) (Ochoa & Contreras, 2011). Otras cepas de *E. coli*, pueden causar infecciones extraintestinales, como infecciones del tracto urinario y meningitis (Kaper et al., 2004).

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*)

Esta especie Gram negativa es considerada un patógeno oportunista multirresistente, presenta una morfología de bacilo y un tamaño que oscila entre los 1.5 a 3 μm (**Figura 3B**). Históricamente, *P. aeruginosa* ha llamado la atención debido a la coloración azul verdosa característica producida durante su cultivo. En 1850, Sédillot fue el primero en observar que la decoloración en las heridas estaba asociado a un agente “transferible” y en 1882 este patógeno fue aislado por primera vez en un cultivo puro por Carle Gessard, quien publicó la investigación "*On the Blue and Green Coloration of Bandages*" que significa sobre la coloración azul y verde de los vendajes. En su publicación mencionaron sobre del crecimiento de este microorganismo a partir de heridas cutáneas de dos pacientes con abscesos de coloración verde azulado (Gessard, 1984).

P. aeruginosa es el agente causal de infecciones agudas y crónicas en individuos inmunodeprimidos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, cáncer, traumatismos, quemaduras, sepsis y neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV), incluidas las causadas por COVID-19 (Behzadi et al., 2021; Qin et al., 2022). Además, los tratamientos de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* son complejos debido a sus rápidas mutaciones y adaptación para ser resistente a los antibióticos, siendo uno de los patógenos que encabezan la lista de causantes de infecciones hospitalarias (Lister et al., 2009).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*)

Esta especie bacteriana presenta una morfología esférica o de cocos en forma de racimos con un tamaño que oscila entre los 0.5 a 1.5 μm . Es una bacteria Gram positiva que afecta principalmente piel y mucosas (**Figura 3C**). El género *Staphylococcus* fue descrito por primera vez en 1880, por el cirujano escocés Sir Alexander Ogston quien

describió a estos microorganismos provenientes de un absceso en una articulación de rodilla, mencionando la característica formación de "racimos de uvas". En 1884 el médico alemán Friedrich Julius Rosenbach diferenció las bacterias por el color de sus colonias; *Staphylococcus aureus* (del latín aurum, oro) y *Staphylococcus albus* (del latín, blanco). Posteriormente, *Staphylococcus albus* pasó a llamarse *Staphylococcus epidermidis* debido a su presencia sobre la piel (Licitra, 2013; Lyell, 1989).

Las principales infecciones asociadas con *S. aureus* son; foliculitis (afectación del folículo pilosebáceo), forúnculos (foliculitis más infección del tejido circundante), ántrax (varios forúnculos confluentes), paroniquia, perionixis estafilocócica (infección del tejido blando que rodea las uñas), celulitis, heridas infectadas, e incluso bacteremias a partir de alguno de los focos primarios que favorecen la diseminación y originan procesos secundarios a distancia (Tong et al., 2015). En estadios de mayor gravedad debido a diseminación por contigüidad o por vía sanguínea tras una bacteriemia, los pacientes pueden desarrollar; sinusitis, mastoiditis, osteomielitis, artritis, endocarditis, neumonías, abscesos renales o cerebrales (Harris et al., 2002; Tong et al., 2015; Ureña, 2002).

Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*)

Esta especie bacteriana es Gram positiva, presenta una morfología de cocos en forma de racimos y un tamaño promedio de 0.5 a 1.5 μm (**Figura 3D**). La historia de su descubrimiento y año de aislamiento coincide con el de *S. aureus* (Licitra, 2013; Lyell, 1989).

Anteriormente sólo se consideraba un microorganismo comensal inocuo presente en la piel humana. Sin embargo, con el paso de los años y en la actualidad *S. epidermidis*, es considerado un patógeno oportunista relacionado con múltiples infecciones nosocomiales (Otto, 2009). Cabe mencionar que, al ser uno de los principales microorganismos que se encuentra de manera habitual en la piel de los seres humanos, puede contaminar los dispositivos médicos al ser colocado en el interior del cuerpo y formar

una biopelícula causante de un proceso infeccioso extremadamente difíciles de tratar (Costerton et al., 1999; Uçkay et al., 2009). A pesar de que las infecciones por *S. epidermidis* rara vez se convierten en enfermedades potencialmente mortales, su frecuencia en padecimientos como endocarditis, infecciones en catéteres, osteomielitis, bacteriemias, y otras infecciones asociadas a dispositivos médicos, representan una grave carga para el sistema de salud pública (Otto, 2009; Ureña, 2002).

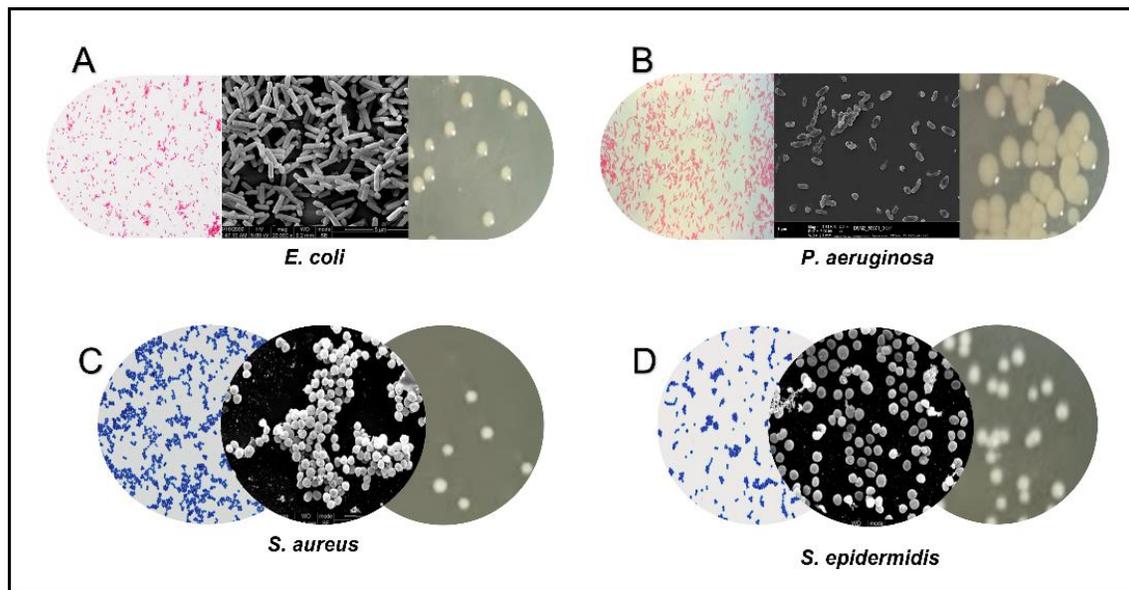


Figura 3. Imagen de cuatro bacterias aerobias. A. *Escherichia coli*, B. *Pseudomonas aeruginosa*, C. *Staphylococcus aureus*, D. *Staphylococcus epidermidis*. En cada figura se aprecia su tipo de morfología (bacilo o coco) y de izquierda a derecha su tinción Gram, micrografía obtenida por SEM y crecimiento de colonias en agar (Zhou & Li, 2015b).

2.1.2 Bacterias anaerobias

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*)

Bacteria Gram negativa, anaerobia con morfología de bacilo y un tamaño que oscila entre 1 a 3.5 μm . Anteriormente era denominada *Bacteroides gingivalis* antes de su reclasificación como nuevo género, “*Porphyromonas*” (Slots & Listgarten, 1988). La etimología de *Porphyromonas* procede del griego “porphyreos” que significa púrpura, y del

sustantivo griego “monas” que significa unidad, esto es debido a que las colonias en placas de agar sangre se vuelven negras al cabo de 6 a 10 días (Shah & Collins, 1988).

Actualmente, *P. gingivalis* es considerado uno de los principales agentes etiológicos de las enfermedades periodontales (Hajishengallis et al., 2012). Se encuentra presente en la cavidad oral, específicamente en el surco subgingival y también se encuentra presente en abscesos periodontales, los cuales conllevan a la afección de los tejidos de soporte de los dientes (Kah Yan How et al., 2016; Mysak et al., 2014; Tsai et al., 2018).

Al localizarse principalmente en el surco subgingival, para su supervivencia, depende de la fermentación de aminoácidos para la producción de energía, una propiedad necesaria para su supervivencia en la bolsa periodontal profunda, donde la disponibilidad de azúcar es baja (Bostanci & Belibasakis, 2012). Otra información relevante es que forma parte del complejo rojo (en el que se encuentran las especies reconocidas como patógenos periodontales) descritos por Socransky (Socransky & Haffajee, 2005) y por tanto, forma parte de la etiología de la enfermedad periodontal (K. Y. How et al., 2016).

Streptococcus mutans (S. mutans)

Esta bacteria oral presenta morfología de coco, con tamaño que oscila entre 0.5 y 1 µm, es Gram positivo y anaerobio facultativo. Se localiza en la cavidad oral, orofaringe e intestino (Lemos et al., 2019; Loesche, 1986; Ureña, 2002). En 1924, J. Clarke fue el primero en aislar un microorganismo obtenido de una lesión cariosa y lo denominó *Streptococcus mutans*, porque pensaba que las células ovaladas observadas eran formas mutantes de otros “estreptococos” descritos anteriormente (Clarke, 1924). Sin embargo, hasta finales de 1950 fue cuando *S. mutans* recibió una mayor atención por parte de la comunidad científica y a mediados de 1960, fue reconocido como uno de los principales agentes etiológicos de la caries dental (Loesche, 1986). *S. mutans*, es una de las bacterias productoras de ácido láctico y de los patógenos principales en la progresión de la caries

(Becker et al., 2002; Lemos et al., 2019). Se puede clasificar en cuatro serotipos denominados: c, e, f y k en función de la composición química de los polisacáridos específicos de cada serotipo; el ~75% de las cepas aisladas de la biopelícula dental pertenecen al serotipo “c”, el ~20% al serotipo “e” y el 5% restante pertenece a los serotipos “f” o “k”. Siendo el serotipo “k” el que se relaciona con una mayor incidencia en la endocarditis bacteriana, debido a la resistencia a la fagocitosis que presentan estas cepas (Nakano & Ooshima, 2009).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotipo b (A. a. b)

Esta especie bacteriana presenta morfología de bacilo, con un tamaño promedio de 0.5 a 1.5 μm , es Gram negativa, no móvil y anaerobia facultativa. Coloniza la cavidad oral humana y se encuentra estrechamente asociada a la etiología de la enfermedad periodontal (Nørskov-Lauritsen et al., 2019). Históricamente, en 1912 Kingler describe por primera vez a este microorganismo como *Bacterium actinomycetem comitans* el cual fue obtenido a partir de lesiones actinomicóticas humanas (Klinger, 1912). Años más tarde, en 1937 fue renombrada como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* por Topley & Wilson (Topley & Wilson, 1937). Es importante mencionar que su relación con la enfermedad periodontal, fue descrita durante la expansión de la microbiología oral en 1976, donde se le asoció por primera vez con la enfermedad periodontal en los adolescentes (Newman et al., 1976; SLOTS, 1976). Posteriormente, en 1985 su nomenclatura cambió a *Haemophilus actinomycetemcomitans* (Potts et al., 1986), y nuevamente en el año 2006 se le asignó el nombre con el que se le conoce actualmente; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que fue incorporado como un nuevo género bacteriano “*Aggregatibacter*” (Nørskov-Lauritsen & Kilian, 2006). De *A. actinomycetemcomitans*, se han identificado hasta el momento seis serotipos (del a al f), los cuales están asociados a infecciones humanas como endocarditis bacteriana, abscesos en la glándula tiroides, infección urinaria y como se mencionó

anteriormente en la patogénesis de la enfermedad periodontal (Nørskov-Lauritsen et al., 2019; Zambon et al., 1983).

Actinomyces israelii (*A. israelii*)

Esta especie bacteriana posee una morfología de bacilo, tiene un tamaño promedio de 0.4 a 1.0 μm , es anaerobia y es clasificada como Gram positiva. Históricamente en 1878, el cirujano Alemán James Adolf Israel fue el primero en aislar esta bacteria y fue denominada como *Streptothrix israelii*. Años más tarde en 1896, Walther Kruse, bacteriólogo alemán, propuso el nombre de *Actinomyces israelii* para el actinomiceto anaerobio (Knöner & Schultheiss, 2003). Sus principales sitios de colonización son la cavidad oral, amígdalas, intestino humano y el aparato reproductor femenino. (Slack et al., 1969). Con respecto a su participación en la ecología de la biopelícula dental el género *Actinomyces* es considerado un colonizador temprano de la biopelícula dental y por ende su presencia es considerada benéfica en los individuos con salud periodontal (Socransky & Haffajee, 2005; Socransky et al., 1998), esto último ha sido corroborado mediante el análisis de secuenciación 16S, en el que el género *Actinomyces* fue identificado en grandes proporciones en los individuos con un periodonto sano (Tsai et al., 2018). Sin embargo, esta especie al igual que otras especies del género *Actinomyces* de manera extraoral, pueden desencadenar procesos infecciosos oculares, auditivos, en la piel, así como actinomicosis (infección crónica supurativa) pulmonar y abdominal (Vielkind et al., 2015; Wolff et al., 2022). En la **Figura 4** se presentan las cuatro bacterias anaerobias mencionadas previamente, donde se puede observar su tinción de Gram, el tipo de morfología en una micrografía de SEM, así como su crecimiento en agar.

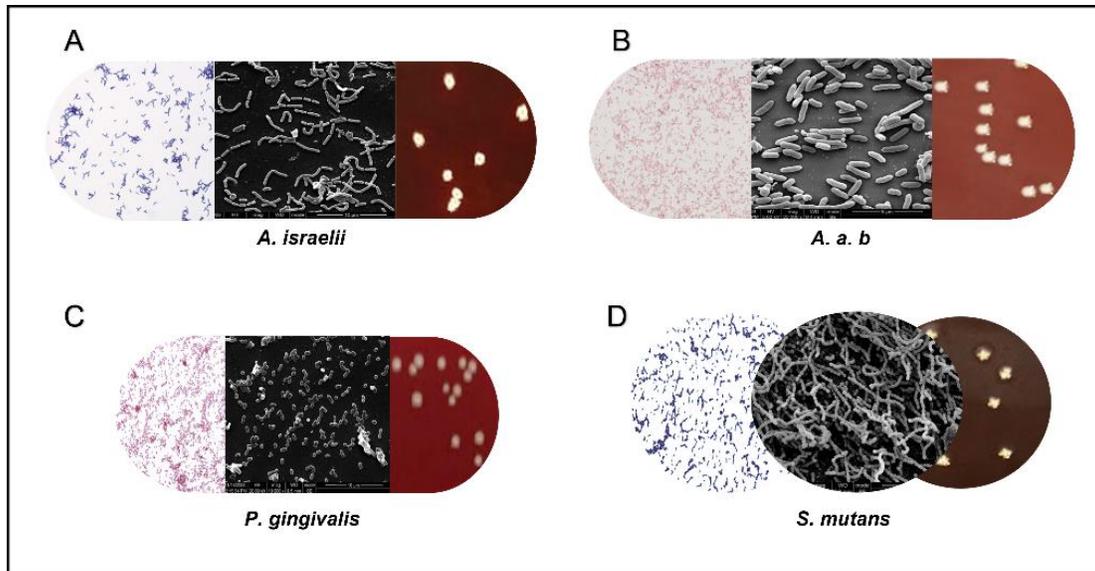


Figura 4. Imagen de cuatro bacterias anaerobias. A. *Actinomyces israelii*, B. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b, C. *Porphyromonas gingivalis*, D. *Streptococcus mutans*. En cada figura se aprecia su tipo de morfología (bacilo o coco) y de izquierda a derecha su tinción Gram, micrografía obtenida por SEM y crecimiento en colonias en agar (Zhou & Li, 2015a).

2.2 Virus de importancia médica y odontológica

Las infecciones virales han sido descritas desde los antiguos griegos como plagas de origen desconocido, o eventos que estaban relacionados con castigos divinos. Fue hasta finales del siglo XIX que se estableció que las enfermedades infecciosas estaban asociadas a diferentes agentes patógenos microbianos como bacterias y los denominados “virus” palabra derivada del latín que significa veneno (Taylor, 2014).

Un virus es un agente infeccioso de tamaño nanométrico que sólo puede replicarse dentro de una célula huésped y pueden infectar a diversos organismos, como bacterias, plantas y animales. Cabe mencionar que un virión (partícula vírica) está conformado por un ácido nucleico (DNA o RNA), una cubierta proteica denominada cápside, y algunos virus están rodeados por una membrana llamada envoltura. Los genomas virales son muy diversos, ya que pueden ser de DNA o RNA, monocatenarios o bicatenarios, lineales o circulares, y variar en longitud (Nature-education, 2014).

El ciclo replicativo de los virus involucra desde el inicio de la infección hasta la liberación de viriones maduros. De manera general el ciclo replicativo se divide en las etapas de a) **adhesión**; la cual consiste en la unión de la proteína viral con los receptores de la membrana celular del huésped. b) **Entrada y desnudamiento**; donde el virus inyecta su ácido nucleico en el citoplasma de la célula huésped. c) **Replicación del genoma**; como su nombre lo indica el ácido nucleico del virus utiliza la maquinaria de la célula huésped para replicar, transcribir su código genético y traducirlo en proteínas víricas. d) **Ensamblaje**; una vez sintetizadas suficientes proteínas víricas, se forman los nuevos viriones (nuevas partículas víricas) en el núcleo o citoplasma dependiendo el tipo de virus y célula huésped. e) **Maduración y liberación**; al tener demasiadas partículas víricas la célula, éstas son liberadas por lisis celular (lizando a la célula huésped), por gemación (sin dañar la célula huésped). Al ser liberados los nuevos viriones pueden infectar nuevas células huésped. Aunque dependiendo del tipos de virus y célula huésped, puede variar el ciclo replicativo (Cann, 2008).

Por otro lado, las infecciones virales pueden comprometer numerosos procesos celulares, como la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, el mantenimiento de organelos como el citoesqueleto y la integridad de la membrana (Chappell & Dermody, 2015). Por tal motivo, diversos virus son capaces de inducir a la muerte celular o denominada apoptosis de las células huésped y en algunos mamíferos como los seres humanos pueden causar enfermedades como gripe, varicela, sida, COVID-19, entre otras.

2.2.1 Bacteriófagos

Los bacteriófagos o también llamados “fagos” son virus que exclusivamente infectan células bacterianas o arqueas (Calendar & Abedon, 2006). Como todos los virus, están constituidos por una cubierta proteica o cápside que protege su ácido nucleico que puede ser de DNA o RNA, monocatenario o bicatenario.

Históricamente, los bacteriófagos fueron descubiertos en 1915 por William Twort, y en 1917 fueron descritos por Felix d'Herelle quien describió que este organismo tenía el potencial de matar bacterias y por ende los denominó como “bacteriófagos” o devoradores de bacterias. A partir de este potencial antibacteriano entre 1920 a 1930 d'Herelle y otros investigadores se enfocaron en analizar las características estructurales y bioquímicas de estos bacteriófagos. Sin embargo, con el descubrimiento de los antibióticos en 1940 fueron discontinuadas las investigaciones con bacteriófagos en Estados Unidos y Europa a excepción de la Unión Soviética quienes continuaron la investigación, hasta la actualidad (Chanishvili, 2012; Clokie et al., 2011).

Las morfologías y familias de los fagos son altamente variables, con tamaños de cápsides que oscilan entre 20 y 200 nm (**Figura 5**) y longitudes de genomas que van desde ~2.4 a 540 kb. Los fagos se pueden clasificar como: virus con DNA o RNA bicatenario (dsDNA, dsRNA) y DNA o RNA monocatenario (ssDNA, ssRNA). La mayoría de los fagos tienen cola que varían de forma y tamaño entre los diferentes grupos y el resto son fagos denominados cúbicos, filamentosos o pleomórficos. El término "cúbico" denota simetría cúbica y forma icosaédrica u octaédricas y pueden estar elongadas. Algunos tipos pueden o no contener envolturas lipídicas (Ackermann, 2009).

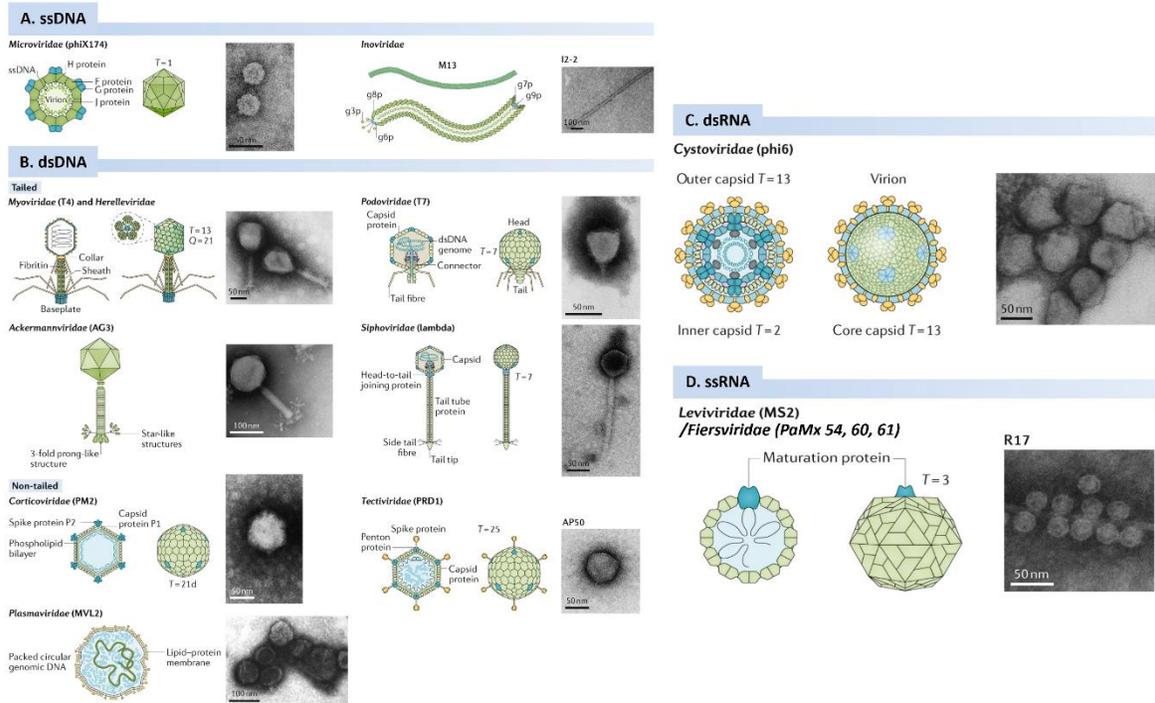


Figura 5. Clasificación de los fagos basada en la morfología y el tipo de genoma, así como la representación de sus respectivas microfografías electrónicas. A. Fagos de ssDNA, B. Fagos de dsDNA, C. Fagos de dsRNA, D. Fagos de ssRNA. Figura adaptada de Dion 2020 (Dion et al., 2020).

Al igual que en los virus que infectan células eucariotas. Existen dos tipos de ciclos replicativos en los bacteriófagos: el primero se denomina “ciclo lítico” en el cual, los fagos infectan, se replican y lisan a su bacteria huésped, es decir conllevan a la muerte bacteriana (Abedon, 2008). El segundo tipo de ciclo replicativo es el “ciclo lisogénico”, aquí el genoma de los fagos se integra en el genoma de la célula huésped o permanecen como plásmidos dentro de la bacteria estableciendo una relación simbiótica; es decir pueden convivir con la bacteria e incluso pueden causarle cambios fenotípicos. Cabe mencionar que el ciclo lisogénico puede ser estable durante generaciones bacterianas, hasta que este entra en un ciclo lítico para formar nueva progenie tras la lisis de la bacteria huésped (Clokic et al., 2011).

Con respecto a los bacteriófagos presentes en la cavidad oral, se sabe que éstos pueden estar en armonía o lisogenia con sus células huésped y los fagos que se han identificado principalmente pertenecen al orden *Caudovirales*, (fagos con cola y genoma de DNA de doble cadena) (Pinto et al., 2016). En el 2011, se demostró que los fagos Aabφ01 y Aabφ01-1 tienen la capacidad de controlar la progresión de la enfermedad periodontal afectando principalmente al patógeno periodontal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Castillo-Ruiz et al., 2011). Lo que confirma los estudios que sostienen que los fagos juegan un papel importante en la ecología oral (Novik et al., 2017; Steier et al., 2019).

2.2.2 Bacteriófagos como subrogantes virales

El estudio de agentes infecciosos como los virus es imprescindible para mejorar la calidad de vida presente y futura. Una limitación para realizar estudios antivirales es el alto riesgo para el personal de laboratorio que manipula virus de naturaleza altamente infecciosa, esto aunado al bajo número de laboratorios que cuentan con el nivel de bioseguridad 3 (BSL-3) para manipular virus que infectan células humanas.

Una de las alternativas para optimizar los ensayos y acelerar conocimientos de virología es mediante el uso de virus subrogantes o (sustitutos). Por ejemplo, el Instituto Robert Koch, la asociación alemana registrada para la lucha contra las enfermedades víricas y la Sociedad Alemana de Higiene y Microbiología, han aprobado el uso del virus de la diarrea viral bovina (DVB) como subrogante o sustituto del virus de la hepatitis C (VHC) (Kampf et al., 2007). Además, otras instituciones internacionales como la sociedad estadounidense para pruebas y materiales (ASTM, American Society for Testing and Materials por sus siglas en inglés), han aceptado el uso de subrogantes virales para acelerar y complementar el conocimiento sobre diversos agentes virales infecciosos que no pueden probarse en laboratorios de nivel de bioseguridad 2 (BSL-2) (ASTM, 2020).

Aunado a ello, en los últimos años se ha incrementado el uso de subrogantes virales debido a la crisis de salud mundial ocasionada por el SARS-CoV-2 causante de la pandemia COVID-19, con la finalidad de buscar nuevas alternativas para el control, prevención, diagnóstico y tratamiento de este agente infeccioso (Shahin et al., 2022). A continuación, se mencionan algunas de las principales familias de bacteriófagos que han sido aceptadas para ser utilizadas como subrogantes de virus respiratorios.

Fiersviridae anteriormente llamado *Leviviridae* (ssRNA)

Esta familia de virus se consideran subrogantes de virus como el H1N1 y el H5N1 (Coulliette et al., 2014), SARS-CoV-2 (Fedorenko et al., 2020), virus entéricos humanos como el enterovirus D68 (Kim et al., 2017), Norovirus (NoV) (Dawson et al., 2005) y del virus respiratorio sincitial (RSV). Además, esta familia viral se caracteriza por su RNA monocatenario, los cuales infectan a sus objetivos huéspedes a través de la adsorción inicial del virión a lo largo de los pili bacterianos utilizando una proteína de unión de receptor, la cual induce a la liberación del RNA del fago en la bacteria huésped. Sus principales huéspedes pueden ser *Enterobacterias*, *Pseudomonas* y *Escherichia coli* (Callanan et al., 2018).

Microvirus (ssDNA)

Esta familia de bacteriófagos, son considerados subrogantes de los *Adenovirus*, son viriones que carecen de envoltura, poseen un DNA circular y están provistos de 12 capsómeros en forma de perilla. Se han aislado fagos de este tipo contra diversos hospedadores, como enterobacterias, *Bdellovibrio*, *Chlamydia* y *Spiroplasma* (Shirasaki et al., 2016). Finalmente, en la literatura se encuentran descritos diversos tipos de bacteriófagos que han sido utilizados en ensayos antivirales por la relación y similitudes morfológicas de los virus originales de estudio, que representen un alto riesgo su manipulación como se muestran en la **Figura 6**.

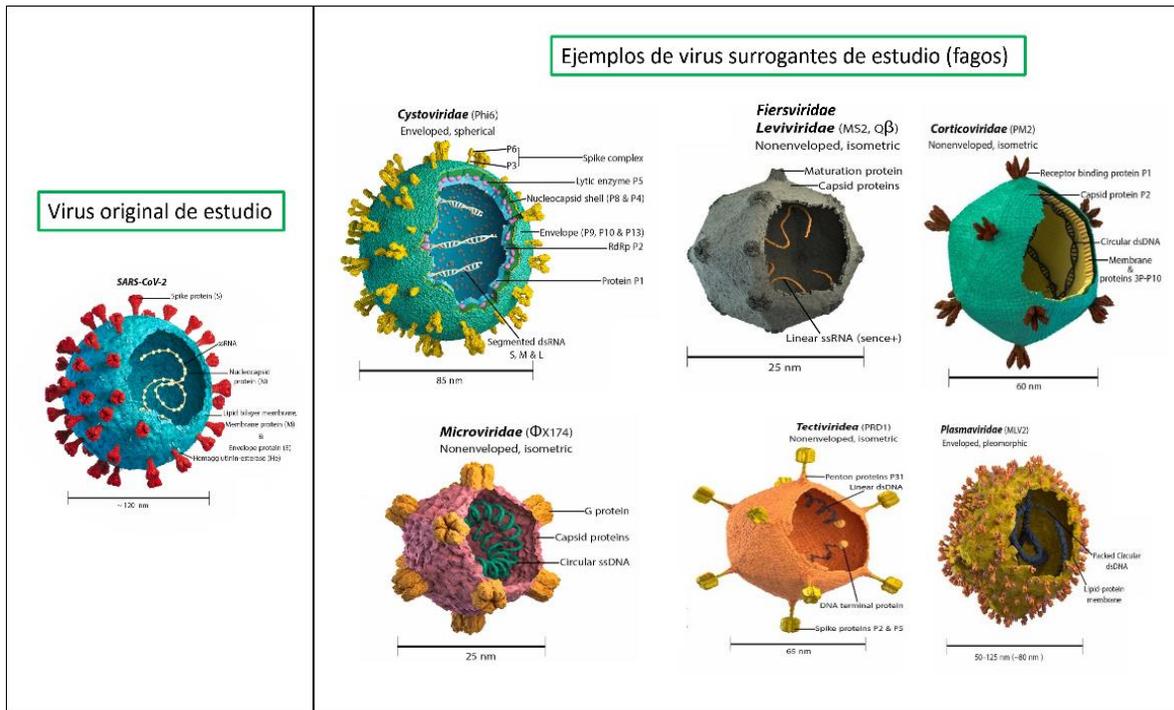


Figura 6. Ejemplos de bacteriófagos como virus subrogantes. Del lado izquierdo se aprecia el virus original de estudio y del lado derecho se observan ejemplos de bacteriófagos sin cola como los fagos *Cystoviridae*, *Fiersviridae* (antes *Leviviridae*), *Corticoviridae*, *Microviridae*, *Tectiviridae* y *Plasmaviridae*. Se muestran características morfológicas, el tipo de material genético, tamaño y ejemplos de cada fago. Figura adaptada de Shahin et al., 2022 (Shahin et al., 2022).

3. NANOMATERIALES CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS

Una de las alternativas actuales para prevenir la transmisión de diversas enfermedades infecciosas es mediante la nanotecnología y el uso de nanomateriales (Nasrollahzadeh et al., 2020; Palmieri et al., 2021; Taylor & Webster, 2011). Se denominan nanomateriales a aquellas estructuras que, en al menos una dimensión, miden menos de 100 nm, lo que les brinda diferentes propiedades fisicoquímicas en comparación al mismo material a escalas mayores (bulto), debido a que la relación superficie-volumen se incrementa exponencialmente con la disminución del tamaño (de la Cruz & Gadd, 2012; Kattan, 2011). Dependiendo de sus dimensiones pueden denominarse como;

nanorecubrimientos (una dimensión menor a 100 nm), nanotubos (dos dimensiones menores a 100 nm) y nanopartículas (tres dimensiones menores a 100 nm) (**Figura 7**).

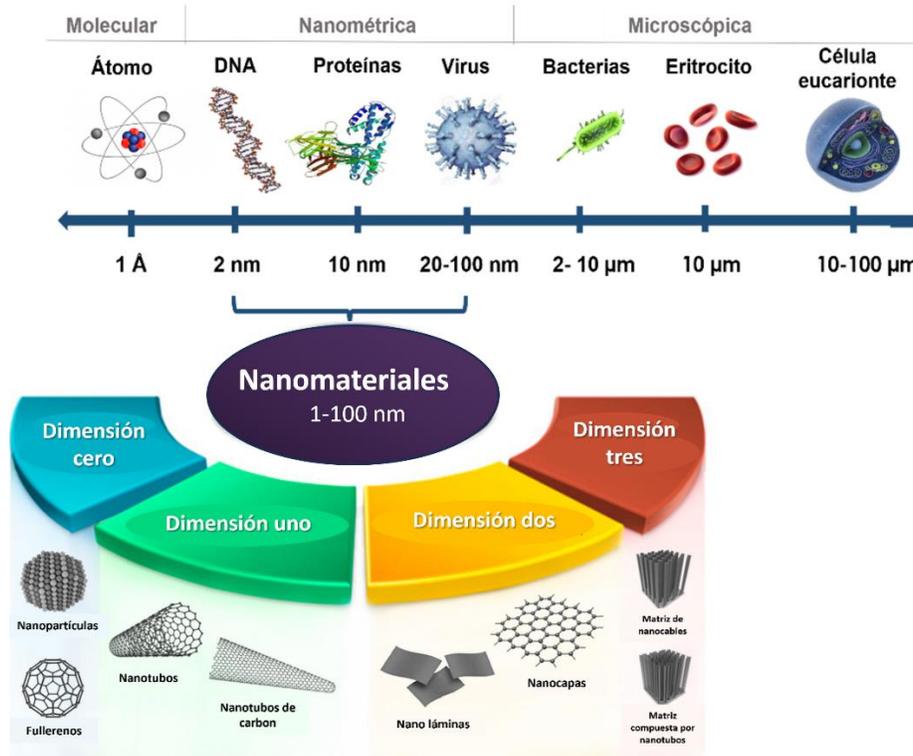


Figura 7. Representación de estructuras biológicas a diferentes escalas y clasificación de nanomateriales con base en sus dimensiones. Figura adaptada de (Joudeh & Linke, 2022).

3.1 Metales antimicrobianos

3.1.1 Plata (Ag)

La plata (Ag), es un metal noble de color blanco brillante, dúctil y maleable. Cristalográficamente presenta una estructura cristalina cúbica centrada en las caras "FCC". Es considerado uno de los materiales más estudiados por sus propiedades biológicas, por ejemplo; antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerígenas entre otras (Sánchez-López et al., 2020; Yin et al., 2020). Los nanomateriales de Ag presentan múltiples propiedades fisicoquímicas para ser utilizarlos en diversas aplicaciones; como uso

ambiental (tratamiento de agua) (Soliman et al., 2020), imagenología (Caro et al., 2010), entre otros. En el área médica han destacado sus propiedades antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas, antibacterianas, entre otras (Sánchez-López et al., 2020; Sim et al., 2018; Yin et al., 2020; Zhang et al., 2016). Por tal motivo los nanomateriales de Ag han cobrado alta relevancia en la actualidad convirtiéndose en una alternativa o mejora de diversos métodos de diagnóstico y tratamiento (Zhang et al., 2016).

3.1.2 Cobre (Cu)

El cobre (Cu) es un metal de transición de color marrón rojizo, dúctil, maleable, que ha sido identificado como uno de los mejores conductores eléctricos (después de la Ag) por lo cual es utilizado en equipos electrónicos. Al igual que la Ag, posee una estructura cristalina cúbica centrada a las caras "FCC". Otra de sus propiedades más relevantes es su capacidad como agente antibacteriano y antiviral por medio de un mecanismo denominado "contact killing" (Dollwet, 1985) que conduce a la muerte bacteriana o viral al poco tiempo de contacto con este material (Chatterjee et al., 2014; Mathews et al., 2015; Vincent et al., 2018). El Cu tiene la capacidad de inactivar diversos virus como el SARS-CoV-2 en contraste con otros materiales como el acero inoxidable, cartón o plástico, donde el virus puede permanecer viable hasta por 5 días (Van Doremalen et al., 2020). Además, se ha descrito que el Cu en tamaño nanométrico, tiene la capacidad de inhibir a los virus y bacterias mediante diversos mecanismos como la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), que afectan membranas virales y bacterianas (Chatterjee et al., 2014; Jagaran & Singh, 2020).

3.1.3 Aleación plata-cobre (Ag-Cu)

La combinación bimetálica de AgCu tiene las ventajas de aumentar su resistencia a la oxidación, ser más estable y potenciar el efecto antimicrobiano (Valdez-Salas et al., 2021), en comparación con ambos materiales de forma independiente. Recientemente,

como antecedentes de este proyecto de doctorado, se demostró la eficiencia de un nanorecubrimiento de AgCu (registrado como: SakCu®) depositado en ambas caras de un textil de polipropileno (PP), que suele utilizarse como material de filtración en los EPP, incluidos los cubrebocas N95. Los resultados mostraron que esta nanocapa de AgCu tiene propiedades virucidas contra el virus SARS-CoV-2 y bactericidas contra bacterias patógenas asociadas a la neumonía y no fue citotóxica para fibroblastos ni queratinocitos humanos (Bello-Lopez et al., 2021).

3.2 Óxidos metálicos antimicrobianos

Los óxidos metálicos como el óxido de zinc (ZnO) y el dióxido de titanio (TiO₂) también son eficaces agentes antibacterianos (Emami-Karvani & Chehrazi, 2012; Lipovsky et al., 2011; Pasquet, Chevalier, Couval, et al., 2014) y antivirales (Ghaffari et al., 2019; Prakash et al., 2022; Sportelli et al., 2022).

3.2.1 Óxido de zinc (ZnO)

El ZnO es un polvo blanco insoluble en agua, semiconductor, de estructura cristalina hexagonal, utilizado en el área biomédica para prevenir o tratar enfermedades tópicas o sistémicas debido a sus propiedades antimicrobianas (Pasquet, Chevalier, Couval, et al., 2014). En dimensiones nanométricas y a medida que disminuye el tamaño de partícula, las propiedades antibacterianas del ZnO se ven potencializadas y se ha demostrado que reducen el crecimiento de diversas bacterias patógenas (Álvarez-Chimal et al., 2022; Khan et al., 2013; Prado-Prone et al., 2018; Prado-Prone et al., 2023) y virus (Ghaffari et al., 2019; Sportelli et al., 2022), sin exceder los límites de citotoxicidad. Adicionalmente, los nanomateriales de ZnO son ampliamente utilizados en tratamientos dermatológicos (protector solar), y odontológicos como adhesivos dentales (Álvarez-Chimal et al., 2024), materiales dentales de restauración temporales y permanentes, entre otros (Kumar et al., 2017; Pushpalatha et al., 2022).

3.2.2 Dióxido de titanio (TiO_2)

El dióxido de titanio (TiO_2) es un compuesto de color blanco que presenta tres fases cristalinas; brookita (estructura ortorrómbica), anatasa (estructura tetragonal) y rutilo (estructura tetragonal) (Bickley et al., 1991). Este compuesto absorbe la radiación electromagnética ultravioleta-visible y puede afectar a los microorganismos a través de un proceso fotocatalítico, y además presenta baja citotoxicidad para las células humanas (Jafari et al., 2020; Liou & Chang, 2012). Los nanomateriales sintetizados a base de TiO_2 , se han considerado como otra alternativa de agentes antimicrobianos debido a sus propiedades fotocatalíticas que actúan oxidando especies químicas adsorbidas en su superficie bajo irradiación de luz ultravioleta (UV), produciendo radicales libres altamente oxidantes que tienen acción bactericida y antiviral. También, posee propiedades fisicoquímicas estables, no tóxicas, es económico y de segura manipulación. Por lo que podría ser utilizado para recubrir diversas superficies en hospitales actuando como desinfectante de las mismas (Prakash et al., 2022).

3.3 Recubrimientos nanométricos

Los recubrimientos nanométricos, son películas delgadas (menores a 100 nm de espesor) compuestas de uno o varios materiales (metales, óxidos metálicos, polímeros, entre otros) depositadas sobre un sustrato, los cuales le confieren diversas propiedades en su superficie (Abdel-Karim & Waheed, 2013). Actualmente, existen diversas metodologías o técnicas de depósito tanto físicas como químicas para sintetizar o depositar recubrimientos nanoestructurados. Entre los métodos de depósito físico están las técnicas de pulverización catódica (sputtering), evaporación física, ablación láser, entre otras. Mientras que las técnicas de depósito químico son la síntesis electroquímica, sol-gel, depósito químico en fase de vapor (CVD), entre otras, como se muestra en la **Figura 8** (Luther et al., 2004).

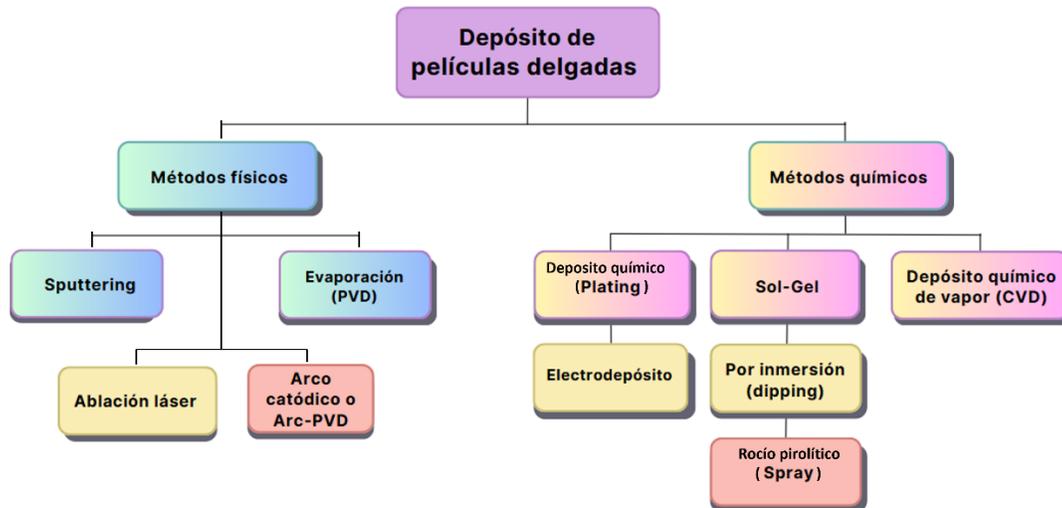


Figura 8. Algunas de las metodologías físicas y químicas utilizadas para el depósito de películas delgadas.

En este proyecto se utilizó la técnica magnetrón sputtering, para depositar recubrimientos nanométricos y se describe a continuación.

3.3.1 Magnetron sputtering

Magnetron sputtering es una técnica para depositar películas delgadas a través de un plasma que es generado dentro de una cámara de vacío que contiene el sustrato a recubrir y el blanco del material que se va a depositar. Esta técnica permite el depósito de materiales como metales, aleaciones y compuestos a diversos espesores (Swann, 1988).

Este proceso físico consiste en la colisión entre especies del plasma (iones de argón) y los blancos del material que se va a depositar. La especie incidente sufre una colisión con los átomos del blanco al que transmite parte del momento, que a su vez colisiona con otros átomos del blanco para formar un proceso en cascada. Durante esta

cascada, algunos átomos cercanos a la superficie adquieren la energía suficiente para moverse hacia el exterior y son “evaporados” fuera del blanco.

Propiamente la pulverización o evaporación catódica o magnetron sputtering aumenta la densidad del plasma introduciendo un campo magnético en la superficie del cátodo del blanco y utilizando las restricciones del campo magnético sobre las especies cargadas para aumentar la velocidad de erosión (Feng, 2018). Cabe mencionar que se utiliza un gas inerte, como el argón, que se ioniza en el entorno de vacío y cuando los iones de argón colisionan con el cátodo, desprenden átomos de material que son depositadas en el sustrato como se aprecia en la **Figura 9** (Kelly & Arnell, 2000).

Sus principales ventajas frente a otras técnicas de depósito son; altas tasas de depósito, facilidad de evaporar catódicamente a una gran variedad de aleaciones o compuestos, películas de gran pureza, alta adherencia de las películas, excelente cobertura de escalones y excelente uniformidad en sustratos (Swann, 1988). Respecto a sus limitaciones, se encuentran el alto costo del equipo y los efectos de calentamiento del sustrato (Kelly & Arnell, 2000).

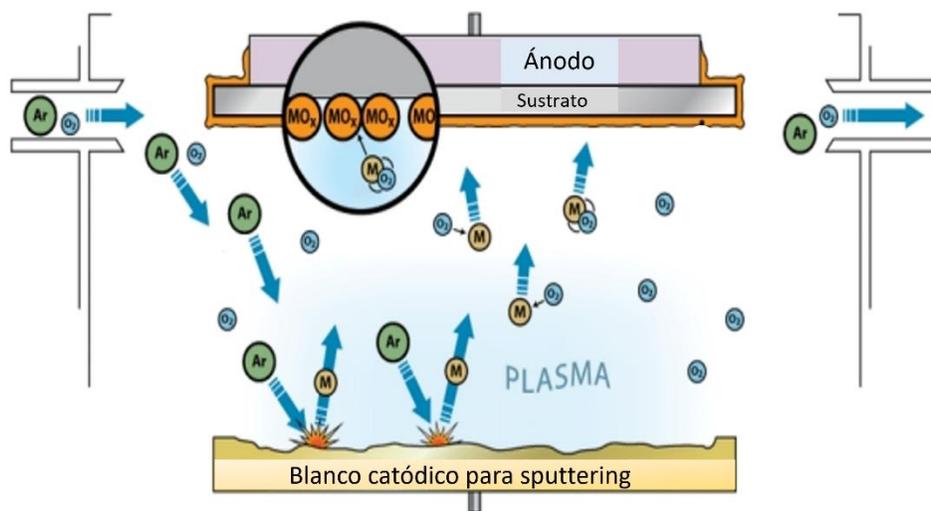


Figura 9. Representación del principio de la técnica de depósito de magnetron sputtering
(Alca Technology: Magnetron Sputtering, 2019).

3.4 *Técnicas de caracterización de nanorecubrimientos*

A continuación, se describen las técnicas de caracterización fisicoquímica de los nanorecubrimientos utilizadas en el presente proyecto.

3.4.1 *Microscopía óptica*

Una de las técnicas más utilizadas en el área científica es la microscopía óptica, la cual utiliza luz visible y un sistema compuesto por lentes que permiten observar las muestras con una mayor amplificación y resolución que el ojo humano (Di Gianfrancesco, 2017).

Históricamente, en 1665 Robert Hooke diseñó un microscopio de dos lentes, y publicó su obra "*Micrographia*", donde aparece por primera vez el término "célula". Años más tarde, Antonie van Leeuwenhoek construyó un microscopio de una sola lente y descubrió microorganismos a los que llamó "animálculos", siendo lo que actualmente conocemos como; bacterias, protozoos y espermatozoides (Araki, 2017). Posteriormente, en 1857 Abbe y Schott, fabricaron un microscopio que alcanzaba una resolución espacial de 0.2 μm y su modelo de microscopio contribuyó significativamente a los descubrimientos posteriores en biología. Sin embargo, debido a la naturaleza ondulatoria de la luz, la resolución espacial de un microscopio ordinario está limitada a 0.2 μm (Araki, 2017). Los componentes principales que conforman a un microscopio óptico son oculares, objetivos, platina, fuente de luz, condensador con diafragma, base y brazo. En la **Figura 10** se puede apreciar el fundamento y diseño de los actuales microscopios ópticos.

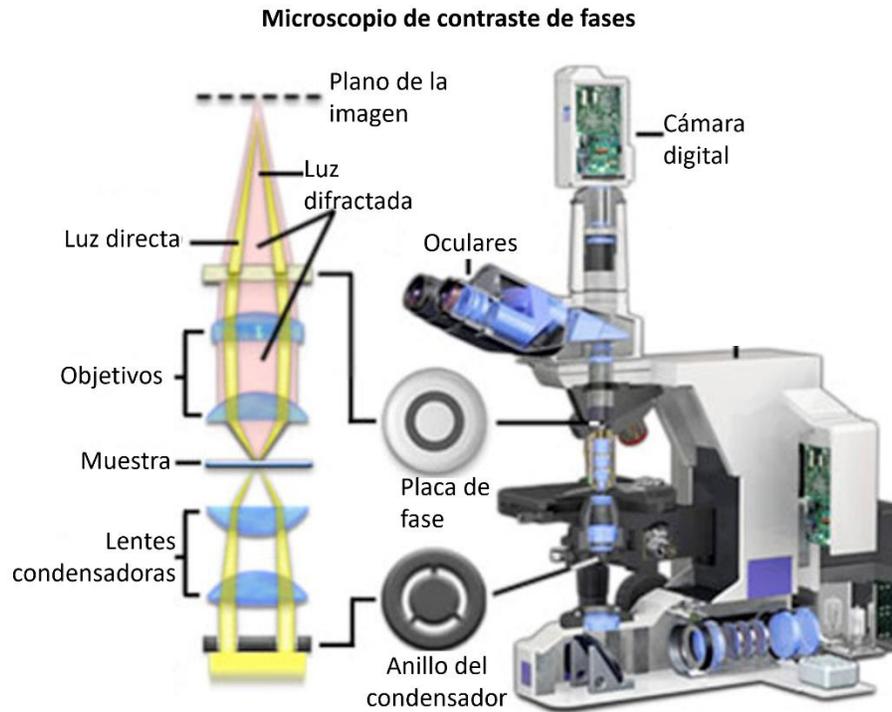


Figura 10. Esquema de un tipo de microscopía óptica. Del lado izquierdo se aprecia como la luz atraviesa los diferentes lentes y aditamentos. Mientras que del lado derecho representa el diseño actual de los microscopios ópticos (Di Gianfrancesco, 2017).

3.4.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy, por sus siglas en inglés), es considerada una de las herramientas más versátiles y utilizadas para la observación a una alta resolución de diversos tipos de materiales y/o muestras biológicas (Zhou et al., 2007). El microscopio electrónico de barrido utiliza electrones acelerados lo cual le otorga la capacidad de tener resoluciones de hasta 0.5 nm en tecnologías de emisión de campo y de 3 a 4 nm en tecnologías de emisión termoiónica (Mancera & Amaya, 2006).

Haciendo un breve resumen de la historia de la microscopía electrónica, el desarrollo de lo que actualmente se conoce como SEM, ha sido el fruto del trabajo de diversos científicos e investigaciones (McMullan, 1995). En 1923, Luis De Broglie propuso la hipótesis de la “dualidad onda-partícula”, en la que afirmó que las partículas, como

electrones y protones, tienen propiedades tanto de partículas como de ondas (Aspect & Villain, 2017). Años más tarde en 1931 Erns Ruska, construyó el primer microscopio electrónico conocido actualmente como TEM (Transmission Electron Microscopy por sus siglas en inglés) y posteriormente el primer equipo de SEM, con lo cual fue reconocido con el Premio Nobel de Física en 1986 (Ruska, 1987). Posteriormente en 1942, los científicos Zworykin, Hillier y Sniyder, desarrollaron un microscopio que trabajaba con lentes electrostáticas, sin embargo, no lograron comercializarlo debido a la Segunda Guerra Mundial. Y fue hasta el año de 1965, cuando los microscopios electrónicos de barrido se empezaron a comercializar y a utilizar a mayor escala en diversas áreas como la industria y la investigación (Mancera & Amaya, 2006).

El principio de esta técnica consiste en el uso de un haz de electrones acelerados de alta energía, los cuales son emitidos de la fuente de electrones del microscopio para llegar a la superficie de la muestra. Posteriormente los detectores identifican las señales de los electrones secundarios, emitidos a partir de la muestra y estos últimos proporcionarán la información relacionada con la muestra, como; topografía, morfología, homogeneidad, orientación de los granos (Akhtar et al., 2018). Por esta razón, la microscopía electrónica de barrido ha sido y continúa siendo una de las técnicas más utilizadas en la investigación para la caracterización de materiales y nanomateriales. En la **Figura 11** se muestran los componentes principales del SEM y diseño de los equipos actuales.

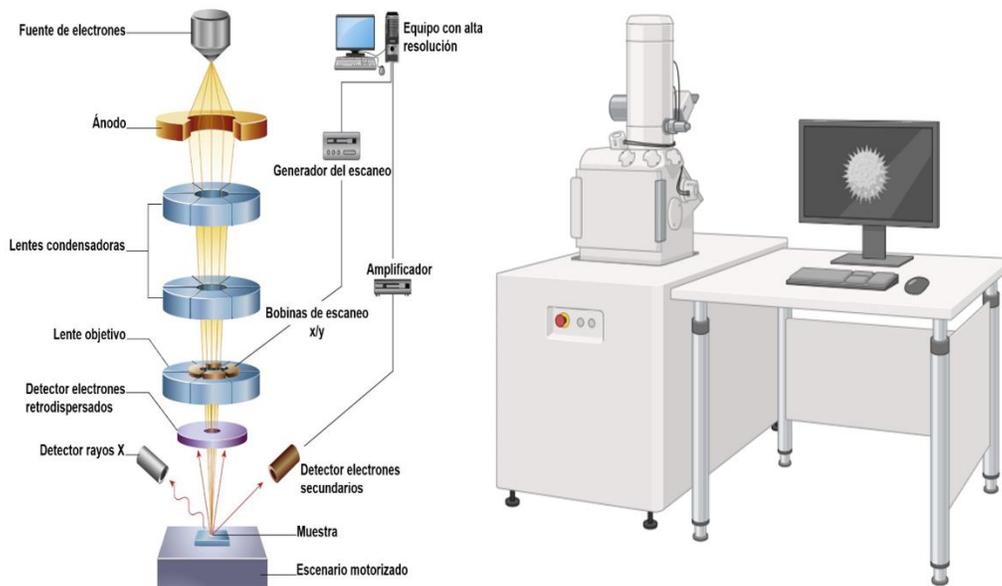


Figura 11. Esquema representativo de la Microscopía electrónica de barrido. Del lado izquierdo se aprecian los componentes de un equipo de microscopía electrónica de barrido (Inkson, 2016) y del lado derecho el diseño actual de los equipos de SEM (figura creada con Biorender).

3.4.3 Espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS)

Esta técnica analítica también conocida como EDS o EDXS por sus siglas en inglés Energy Dispersive X-ray Spectrometry o también llamada EDX por sus siglas en inglés Energy Dispersive X-ray, se encuentra acoplada de manera tradicional a un microscopio electrónico (ya sea SEM o TEM).

El detector del equipo de EDS, permite identificar la composición elemental de manera semicualitativa de una muestra, con una alta resolución espacial de ~ 10 nm (Mancera & Amaya, 2006). Este método de detección elemental semicuantitativo se basa en la identificación de rayos X característicos que provienen de la muestra inducidos por la irradiación de la muestra con un haz de electrones, los cuales son mapeados, dando como resultado información de la presencia y concentración de los elementos presentes en la muestra (**Figura 12**).

El principio teórico, consiste en que el haz de electrones incidente ioniza a los átomos de la muestra a través de la expulsión de electrones de valencia. Posteriormente, cuando se produce la ionización en las capas internas de electrones, un electrón de un orbital de electrones de mayor energía llenará la vacante creada (**Figura 12 A**), y la radiación electromagnética liberada será aproximadamente igual al excedente de las energías de enlace de los electrones y corresponde a la región energética de rayos X. Una vez detectados los rayos X característicos de cada elemento, se proporcionará una huella elemental semicuantitativa (**Figura 12 B y C**) (Pirozzi et al., 2021).

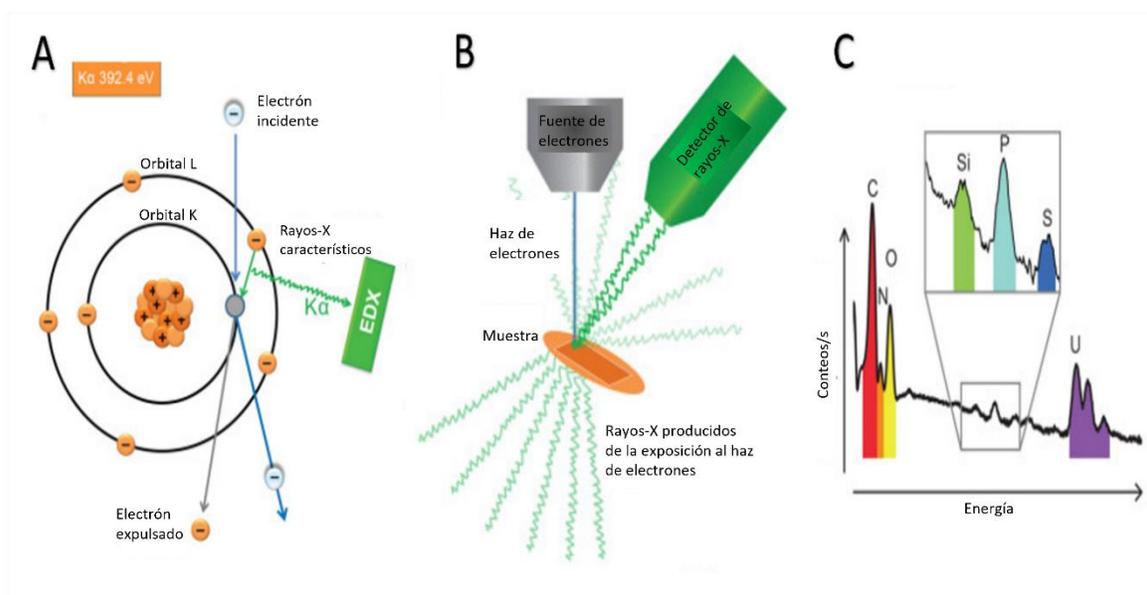


Figura 12. Principio de la técnica EDS. A. Representación del principio teórico de EDS. **B.** Detector de rayos X y **C.** Espectro ejemplo de la huella elemental semicuantitativa de EDS (Pirozzi et al., 2021).

3.4.4 Espectroscopía de fotoelectrones (XPS)

La espectroscopía de fotoelectrones de rayos X, conocida como “XPS” por sus siglas en inglés (X-ray Photoelectron Spectroscopy), es una técnica analítica cuya finalidad

es identificar la composición química de la superficie de una muestra. Consiste en irradiar una muestra con rayos X de alta energía, lo que provocará la emisión de electrones de los átomos de la superficie, lo que hará posible determinar su composición química (Aziz & Ismail, 2017).

Históricamente el efecto fotoeléctrico fue descrito por primera vez por Heinrich Hertz en 1887, quien observó que se emitían electrones de las superficies al irradiarlas con luz. Posteriormente en 1905, Albert Einstein describió el concepto con mayor profundidad y recibió el Premio Nobel de Física en 1921. Mientras que, la primera aplicación de la fotoemisión como método de análisis fue presentada por Steinhardt y Serfass en 1951 (Steinhardt & Serfass, 1951). Años más tarde, en la década de los 60s, el físico Kai Siegbahn (Premio Nobel de Física en 1981) de la Universidad de Uppsala, Suecia, realizó investigaciones que contribuyeron al desarrollo exitoso de la técnica XPS y David Turner, un científico de la empresa Perkin-Elmer, fue quien fabricó uno de los primeros espectrómetros de fotoelectrones comerciales basados en rayos X. Esta técnica se considera una herramienta esencial en la caracterización de superficies y materiales en una amplia variedad de campos científicos e industriales (Stevie & Donley, 2020).

El principio de esta técnica consiste en bombardear una muestra con rayos X, de alta energía, generando la emisión de electrones de su superficie. Estos electrones emitidos o "fotoelectrones" tienen energías específicas relacionadas con los tipos de átomos presentes y su estado químico, en cada material. Cuando se miden esas energías, se pueden identificar todos los elementos presentes en la muestra (excepto el H y el He) y también se puede obtener una proporción semi-cuantitativa de los mismos, como se aprecia en la **Figura 13**. Esta técnica es ampliamente utilizada para analizar el tipo de elementos, composición química, entorno molecular y la estructura electrónica de las superficies de los materiales (Aziz & Ismail, 2017; Fadley, 2010).

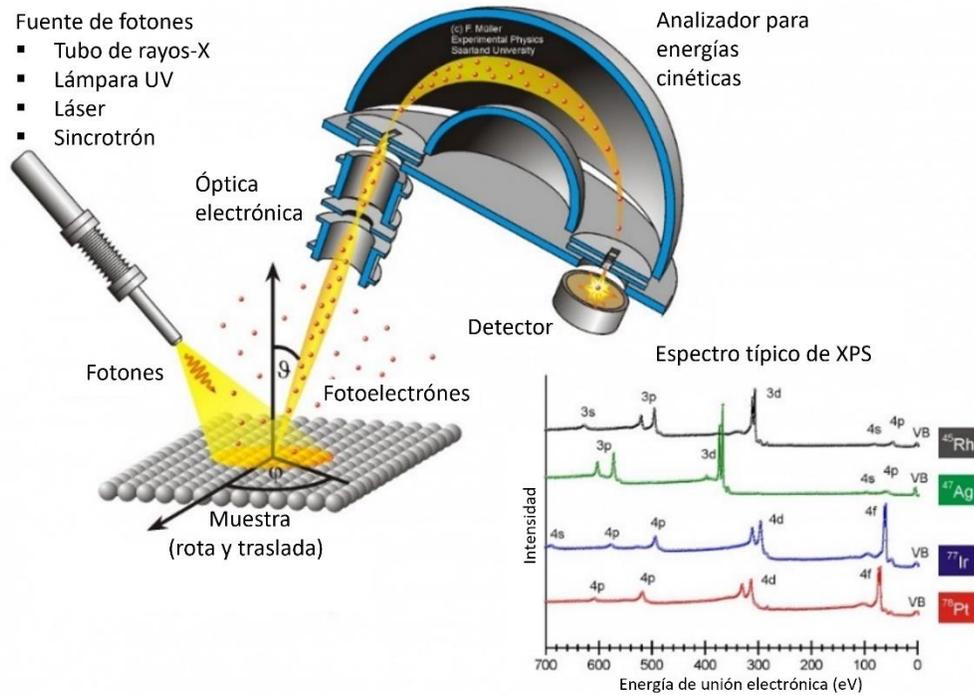


Figura 13. Representación del principio del XPS. Con fuente de fotones, óptica de electrones, un analizador de energía y un detector. También se muestran los espectros XPS de cuatro metales (Figura de la Universität des Saarlandes, Alemania).

3.4.5 Ángulo de contacto (WCA)

Esta técnica enfocada en la medición del ángulo de contacto (WCA, water contact angle, por sus siglas en inglés), se realiza estableciendo la tangente de una gota líquida con una superficie sólida en la base y determinando que se forma entre la tangente y la superficie sólida bajo la gota. La finalidad de utilizar los ángulos de contacto θ , es para estimar las tensiones entre sólido-vapor y sólido-líquido (Kwok & Neumann, 1999). Históricamente, la posibilidad de estimar las tensiones superficiales sólidas a partir de los ángulos de contacto se basa en una relación que fue reconocida por Young en 1805. En la que se menciona que el ángulo de contacto de una gota líquida sobre una superficie sólida se define por el equilibrio mecánico de la gota bajo la acción de tres tensiones interfaciales denominado con la siguiente ecuación:

$$\gamma_{lv} \cos \theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl}$$

donde: γ_{sv} , es la tensión superficial sólido-vapor, γ_{sl} , es es la tensión interfacial sólido-líquido y γ_{lv} , es la tensión interfacial líquido-vapor.

Esta relación de equilibrio se conoce como ecuación de Young (Kwok & Neumann, 1999). Una vez calculando los resultados y en función de este ángulo de contacto de los sustratos sólidos, para un fluido dado, pueden comportarse como hidrofílicos ($0^\circ \leq 90^\circ$) hidrofóbicos ($90^\circ \leq 150^\circ$) o superhidrofóbicos ($150^\circ \leq 180^\circ$) (Khandekar et al., 2010), **figura 14 A y B.**

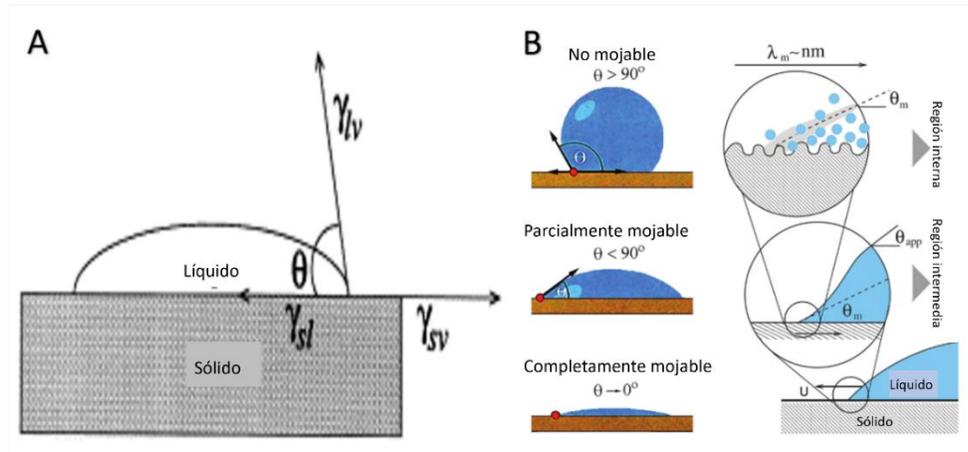


Figura 14. A. Representación de un sistema de ángulo de contacto de gota sésil y la relación de equilibrio (Kwok & Neumann, 1999). **B.** Clasificación de mojabilidad de acuerdo con los grados de la angulación (Khandekar et al., 2010).

3.4.6 Perfilometría óptica

Esta técnica permite medir el espesor de una película delgada y la rugosidad de una muestra. Se basa en la proyección de luz en la superficie de un objeto y la captura de la luz reflejada para calcular la altura o profundidad de diferentes puntos en la superficie.

En esta técnica la iluminación mediante luz es clave en la interacción con la superficie, ya que la captura de imágenes permite el análisis de profundidad y altura, en

función de cómo la luz se refleja o difunde desde diferentes puntos de la superficie. Esto proporciona información detallada sobre la topografía tridimensional de la superficie bajo inspección.

Históricamente la perfilometría óptica se basa en los fundamentos de la óptica del siglo XVIII. Sin embargo, fue en el siglo XX (1980-1990), con el avance tecnológico y digital, que se destacó esta técnica como método para analizar superficies debido a la precisión con la que permite realizar un análisis topográfico. A diferencia de la perfilometría mecánica, esta técnica es utilizada para medir superficies que no son accesibles en los perfilómetros mecánicos (Visscher & Struik, 1994).

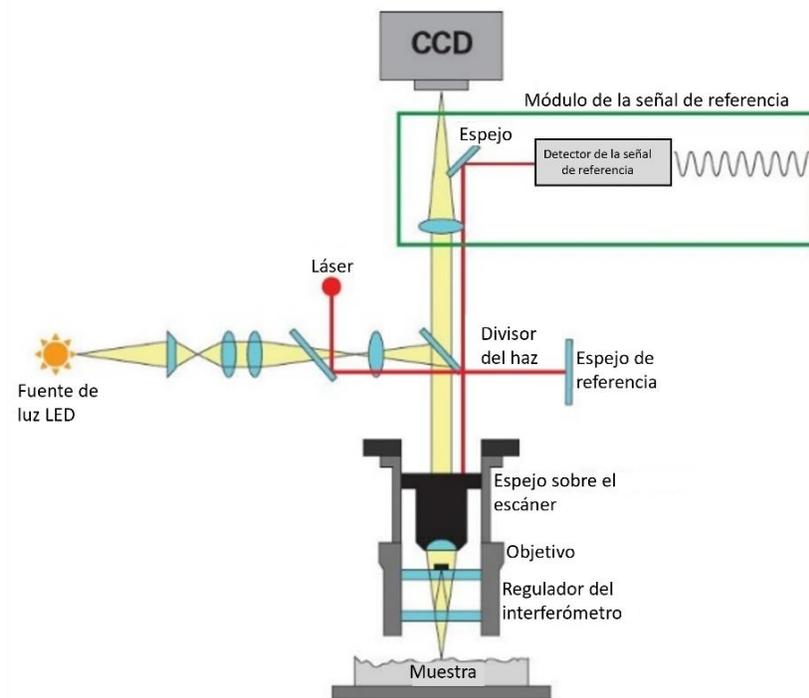


Figura 15. Representación del principio de la perfilometría óptica (Adaptado de Bruker).

3.4.7 Plasma Acoplado Inductivamente (ICP)

La técnica de plasma acoplado inductivamente (ICP) por sus siglas en inglés “Inductively coupled plasma” es una técnica analítica para analizar de manera cualitativa y diferentes tipos de muestras (Hou et al., 2016). En esta técnica se utiliza argón para crear un plasma que desestructura las muestras en átomos excitados que posteriormente regresan a su estado fundamental (**Figura 16**). Es decir; la muestra se ioniza en el plasma y los iones emiten luz a diferentes longitudes de onda características, las cuales son detectadas y analizadas (Mermet, 2006).

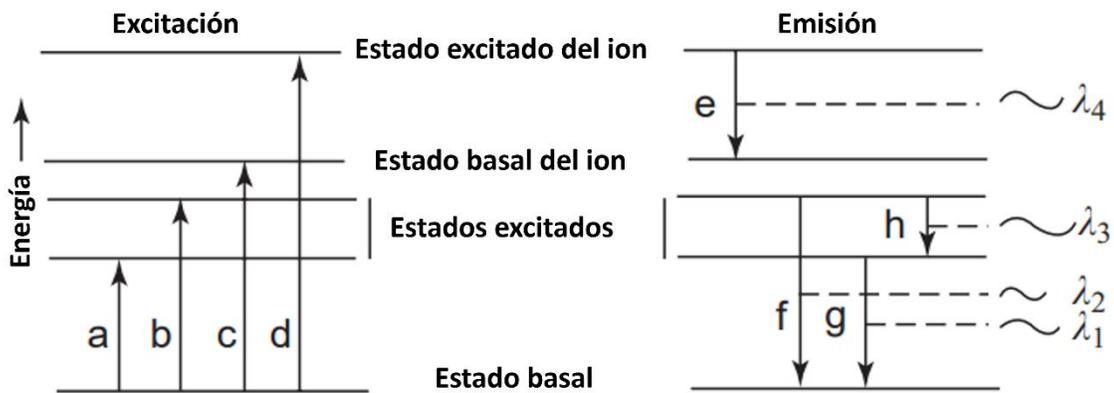


Figura 16. Representación de la configuración electrónica en términos de niveles de energía. Las flechas representan las transiciones permitidas por absorción y excitación (ascendente) o radiación y emisión de fotones (descendente). A y b) representan excitación, c) ionización, d) es ionización más excitación, e) es emisión de iones, f, g y h) son emisiones de átomos (Twyman, 2005).

Los equipos ICP, están compuestos por campos magnéticos de radiofrecuencia (RF) inducidos por una bobina de cobre refrigerada alrededor de un tubo de cuarzo a altas temperaturas. En la **Figura 17** se muestra el sistema de un equipo ICP.

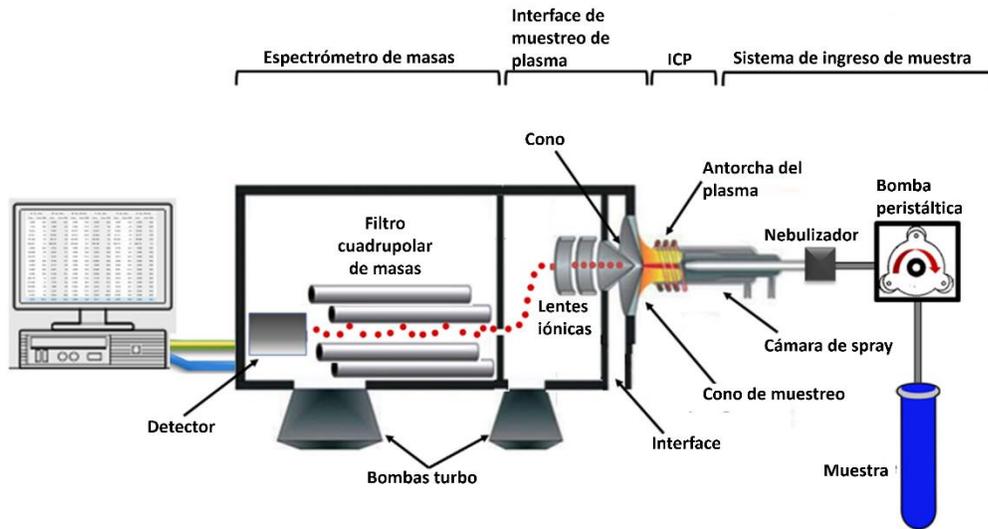


Figura 17. Representación del principio del ICP (Mazarakioti et al., 2022).

4. EFICIENCIA DE FILTRADO CON PARTÍCULAS DE NaCl

Uno de los métodos para evaluar la eficiencia de filtrado de distintos materiales es llevando a cabo una cuantificación del número de partículas de diversos tamaños que logran pasar a través de la muestra. Uno de los métodos actuales para cuantificar partículas es utilizando un sistema “CPC” (por sus siglas en inglés Condensation Particle Counter setup) basado en la propuesta de Drenwick et al, en 2021. La cual consiste en un generador de partículas de NaCl de diferentes tamaños, dos contadores ópticos de partículas (OPC, por sus siglas en inglés Optical Particle Counter), un impactador de partículas herméticamente sellado (donde se coloca la muestra o el textil), y una bomba mecánica para mantener el flujo de aire. Este sistema se adapta dentro de una campana apagada para mantener esas partículas en ese espacio (**Figura 18**).

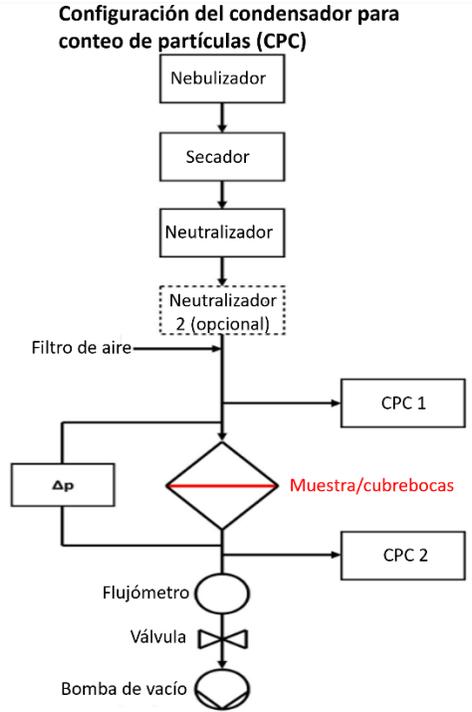


Figura 18. Esquema representativo del equipo CPC para filtrar partículas de NaCl y su cuantificación (Drewnick et al., 2021).

El procedimiento de esta técnica consiste en generar un aerosol del NaCl, el cual una parte pasa a través de la muestra o el material a evaluar (parte filtrada) y otra se queda suspendida en la campana (parte externa) y en ambos casos, se coloca un contador de partículas óptico), es decir, dentro de la campana, mientras que el otro contador óptico cuenta las partículas que pasan a través del textil (Drewnick et al., 2021). Para el análisis de datos se utiliza la siguiente fórmula:

$$EF = 100 \times \left(1 - \frac{P_f}{P_{air}}\right)$$

donde, P_f es el número promedio de partículas de un diámetro determinado que atraviesan el material, y P_{air} es el número de partículas detectadas dentro de la campana.

5. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

En este proyecto se llevaron a cabo ensayos antibacterianos y antivirales, para estudiar la inhibición o inactivación de las especies bacterianas y tipos de virus al interactuar con los nanorecubrimientos. A continuación, se describen los fundamentos de las técnicas utilizadas.

5.1 *Ensayos antibacterianos*

5.1.1 *Eficiencia de filtrado bacteriana (BFE)*

Esta metodología es utilizada para medir la eficacia de filtrado bacteriana (BFE) de los materiales con los que se elaboran los cubrebocas de uso médico. Este ensayo se basa en la Norma ASTM: F2101-01 "Standard test method for evaluating the bacterial filtration efficiency (BFE) of medical face mask materials, using a biological aerosol of *S. aureus*".

Es un método cuantitativo en el que la máxima eficacia de filtración que puede determinar este método es del 99.9 %. Esta metodología consiste en colocar la muestra (textil) entre un impactador de partículas y una cámara de aerosoles. El aerosol bacteriano se introduce en la cámara de aerosoles utilizando un equipo nebulizador y una suspensión de cultivo de *S. aureus*. Posteriormente, el aerosol se aspira a través de la muestra (textil) mediante una bomba de vacío acoplada al impactador de partículas que contiene placas de agar para recolectar las gotas generadas por el aerosol que atraviesan la muestra (textil) como se observa en la **Figura 19**. Se utilizan controles sin bacteria y sin la muestra experimental. Posteriormente las placas de agar se incuban por 48 h y se cuantifican las UFCs. Finalmente, la relación entre los controles y las muestras experimentales se registra como el porcentaje de eficacia de filtración bacteriana.

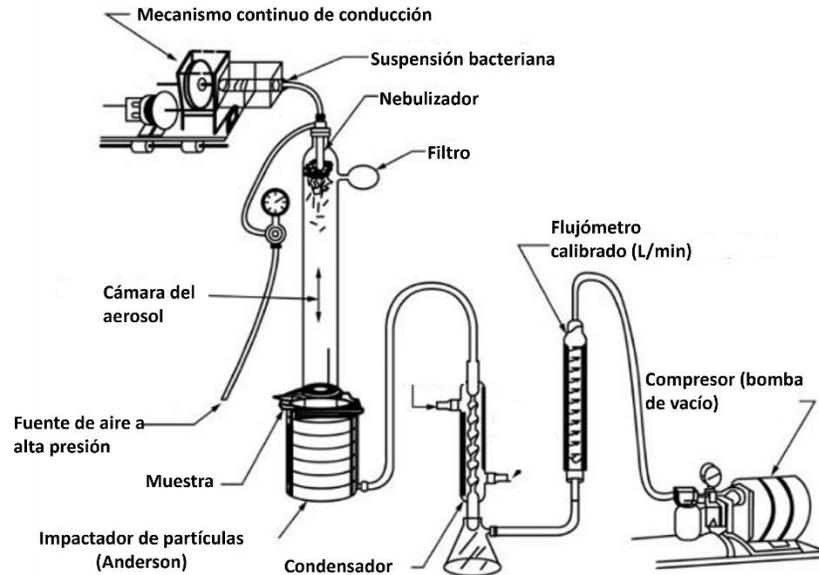


Figura 19. Representación del sistema generador de bioaerosoles tomando como referencia la Norma ASTM: F2101-01.

5.1.2 *Ensayo por contacto directo bacteriano (gota)*

Este ensayo microbiológico, se basa en la metodología denominada “diluciones seriadas y sembrado en placas de agar” o “técnica de recuento en placa” la cual es utilizada en microbiología para cuantificar la concentración de células microbianas presentes en una muestra líquida. Esta metodología consiste en la dilución progresiva de la muestra “stock” líquida, para reducir gradualmente la concentración de los microorganismos y poder realizar una cuantificación visual directa, ya sea por medio del sembrado en placas de agar, o por visualización de células bacterianas con un microscopio óptico, o utilizando una cámara de conteo Neubauer (Ben-David & Davidson, 2014; Sanders, 2012).

En el caso de la cuantificación visual directa en placas de agar, las diluciones seriales se llevan a cabo mediante la transferencia precisa de volúmenes conocidos de la muestra a volúmenes definidos de su respectivo medio líquido diluyente (normalmente en una relación 1 a 10 o 1 a 100). Posteriormente, las diluciones sucesivas son sembradas en placas de agar y son incubadas a temperaturas adecuadas para el crecimiento bacteriano.

Posterior al tiempo de incubación, es posible visualizar y cuantificar las UFCs presentes en la muestra stock y/o en sus respectivos sembrados de las diluciones. Finalmente, el cálculo final de la concentración microbiana implica considerar las diluciones aplicadas (número de dilución y volumen diluido) y número de colonias cuantificadas en las placas de agar. A pesar de que esta técnica sigue siendo de las más utilizadas en la actualidad, tiene la desventaja de requerir muchas placas con medio de cultivo, además de mucho tiempo de sembrados (**Figura 20 A**).

Una optimización a esta técnica ha sido el ensayo de sembrado por goteo como se muestra en la **Figura 20 B**. Siendo una metodología rápida, reproducible y según Corral-Lugo et al. 2012 es 10 veces más rápida en comparación con el método de cuantificación directa convencional, con la ventaja adicional del ahorro de material y medios de cultivo, disminuyendo la contaminación para el planeta (Corral-Lugo et al., 2012).

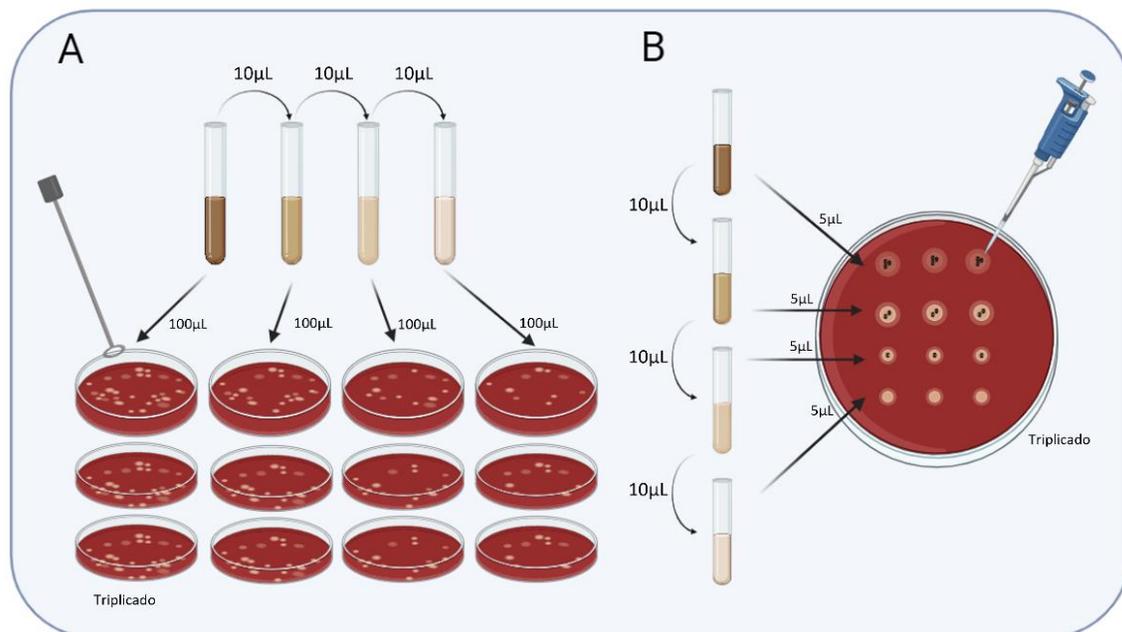


Figura 20. Representación de la metodología de sembrado convencional de UFCs (o CFUs) y de sembrado de gota. A. Diluciones seriadas y sembrado de cada dilución en una placa de Petri. **B.** Diluciones seriadas y sembrado en gota de cada dilución (Figura creada con Biorender.com).

5.2 Ensayos antivirales

5.2.1 Propagación de bacteriófagos

Para llevar a cabo las evaluaciones antivirales, se debe llevar a cabo la propagación de los bacteriófagos, mediante la técnica ensayo de doble placa de agar. Como su nombre lo indica, esta técnica consiste en utilizar dos capas de agar, la primera es una base sólida de agar, después se deposita una capa superior semisólida, siendo esta última donde se siembran las cepas huésped (o tapiz bacteriano) y posteriormente el subrogante viral (bacteriófago) capaz de infectar a la célula huésped y conducir a su replicación viral. Esta técnica permite el contacto del fago con la bacteria huésped y al infectarla aparecen zonas translúcidas o transparentes (placas líticas) que contienen partículas de fago y bacterias lisadas (da Silva et al., 2021) (**Figura 21**).

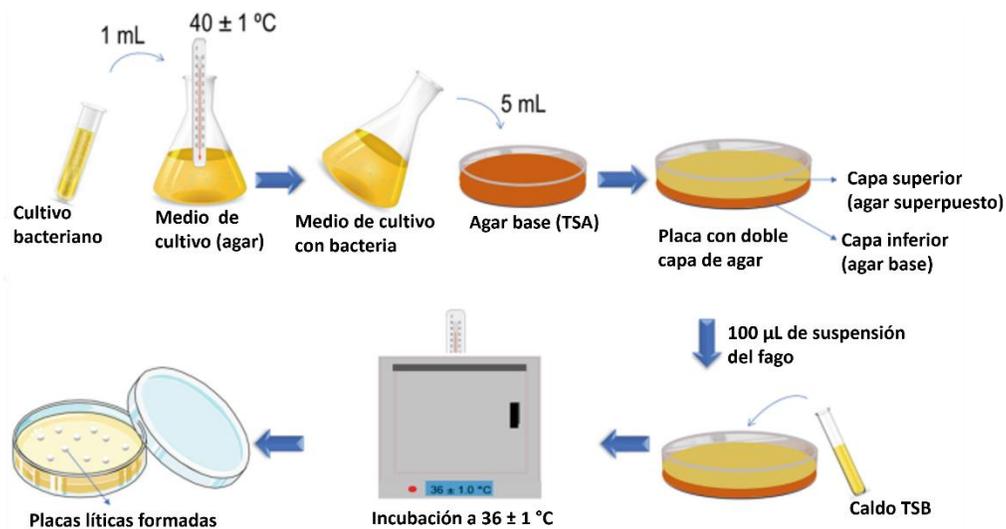


Figura 21. Figura esquemática que muestra la técnica de ensayo de doble placa de agar para la propagación de bacteriófagos (da Silva et al., 2021).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

A lo largo de los años, los EPP utilizados en medicina y odontología se han mejorado para evitar la transmisión de microorganismos y enfermedades infecciosas de manera cada vez más eficiente. Sin embargo, en algunos casos (como en la pandemia de COVID-19) las medidas para el control de infecciones han sido insuficientes debido a la capacidad infectiva de diversos microorganismos patógenos como bacterias nosocomiales y virus respiratorios. Por lo que cualquier medida que reduzca o evite la propagación de agentes infecciosos será altamente útil en nuestro país y a nivel mundial. Además, considerando que el uso de cubrebocas continuará siendo una herramienta indispensable y permanente para el personal médico y odontológico (Bar-On et al., 2020), se vuelve fundamental el desarrollo de nuevas estrategias de protección, así como el análisis de compuestos y materiales con capacidades antimicrobianas que puedan mejorar el control de infecciones y sobre todo proteger al personal de salud y a los propios pacientes de enfermedades infecciosas.

En este proyecto se propuso desarrollar un nanorecubrimiento metálico (AgCu) y dos nanorecubrimientos de óxidos metálicos (ZnO y TiO₂) para evaluar sus propiedades antibacterianas y antivirales. La ventaja de utilizar metales y óxidos metálicos en tamaños nanométricos para recubrir superficies de materiales como los usados en la fabricación de los EPP, es que tienen la capacidad de incrementar su actividad antibacteriana y antiviral sin exceder los límites de citotoxicidad (Hoseinzadeh et al., 2017; Lu et al., 2013). Los resultados obtenidos en esta investigación podrían impactar en el mejoramiento del control de infecciones en los consultorios dentales y médicos, mediante el uso de EPP (batas, gorros y cubrebocas) nanorecubiertas con propiedades antimicrobianas disminuyendo el riesgo de contagio y/o transmisión de agentes patógenos. Por consiguiente, en este proyecto de doctorado, se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Los nanorecubrimientos metálicos (AgCu) y de óxidos metálicos (ZnO y TiO₂), depositados sobre textiles de polipropileno, poseen capacidad antibacteriana y antiviral?

III. HIPÓTESIS

Los nanorecubrimientos metálicos y de óxidos metálicos depositados sobre textiles de polipropileno, presentan efecto antibacteriano y antiviral.

IV. OBJETIVOS

1. *Objetivo general*

Evaluar el efecto antibacteriano y antiviral de los nanorecubrimientos metálicos (AgCu) y de óxidos metálicos (ZnO y TiO₂) depositados sobre textiles de polipropileno.

2. *Objetivos específicos*

- a) Depositar nanorecubrimientos metálicos (AgCu) y de óxidos metálicos (TiO₂ y ZnO) sobre un textil de polipropileno mediante la técnica de magnetrón sputtering.
- b) Caracterizar los textiles nanorecubiertos mediante las técnicas de microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia por dispersión de energía de rayos X (EDS), espectroscopía de fotoelectrones (XPS), ángulo de contacto (WCA), Perfilometría óptica y plasma acoplado inductivamente (ICP).
- c) Determinar la eficiencia de filtrado con partículas de NaCl de los textiles de polipropileno con los nanorecubrimientos.
- d) Evaluar la efectividad de los nanorecubrimientos contra bioaerosoles bacterianos (utilizando bacterias aerobias y anaerobias) y virales (bacteriófagos).
- e) Evaluación antibacteriana y antiviral por contacto directo (gota) utilizando bacterias aerobias, anaerobias y virus (bacteriófagos).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

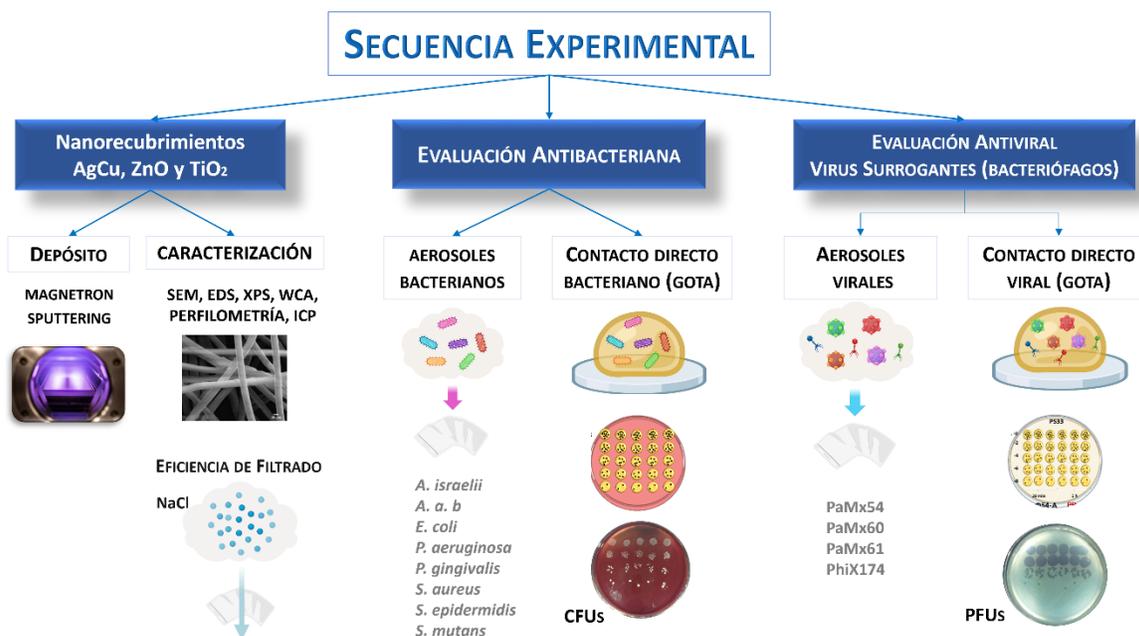


Figura 22. Secuencia experimental del proyecto (figura propia).

2. DEPÓSITO DE LOS NANORECUBRIMIENTOS

El depósito de los nanorecubrimientos se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM, UNAM) mediante la técnica de magnetron sputtering. Las condiciones del depósito de los nanorecubrimientos se muestran en la **Tabla 1**. Dentro de una cámara de vacío se adaptó un sistema con un rollo de polipropileno (PP) (Montblan corporation) de 70 g/m² (10.16 cm de diámetro y 18 cm de ancho) el cual pasaba por delante del blanco de sputtering a una distancia de 6 cm y a una velocidad de 6 rpm. El rollo de PP se colocó dentro de la cámara de vacío y al alcanzar una presión de 1.0×10^{-3} Pa se introdujo argón (Ar) para el nanorecubrimiento de AgCu, mientras que para los nanorecubrimientos de ZnO y TiO₂ se introdujeron Ar y oxígeno (O).

Tabla 1. Parámetros de depósito para los tres diferentes tipos de nanorecubrimientos que se llevaron a cabo.

Nanorecubrimiento/ Condiciones	AgCu	ZnO	TiO ₂
Sustrato	PP de 70 g/m ² (10.16 cm de diámetro y 18 cm de ancho)		
Presión	1.0 × 10 ⁻³ Pa		
Blanco	Blanco 50 at. % Ag - 50 at.% Cu (4", 99.99 % de pureza)	Blanco de ZnO	Blanco de Ti
Volumen	Argón (11 cm ³)	Argón (11 cm ³) + Oxígeno (2.0 cm ³)	Argón (8.0 cm ³) + Oxígeno (2.0 cm ³)
Radiofrecuencia (RF) del plasma	240 W	300 W	200 W
Tiempo del depósito	10 min (3 h de vacío previas)		
Referencias	(Bello-Lopez et al., 2021; Reyes- Carmona et al., 2023)	(Konstantinidis et al., 2007; Reyes- Carmona et al., 2024)	(Morquecho-Marín et al., 2020; Silva- Bermudez et al., 2017)

3. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANORECUBRIMIENTOS

Una vez sintetizados, los nanorecubrimientos fueron caracterizados utilizando las siguientes técnicas.

3.1 Microscopía óptica

Esta técnica se utilizó para observar si cambiaba la morfología de las fibras antes y después de los nanorecubrimientos. El equipo utilizado fue un (ECLIPSE Ni series de la marca Nikon), las muestras observadas fueron discos de PP de 1 cm de diámetro con y sin los nanorecubrimientos. Las mediciones del tamaño de las fibras del PP con y sin recubrir se realizaron con el software *ImageJ*.

3.2 *Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS)*

Con la finalidad de observar y confirmar la uniformidad de los nanorecubrimientos depositados sobre PP. Se observaron las muestras de PP recubiertas con AgCu. El equipo utilizado fue un SEM JEOL 7600F equipado con un detector para el análisis por EDS para identificar la composición elemental de los nanorecubrimientos de AgCu, se utilizaron las mismas muestras que se observaron en el SEM.

Cabe mencionar que no fue posible llevar a cabo el análisis con SEM ni EDS de las muestras de PP sin recubrir, ni las muestras de PP recubiertas con ZnO o TiO₂, debido a que el PP y los óxidos son aislantes y la carga de la superficie no permitieron obtener imágenes, ni espectros de EDS. Se intentó recubrir con carbono, pero no se lograron obtener las imágenes ni el análisis elemental. Únicamente fue posible para el nanorecubrimiento de AgCu ya que al ser un recubrimiento bimetálico y conductor se reduce la carga de electrones sobre la muestra del PP.

3.3 *Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)*

Con esta técnica fue posible complementar la información de la superficie y composición de los nanorecubrimientos. Para el análisis de superficie de los textiles de PP, PP+AgCu, PP+ZnO se utilizó el equipo de Microsonda PHI 5000 VersaProbe II en el IIM-UNAM. El análisis del textil de PP recubierto con TiO₂ se llevó a cabo en el Departamento de química de la Universidad de Bari (*Università degli Studi di Bari Aldo Moro*) en Bari, Italia. Se utilizó un espectrómetro PHI Versaprobe II. Se registraron barridos de sondeo en al menos tres puntos de las muestras para obtener el promedio de la composición química superficial. La escala de energía de enlace (BE) se calibró fijando el componente alifático de C1s en 284,8 eV. El procesamiento de los datos se realizó con el software ULVAC-PHI MultiPak (v.9.9.3) y OriginPro. Por lo que esta técnica fue utilizada para identificar la

composición de la superficie y sus estados de enlace de los tres tipos de nanorecubrimientos.

3.4 *Ángulo de contacto (WCA)*

Esta técnica fue empleada para evaluar la mojabilidad de los nanorecubrimientos depositados sobre PP y la muestra de PP sin recubrir, mediante el método estático de gota sésil. El equipo utilizado fue un goniómetro OCA 15EC (Dataphysics Company). Para realizar las mediciones, se colocó una gota de 4 μL de dd- H_2O sobre la superficie de los discos de PP de 1 cm de diámetro con y sin los nanorecubrimientos; las mediciones se realizaron por triplicado.

3.5 *Perfilometría óptica*

El análisis del espesor de los nanorecubrimientos se llevó a cabo utilizando un perfilómetro óptico Zygo. Para realizar estas mediciones se realizaron depósitos de los nanorecubrimientos en piezas de Si y/o PP. Después del depósito se llevó a cabo la medición del grosor de las muestras nanorecubiertas por triplicado.

3.6 *Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)*

Para identificar la concentración de iones metálicos liberados (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ti^{4+}) en agua y medio de cultivo a las 24 h, se siguió el protocolo de la norma ISO10993-12 “*Biological evaluation of medical devices*”. Se expusieron 6 cm^2/mL de los textiles de PP recubiertos con AgCu, ZnO y TiO_2 en agua desionizada y en medio de cultivo caldo soya tripticaseína (TSB), posteriormente fueron incubados a 37 °C en agitación por 24 h. Después del tiempo de incubación las muestras fueron digeridas utilizando 0.1 mL de cada suspensión y 0.5 mL de ácido nítrico al 70 % (Sigma Aldrich) diluido en 8 mL de agua. Posteriormente, las soluciones fueron filtradas (filtros de 0.45 μm de tamaño de poro) e

introducidas a un equipo de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS; modelo iCAP Qc, Thermo Scientific). Para cada elemento y la calibración del equipo se tomó como referencia estándares de Ag, Cu, Zn y Ti a una concentración de 1000mg/L.

4. EFICIENCIA DE FILTRADO CON PARTÍCULAS DE NaCl

La eficiencia de filtración de los textiles con y sin los nanorecubrimientos se llevó a cabo utilizando partículas de cloruro de sodio (NaCl) de diferentes tamaños (0.3, 0.5 y 1 μm). Se utilizó un sistema compuesto por un generador de partículas de NaCl, dos contadores ópticos de partículas por sus siglas en inglés “OPC”, una cámara de vacío y una bomba mecánica. Todo el sistema fue colocado dentro de una campana de extracción (**Figura 23**). El diseño y el funcionamiento de este sistema, está basado en la propuesta de Drenwick et al, en donde uno de los OPC cuenta las partículas de NaCl en la campana, mientras que el otro contador óptico cuenta las partículas que pasan a través del textil (Drewnick et al., 2021). La bomba de vacío se activó durante 6 min y 30 s a una velocidad de 1.4 m/s. La eficacia de la filtración se midió utilizando la siguiente fórmula:

$$EF = 100 \times \left(1 - \frac{P_f}{P_{air}}\right) \quad (\text{Eq. 1})$$

donde, P_f es el número promedio de partículas de un diámetro determinado que atraviesan el material, y P_{air} es el número de partículas detectadas dentro de la campana. Se realizaron cinco mediciones de 20 s en cada textil con y sin alguno de los nanorecubrimientos (discos de tela de 65 mm de diámetro), y se repitieron por triplicado.



Figura 23. Montaje experimental del equipo para filtrar partículas de NaCl y su cuantificación. Basado en la propuesta de Drewnick et al. 2021 (figura propia).

5. ENSAYOS ANTIMICROBIANOS

La evaluación de las propiedades antibacterianas y antivirales de los nanorecubrimientos se realizó mediante dos metodologías diferentes: inhibición del crecimiento bacteriano o de la infectividad viral en aerosoles e inhibición del crecimiento bacteriano o de la infectividad viral por contacto directo (gota).

5.1 Evaluación antibacteriana

Los ensayos antibacterianos se llevaron a cabo utilizando cepas “tipo” de cuatro especies bacterianas aerobias y cuatro bacterias anaerobias (American Type Cell Culture Collection, ATCC) (**Tabla 2**). Las bacterias aerobias se cultivaron individualmente en placas de Petri con agar con agar soya tripticaseína (TSA) (BBL, Becton-Dickinson) y se incubaron durante 24 h a 37 °C en condiciones aerobias. Mientras que las bacterias anaerobias se cultivaron individualmente en placas con agar infusión cerebro corazón enriquecido (BBL, Becton-Dickinson), TSA (BBL, Becton, Dickinson) y extracto de levadura (BBL, Becton, Dickinson), suplementadas con 5 μg/mL de hemina (Sigma-Aldrich), 0.3 μg/mL de

menadiona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y 5 % de sangre de cordero desfibrinada (Microlab). Las cepas fueron incubadas durante 7 días a 35 °C en condiciones anaerobias (80 % N₂, 10 % CO₂ y 10 % H₂).

Posteriormente, los cultivos puros de cada una de las diferentes especies bacterianas fueron transferidos a tubos de microcentrífuga de 1.7 mL con medio de cultivo TSB enriquecido para las especies aerobias o medio de cultivo *Mycoplasma* enriquecido (*Mycoplasma* broth) añadido con 5 µg/mL de hemina y 0.3 µg/mL de menadiona, para las especies anaerobias. La densidad óptica (OD) de cada tubo se ajustó a 1 una $\lambda = 600$ nm en un espectrofotómetro (BioPhotometer D30, Eppendorf) para obtener una suspensión bacteriana con 1×10^9 células/mL.

Tabla 2. Especies bacterianas utilizadas *in vitro* en este estudio.

Especie bacteriana	# ATCC	Gram	Atmósfera de crecimiento
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	+	anaerobia
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotipo b	43718	-	anaerobia
<i>Escherichia coli</i>	33780	-	aerobia
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	-	anaerobia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43536	-	aerobia
<i>Streptococcus mutans</i>	25175	+	anaerobia
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+	aerobia
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14990	+	aerobia

5.1.1 Viabilidad de aerosoles bacterianos

Se evaluó la capacidad antibacteriana de los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO, y TiO₂ utilizando un sistema de filtración que generaba aerosoles que contenían bacterias patógenas (**Figura 24**). El montaje experimental se llevó a cabo con base en la Norma ASTM: F2101-01 "Standard test method for evaluating the bacterial filtration efficiency (BFE) of medical face mask materials, using a biological aerosol of *S. aureus*". Los textiles de PP con o sin los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO o TiO₂ se expusieron durante 2 minutos a los aerosoles bacterianos (una concentración de 1x10⁸ UFCs/mL). Estos aerosoles, se generaban por medio de un equipo nebulizador y eran atraídos por una bomba de vacío (simulando un sistema respiratorio humano). Se colocaron placas de Petri con agar dentro del impactador de partículas para recolectar las bacterias que eran capaces de atravesar los textiles de PP con o sin los nanorecubrimientos. Posteriormente, las placas de agar se incubaron a 35°C en condiciones aeróbicas (24 h) o anaeróbicas (7 días). El número de bacterias viables que pudieron atravesar los textiles experimentales se expresó como el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) presentes en cada ensayo. Los experimentos se realizaron por triplicado. El porcentaje de inhibición bacteriana fue expresado como:

$$\text{Inhibición bacteriana en aerosoles (\%)} = (1 - 10^{-L}) (100) \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde, L es $\text{Log}_{10}(\text{UFCs en PP}) - \text{Log}_{10}(\text{UFCs en PP+AgCu o ZnO o TiO}_2)$.

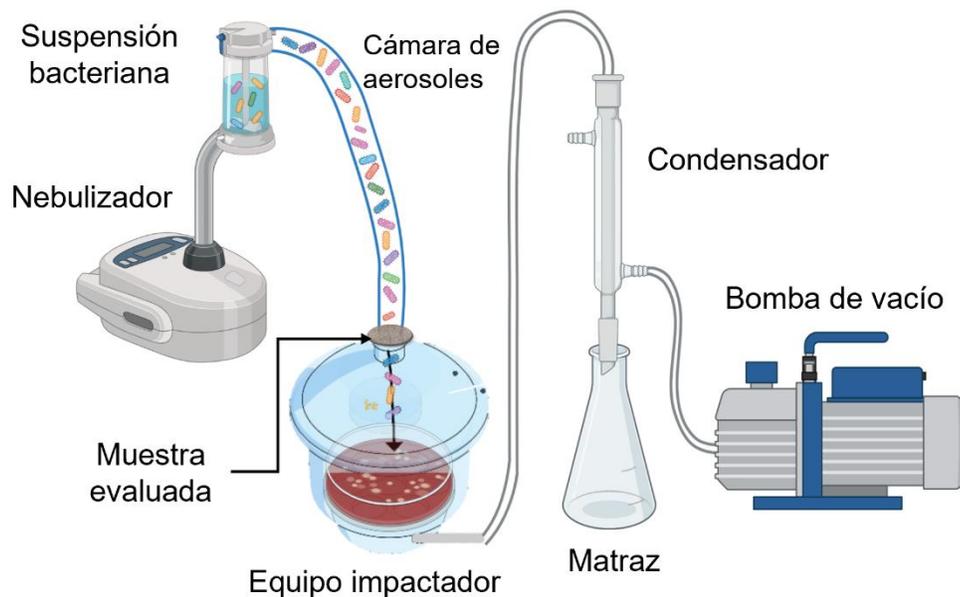


Figura 24. Representación del montaje experimental del del equipo generador/simulador de aerosoles (Reyes-Carmona et al., 2023).

5.1.2 Ensayo por contacto directo bacteriano (gota)

Para evaluar la capacidad antibacteriana por contacto directo; se sembró una gota de 40 μL a una concentración de 4×10^7 UFCs/mL de cada especie bacteriana sobre discos de los textiles de PP con y sin los nanorecubrimientos (1 cm de diámetro), se incubaron a 35 °C durante 24 h en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (**Figura 25A**). Posterior a la incubación, se recuperaron los discos expuestos a las gotas bacterianas, se sumergieron en 500 μL de medio de cultivo (caldo) en tubos para microcentrífuga. Cada tubo fue sometido a agitación vigorosa (vortex) por cinco periodos de 5 segundos para desprender las bacterias presentes que estuvieron en contacto con los discos (**Figura 25B**). De la suspensión resultante, se realizaron cuatro diluciones seriadas y se sembraron gotas de 5 μL de cada dilución en placas de Petri con agar TSA ó HK enriquecido y se incubaron a 35 °C en condiciones aerobias (24 h) o anaerobias (7 días) dependiendo de la cepa bacteriana

(Figura 25C). Posterior al tiempo de incubación se realizó en conteo de las UFCs de cada una de las diluciones sembradas (Figura 25D) y el porcentaje de inhibición bacteriana por contacto directo (gota) fue expresado como:

$$\text{Inhibición bacteriana en contacto directo (\%)} = (1 - 10^{-L})(100) \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde, L es $\text{Log}_{10}(\text{UFCs/mL en PP}) - \text{Log}_{10}(\text{UFCs/mL en PP+AgCu o ZnO o TiO}_2)$.

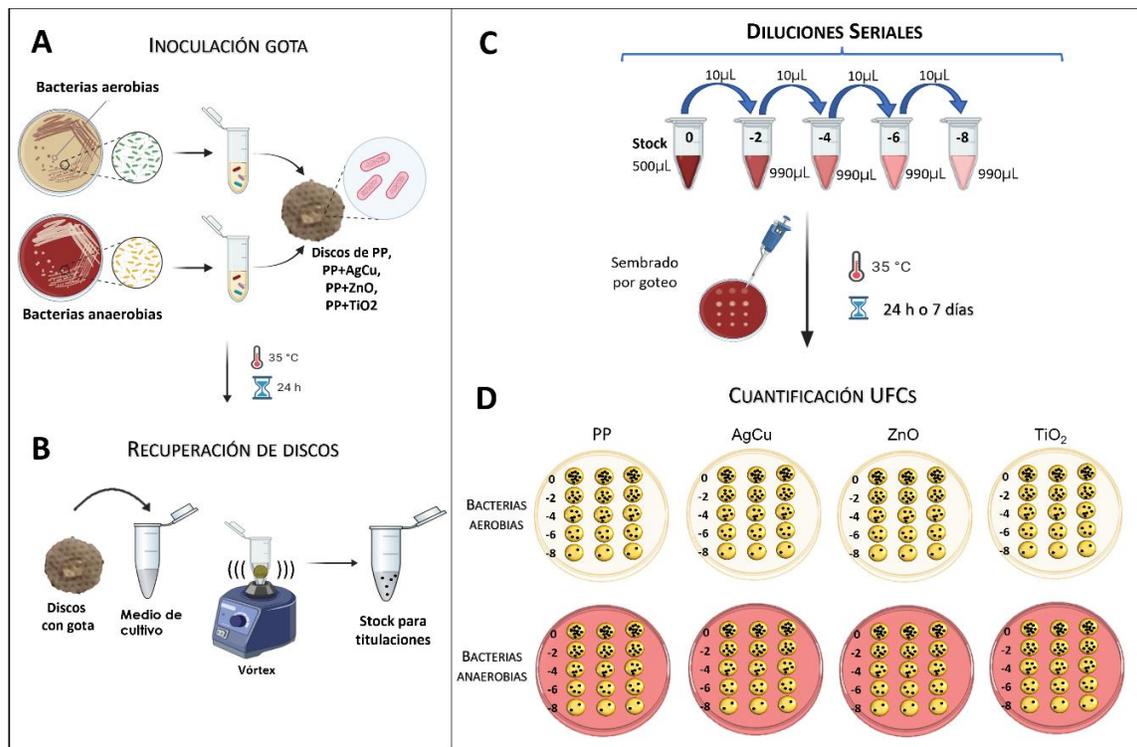


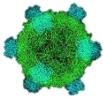
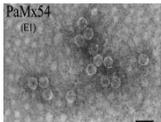
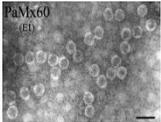
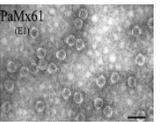
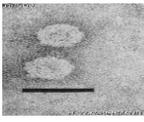
Figura 25. Metodología contacto directo. **A.** Inoculación de gota bacteriana en los textiles experimentales (AgCu, ZnO, TiO₂ y PP). **B.** Recuperación de discos con gota. **C.** Diluciones seriales y sembrado en placas Petri. **D.** Cuantificación de las UFCs (figura propia creada con Biorender.com)

5.2 Evaluación antiviral

En este estudio, se seleccionaron cuatro cepas de bacteriófagos como modelos sustitutos de virus respiratorios (Tabla 3), ya que presentan características estructurales similares, son seguros de usar, son relativamente fáciles de producir en grandes

cantidades, y adecuados para realizar ensayos para evaluar propiedades antivirales (Fedorenko et al., 2020; Machado et al., 2021; McAlister et al., 2004; Turgeon et al., 2014). Los fagos utilizados fueron PaMx54, PaMx60, PaMx61 de la familia *Fiersviridae* (anteriormente conocida como *Leviviridae*) los cuales poseen un genoma de RNA lineal y fueron aislados en México por Sepúlveda-Robles y cols. (Sepúlveda-Robles et al., 2012), así como su cepa huésped *Pseudomonas aeruginosa* 33 (PS33). También se utilizó el fago PhiX174 que fue adquirido de la colección ATCC (13706-B1) el cual se caracteriza por tener un genoma de DNA circular y ser de la familia *Microviridae*. En la **Tabla 3** se describe a mayor detalle las características estructurales de estos virus.

Tabla 3. Bacteriófagos utilizados en este proyecto como sustitutos de virus respiratorios humanos (virus subrogantes).

				
Bacteriófago	PaMx54	PaMx60	PaMx61	PhiX174
Bacteria huésped	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Genoma	ssRNA (lineal)	ssRNA (lineal)	ssRNA (lineal)	ssDNA (circular)
Proteínas estructurales	Dos	Dos	Dos	Cuatro (F, G, J y H)
Familia	<i>Fiersviridae</i>	<i>Fiersviridae</i>	<i>Fiersviridae</i>	<i>Microviridae</i>
Cápside	Sin envoltura, Icosaédrica	Sin envoltura, Icosaédrica	Sin envoltura, Icosaédrica	Sin envoltura, Icosaédrica
Tamaño	25 nm	25 nm	25 nm	25 nm
Micrografía				
Referencias	(Sepúlveda-Robles et al., 2012) Colección de ATCC (Kirchberger & Ochman, 2023; van den Worm et al., 2006)			

La propagación de los fagos se realizó utilizando la técnica de doble capa de agar suave, adicionando en tubo de ensayo estéril $\sim 10^5$ fagos y 300 μL de la bacteria huésped (*Pseudomonas aeruginosa* 33 (*Ps33*) fue la cepa huésped para los fagos PaMx54, 60 y 61. y *E. coli rfaB* mutante fue la cepa huésped del fago PhiX174). Cada fago, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la incorporación del fago a la bacteria, se agregaron 3 mL de medio T ϕ suave (10 g de Bacto-triptona, 5 g de NaCl, 7 g de Bacto-agar, 2 MgCl₂) y se vertieron en una placa de Petri con medio de cultivo Luria Bertani (LB) para formar un tapiz bacteriano. Posteriormente, se incubó el tapiz bacteriano a 37 °C durante toda la noche hasta la lisis confluyente de la bacteria (Sambrook et al., 1989). Por último, se raspó el agar y se incubó durante la noche a 4 °C en 5 mL de medio de cultivo de fagos (50 mM Trisma-base pH 8, 10 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 2 % de gelatina), se centrifugó a 10.509 G durante 10 min y se recuperó el sobrenadante o lisado de fago. Por último, cada lisado fágico se tituló por diluciones seriadas y fue sembrado sobre las placas de Petri con nuevos tapices bacterianos (**Figura 26**).

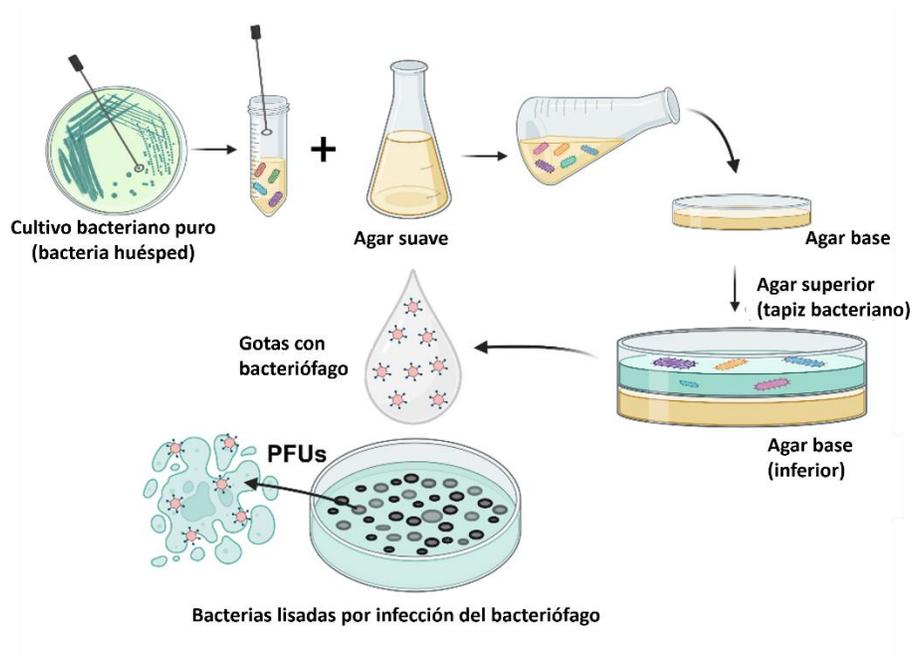


Figura 26. Figura representativa de la metodología para llevar a cabo el ensayo de placa de doble capa para la propagación de bacteriófagos (Reyes-Carmona et al., 2023).

5.2.1 Inactivación de aerosoles virales

Este ensayo se realizó de manera similar que a la prueba de aerosoles bacterianos y se utilizó el mismo montaje experimental que con las bacterias (como se mostró en la **Figura 23**). En estos ensayos se utilizó una concentración viral de 1×10^8 UFPs/mL dentro del vaso del nebulizador. Las muestras de PP con o sin los nanorecubrimientos se expusieron durante 2 minutos a los aerosoles virales que eran atraídos por una bomba de vacío, simulando un sistema respiratorio humano. Se colocaron placas de Petri con tapices bacterianos (con la respectiva cepa huésped de cada fago) en la parte superior en el impactador para recolectar los virus que se mantuvieron viables de los textiles de PP con o sin los nanorecubrimientos. Posteriormente, se incubaron las placas de agar a 37 °C durante la noche. El número de fagos viables se expresaron como el número total de Unidades Formadoras de Placas Líticas (UFPs) y el porcentaje de inactivación viral en aerosoles fue expresado como:

$$\text{Inactivación viral en aerosoles (\%)} = (1 - 10^{-L}) (100) \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde, L es $\text{Log}_{10}(\text{PFUs en PP}) - \text{Log}_{10}(\text{PFUs en PP+AgCu o ZnO o TiO}_2)$.

5.2.2 Ensayo por contacto directo viral (gota).

De manera similar al ensayo por contacto directo bacteriano, se sembró una gota (30 μL) de cada fago a una concentración viral de 1×10^8 UFPs sobre discos de 1 cm de diámetro de PP con y sin nanorecubrimientos a 37 °C. Para determinar el tiempo que tardan los nanorecubrimientos en inactivar a los virus, se recuperaron los discos con las gotas virales a diferentes tiempos de contacto (0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 12 y 24 h). Posterior a cada tiempo de incubación, los discos se sumergieron en 500 μL de medio de cultivo para fagos en tubos para microcentrífuga estériles y se les dio agitación vigorosa (vortex), para desprender los fagos presentes que estuvieron en contacto con los discos. De la

suspensión resultante, se realizaron cuatro diluciones seriadas y se sembraron gotas de 5 μ L de cada dilución en placas de Petri con agar LB utilizando la técnica de doble capa de agar (da Silva et al., 2021; Kropinski et al., 2009; Sepúlveda-Robles et al., 2012) y se incubaron a 35 °C en condiciones aerobias durante 24 h.

Posterior al tiempo de incubación se realizó en conteo de las UFPs de cada una de las diluciones sembradas. Este ensayo se realizó por triplicado. El porcentaje de inactivación viral por contacto directo (gota) a diferentes tiempos fue expresado como:

$$\text{Inactivación viral por contacto directo (\%)} = (1 - 10^{-L}) (100) \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde, L es Log_{10} (UFPs/mL en PP) - Log_{10} (UFPs/mL en PP+AgCu o ZnO o TiO₂).

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los experimentos antimicrobianos se realizaron por triplicado y fueron expresados como la media \pm EEM (error estándar de la media), utilizando tres muestras independientes de cada grupo de muestras. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía con la corrección de Dunnett, mediante el software Prisma y se consideraron diferencias estadísticamente significativas a partir de una $p \leq 0.05$.

VII. RESULTADOS

1. DEPÓSITO DE LOS NANORECUBRIMIENTOS

En la **Figura 27**, se muestran los rollos de PP antes y después de realizar los depósitos con AgCu, ZnO y TiO₂. También se muestra el interior de la cámara de vacío del equipo donde se llevaron a cabo los depósitos mediante la técnica magnetrón sputtering.

En las **Figuras 27C** y **D**, se puede apreciar que el nanorecubrimiento de AgCu adquiere un color entre plateado y grisáceo, mientras que los nanorecubrimientos de ZnO y TiO₂, mantienen la coloración blanca del PP.

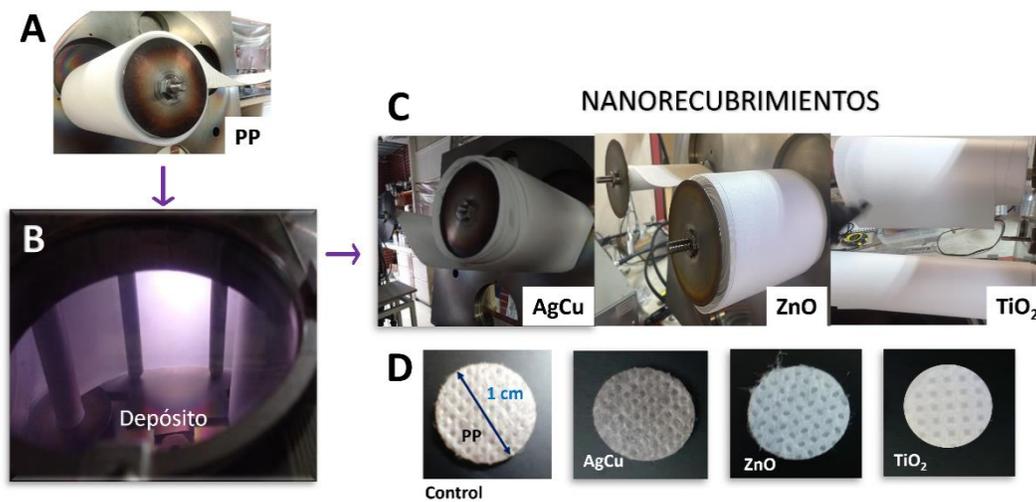


Figura 27. Depósito de los nanorecubrimientos AgCu, ZnO, TiO₂. A. Rollo de PP sin recubrimiento. B. Interior de la cámara de vacío durante la deposición rollo a rollo. C. Rollos de PP recubiertos con AgCu, ZnO o TiO₂. D. Discos de PP sin recubrimiento y con los nanorecubrimientos; AgCu (PP+AgCu), ZnO (PP+ZnO), TiO₂ (PP+TiO₂).

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS NANORECUBRIMIENTOS

Por medio de la microscopía óptica se logró el objetivo de comparar la morfología de las fibras del PP (sin recubrir) y del PP recubierto con AgCu, ZnO o TiO₂. En la **Figura 28** se puede apreciar que en los tres grupos experimentales (AgCu, ZnO y TiO₂),

mantuvieron la misma morfología y tamaños de fibras muy similares al de las fibras del textil de PP sin recubrir. Los resultados mostraron que el tamaño de fibras del PP sin recubrimiento fue de $24.29 \pm 0.88 \mu\text{m}$, mientras que las fibras del PP recubiertas con AgCu presentaron un tamaño de $24.02 \pm 0.36 \mu\text{m}$, las recubiertas con ZnO de $23.51 \pm 0.36 \mu\text{m}$ y las recubiertas con TiO_2 de $24.11 \pm 0.33 \mu\text{m}$.

Debido a la gran similitud de tamaños de las fibras, se confirmó que los recubrimientos fueron homogéneos ya que no se observaron cambios relevantes en el tamaño ni la morfología de las fibras.

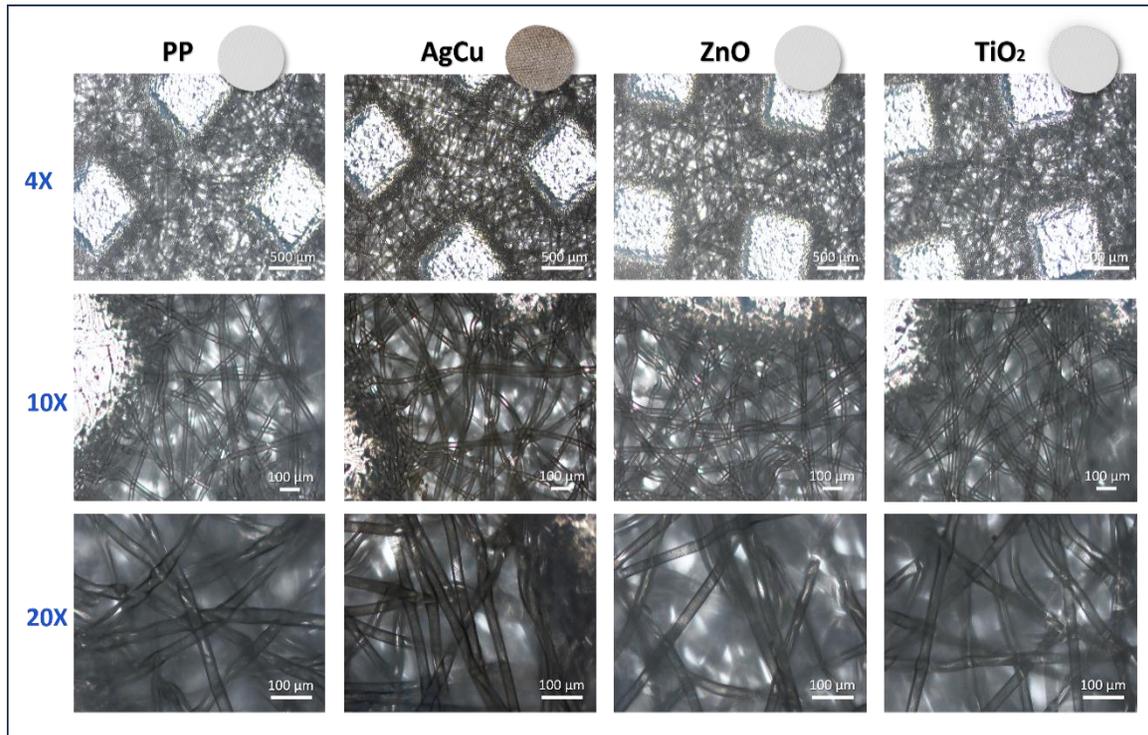


Figura 28. Caracterización por microscopía óptica de todos los textiles. Siendo de izquierda a derecha los textiles de PP con y sin los nanorecubrimientos a diferentes ampliaciones (4X, 10X y 20X).

2.1 Caracterización del nanorecubrimiento AgCu

Los resultados de la caracterización del nanorecubrimiento de AgCu mostraron que el nanorecubrimiento de AgCu tuvo un espesor de ~30 nm determinado mediante perfilometría óptica (perfilómetro óptico Zygo), depositado en piezas de Si. En la **Figura 29** se muestra el análisis realizado con SEM y EDS. Mediante las micrografías obtenidas por SEM, se puede apreciar que el nanorecubrimiento de AgCu se encuentra depositado de manera uniforme sobre las fibras de PP (**Figura 29A**). Con el análisis por EDS se identificó una composición de 61 ± 7 at. % de Cu y 39 ± 7 at. % de Ag (**Figura 29B**). El análisis con XPS confirmó que en la superficie de los textiles con el nanorecubrimiento de AgCu estaban presentes los elementos C, O, Ag y Cu (55.6 at. % de Cu y 44.4 at. % de Ag). (**Figura 29C**). Mientras que en las **Figuras 29D** y **29E** se aprecian en alta resolución las regiones Ag3d y Cu2p características de los elementos plata y cobre. Los resultados de las mediciones obtenidas mediante el ángulo de contacto indican que el nanorecubrimiento de AgCu fue ligeramente más hidrofóbico ($121.8^\circ \pm 0.9$) comparado con el control de PP ($116.8^\circ \pm 0.6$) (**Figura 29F**).

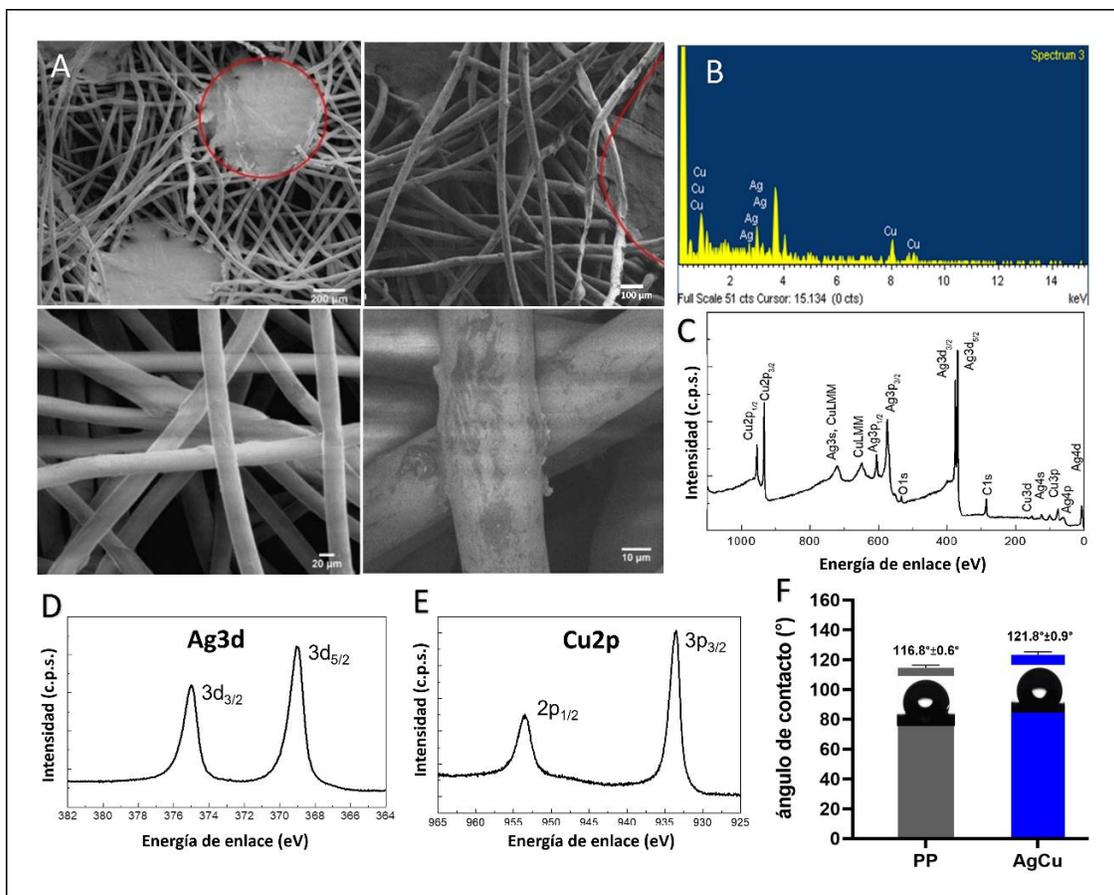


Figura 29. Caracterización del nanorecubrimiento de AgCu. A. Micrografías de SEM del nanorecubrimiento de AgCu con diferentes ampliificaciones (los círculos rojos indican los sitios de unión de las fibras de PP). En las micrografías inferiores (de mayor aumento), se observa que el nanorecubrimiento de manera uniforme sobre las fibras del textil. B. Espectro EDS donde se identificaron Ag y Cu. C. Espectro XPS de baja resolución donde se identificaron los elementos presentes en la superficie. D. y E. Espectro XPS de alta resolución en las regiones Ag3d y Cu2p. F. Ángulo de contacto del nanorecubrimiento de AgCu y PP sin recubrir.

2.2 Caracterización del nanorecubrimiento ZnO

Los resultados de la caracterización del nanorecubrimiento de ZnO con perfilometría óptica mostraron que el espesor del nanorecubrimiento fue de 25-30 nm. En la **Figura 30A**, se muestra el espectro XPS del nanorecubrimiento de ZnO depositado sobre PP y Si (para su comparación), en ambos casos se pueden observar los elementos Zn, O y C. En el depósito sobre PP, se observa una señal muy alta de C1s para el ZnO depositado sobre

PP, que proviene de las áreas no recubiertas de las fibras de PP consistente con su composición química, $(C_3H_6)_n$. En las **Figuras 30B y C** se observan los espectros de alta resolución con las regiones Zn2p y O1s características de los espectros XPS de ZnO. La composición química en la superficie del PP con el nanorecubrimiento de ZnO fue de 63.5 at. % de Zn y 36.5 at. % de O. La cual, se obtuvo a partir de diferentes muestras de películas de ZnO depositadas sobre Si, para evitar las contribuciones del carbono, los resultados indican que se obtuvieron muestras subestequiométricas, a pesar de que se suministró gas oxígeno durante la deposición. Esto podría ser consecuencia de la baja temperatura utilizada durante la deposición. Con respecto al ángulo de contacto, al igual que el nanorecubrimiento de AgCu, el nanorecubrimiento de ZnO fue ligeramente más hidrofóbico ($126.1^\circ \pm 0.8$) que el control de PP ($116.8^\circ \pm 0.6$) (**Figura 30D**).

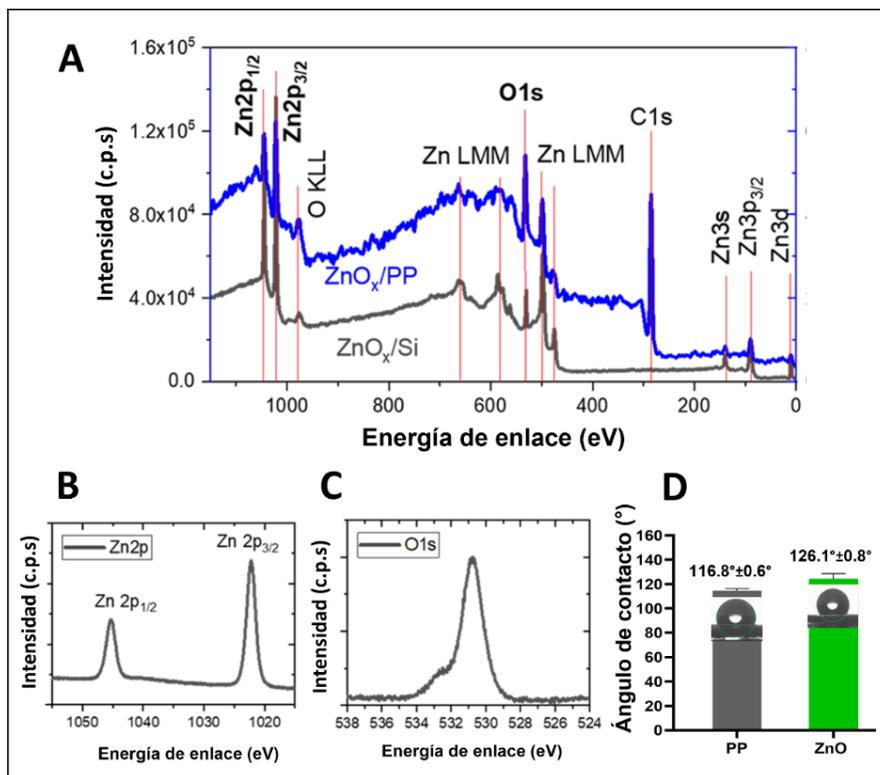


Figura 30. Caracterización del nanorecubrimiento de ZnO. **A.** Espectros XPS de baja resolución de la nanocapa de ZnO depositada sobre Si y PP para su comparación. En ambos casos se identificó Zn, O y C. **B. y C.** Espectro XPS de alta resolución en las regiones Zn2P y O1s. **D.** Ángulo de contacto del nanorecubrimiento de ZnO y del PP sin recubrir.

2.3 Caracterización del nanorecubrimiento TiO_2

Los resultados de la caracterización con XPS del nanorecubrimiento de TiO_2 se presentan en la **Figura 31**, donde se identificaron las regiones $Ti2p$ con su característico doblete ($1/2$ y $3/2$), así como las regiones $C1s$, $O1s$. Se identificó que la región $Ti2p\ 3/2$ aparece a 458.6 ± 0.2 eV, en concordancia con la presencia de $Ti(IV)$. Considerando que el primer componente de $O1s$ a $BE = 530.0 \pm 0.2$ eV atribuible a óxidos inorgánicos (compuestos que contienen oxígeno y un metal). Al calcular la relación entre los porcentajes atómicos de oxígeno ($O\%$) correspondiente a la señal de $O1s$ a 530 eV (asociada con óxidos inorgánicos) y el porcentaje atómico de titanio ($Ti\%$), se obtuvo una relación de 70 at.% Ti y 30 at.% O estando el oxígeno por debajo del valor teórico de 1:2 para TiO_2 , lo que sugiere que se forma un óxido no estequiométrico, TiO_x , similar al ZnO_x . Respecto al grosor del nanorecubrimiento de TiO_2 , este fue de 32 nm aproximadamente.

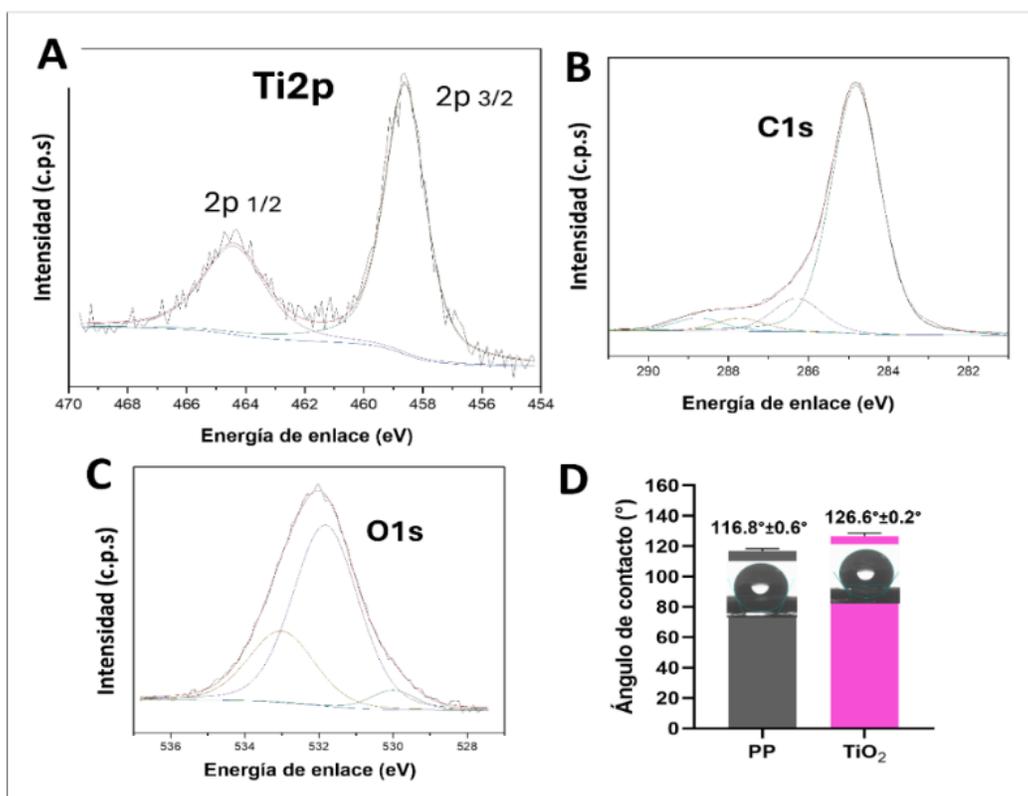


Figura 31. Caracterización del nanorecubrimiento de TiO_2 . A. Espectros XPS de la región $Ti2p$ y con sus respectivos dobletes. B. Región $C1s$ (arriba a la derecha) C. (abajo) relevantes para el textil de PP modificado con TiO_2 . D. Ángulo de contacto del nanorecubrimiento de TiO_2 y su control PP sin recubrimiento.

3. EFICIENCIA DE FILTRADO CON PARTÍCULAS DE NaCl

Los resultados de la eficacia de filtrado utilizando partículas de NaCl, se muestran en la **Tabla 4**, con los tres tamaños de partícula evaluados (0.3, 0.5 y 1 μm). Los resultados indicaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la eficacia de filtración estimada para el textil de polipropileno (PP) ni los textiles de PP recubiertos.

Tabla 4. Eficiencia de filtrado (NaCl) (%) para los textiles: Polipropileno como control (PP) y PP nanorecubierto.

Tamaño de partícula NaCl	0.3 μm (Media \pm EEM)	0.5 μm (Media \pm EEM)	1 μm (Media \pm EEM)
PP	30.5 \pm 8.3	61.1 \pm 6.6	72.1 \pm 0.6
AgCu	28.1 \pm 2.6	56.9 \pm 3.7	66.4 \pm 2.8
ZnO	32.5 \pm 4.4	55.6 \pm 1.9	64.8 \pm 2.6

EEM= Error estándar de la media

4. LIBERACIÓN DE IONES METÁLICOS

Los resultados obtenidos mediante ICP-MS, permitieron identificar los iones de Ag^+ , Cu^+ , Zn^{2+} y Ti^{4+} liberados de cada tipo de nanorecubrimiento después de 24 horas de inmersión en agua o medio de cultivo (TSB), los resultados se presentan en la **Figura 32**. Con respecto al PP recubierto con AgCu, se identificaron concentraciones de Ag de 0.040 ± 0.009 ppm y de Cu de 0.240 ± 0.007 ppm cuando la muestra fue suspendida en agua, mientras que las concentraciones de Ag fueron de 0.60 ± 0.01 ppm y de Cu de 0.70 ± 0.01 ppm cuando la muestra estuvo expuesta a medio de cultivo. Con respecto al textil con el nanorecubrimiento de ZnO, se identificó una concentración de iones Zn de 1.88 ± 0.70 ppm cuando la muestra

estuvo sumergida en agua y de 2.58 ± 0.60 ppm cuando estuvo en medio de cultivo. Por último, la concentración de Ti liberada del nanorecubrimiento de TiO_2 fue de 0.12 ± 0.02 ppm al estar inmersa en agua y 0.44 ± 0.03 ppm al exponer la muestra en medio de cultivo.

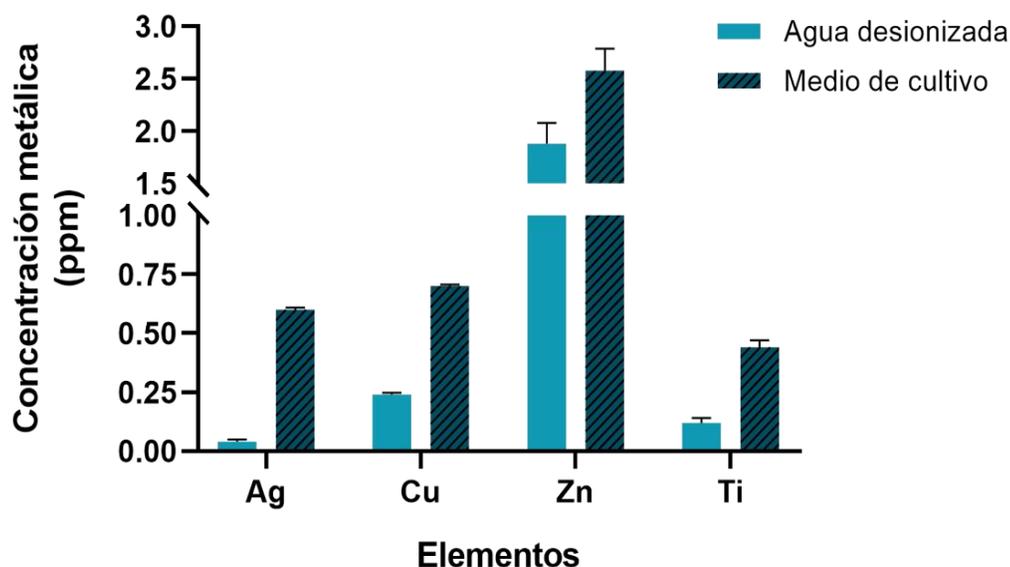


Figura 32. Liberación de iones Ag^+ , Cu^+ , Zn^{2+} y Ti^{4+} . Después de estar inmersos en agua desionizada y medio de cultivo por 24 h.

5. EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA

A continuación, se muestran los resultados antibacterianos y antivirales obtenidos con los tres tipos de nanorecubrimientos analizados en esta investigación.

5.1 Evaluación antibacteriana

5.1.1 Inhibición de aerosoles bacterianos

Los resultados de la evaluación antibacteriana utilizando aerosoles con bacterias en un sistema simulado de filtración se muestran en las **Figuras 33** (bacterias aerobias) y **34** (bacterias anaerobias). En general podemos observar que, en la mayoría de las especies

bacterianas, el número de bacterias viables fue significativamente inferior cuando el aerosol bacteriano interactuó con los textiles nanorecubiertos con AgCu, ZnO o TiO₂ comparados con el control negativo PP sin recubrimiento.

En el caso de las bacterias aerobias, al estar en contacto con la nanocapa de AgCu el porcentaje de inhibición de aerosoles bacterianos fue del 70 - 92 %, mientras que con el nanorecubrimiento de ZnO, se identificó una reducción bacteriana del 26 – 90 %. Por otro lado, el nanorecubrimiento menos efectivo fue el de TiO₂, donde se logró una inhibición del 18 – 81 %. Cabe mencionar que, en todas las especies probadas, los resultados de la inhibición bacteriana en aerosoles fueron significativos a excepción de los resultados con el nanorecubrimiento de TiO₂ contra la especie *S. epidermidis*.

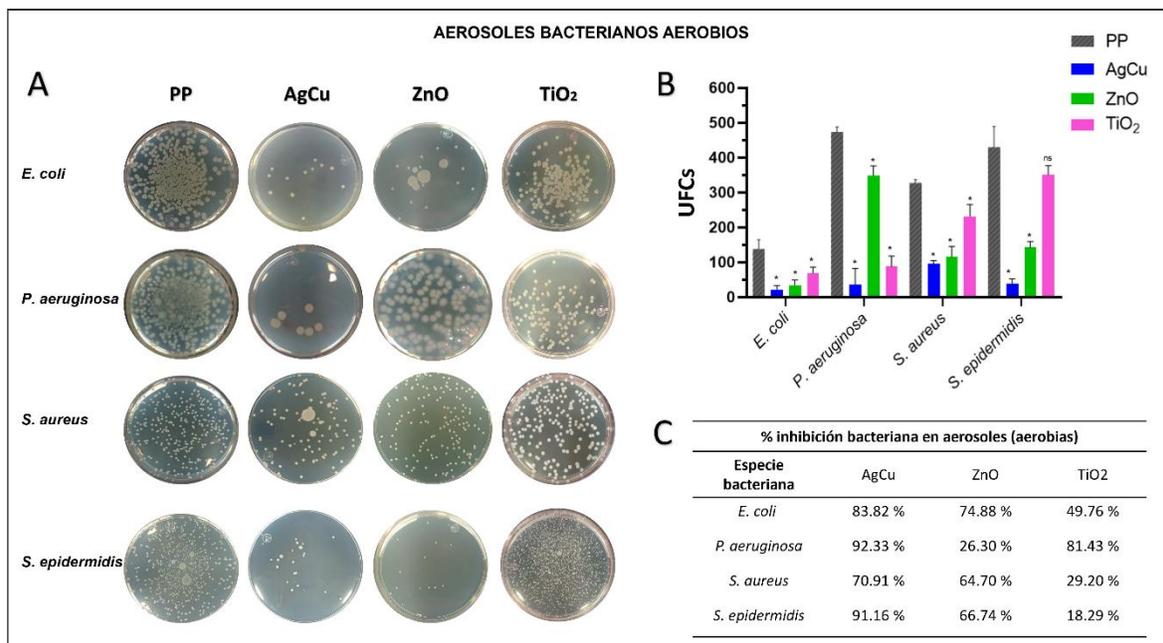


Figura 33. Evaluación de aerosoles bacterianos con especies aerobias al estar expuestos a los textiles de PP con y sin los recubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂. **A.** Placas de Petri con las UFCs viables tras atravesar los textiles con o sin los nanorecubrimientos. **B.** Gráfica con el número de UFCs que crecieron en cada grupo. **C.** Tabla con el % de inhibición de cada especie aerobia evaluada. PP (polipropileno sin recubrimiento), AgCu (PP recubierto con AgCu), ZnO (PP recubierto con ZnO), TiO₂ (PP recubierto con TiO₂). * = $p < 0.05$, ns = no significativo.

Respecto a los resultados obtenidos utilizando aerosoles con bacterias anaerobias, se puede observar que al estar en contacto con el nanorecubrimiento con AgCu se obtuvo un porcentaje de inhibición del 72 - 95 %, con el nanorecubrimiento de ZnO del 58 - 97 %, mientras que con el nanorecubrimiento de TiO₂ fue del 44 - 73 %. De igual manera que en las especies aerobias, el nanorecubrimiento más eficaz fue el de AgCu, seguido por el de ZnO y el menos efectivo fue el de TiO₂. En todas las bacterias anaerobias se inhibió el crecimiento bacteriano de manera significativa.

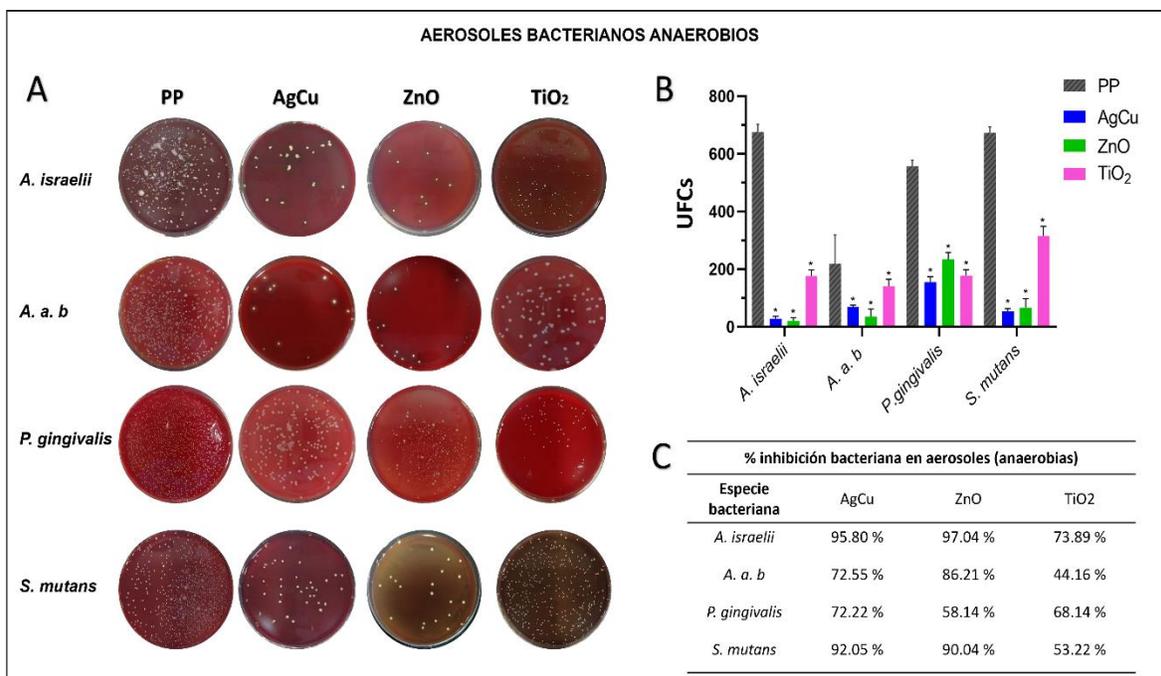


Figura 34. Evaluación de aerosoles bacterianos con especies anaerobias al estar expuestos a los textiles de PP con y sin los recubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂. **A.** Placas de Petri con las UFCs viables tras atravesar los textiles con o sin los nanorecubrimientos. **B.** Gráfica con el número de UFCs que crecieron en cada grupo. **C.** Tabla con el % de inhibición de cada especie aerobia evaluada. PP (polipropileno sin recubrimiento), AgCu (PP recubierto con AgCu), ZnO (PP recubierto con ZnO), TiO₂ (PP recubierto con TiO₂). * = $p < 0.05$.

5.1.2 Inhibición bacteriana por contacto directo (gota)

Los resultados de la evaluación antibacteriana del ensayo por contacto directo, que consistió en la colocación de una gota con bacterias sobre los textiles con y sin nanorecubrimientos, se observó una disminución significativa de la viabilidad de todas las bacterias evaluadas cuando estuvieron en contacto con los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂ (Figuras 35 y 36). En el caso de las bacterias aerobias expuestas al nanorecubrimiento de AgCu, el porcentaje de inhibición bacteriana por contacto directo (gota) fue del 72 - 99 %. Por otro lado, al contacto con el nanorecubrimiento de ZnO las especies bacterianas aerobias mostraron una inhibición del 55 - 99 %. Mientras que el contacto con el nanorecubrimiento de TiO₂ causó una inhibición del 32 - 92 % (Figura 35).

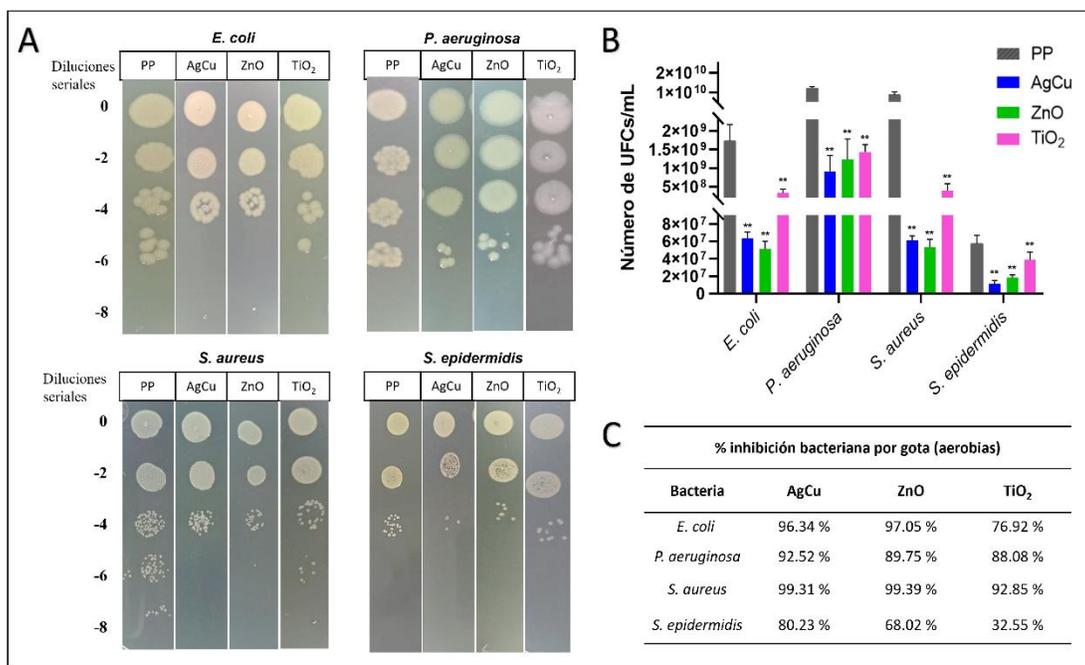


Figura 35. Evaluación de bacterias aerobias por contacto directo (gota) con los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂. **A** UFCs en placas de Petri con agar que crecieron al estar en contacto con o sin los nanorecubrimientos. **B.** Gráfica con el número de UFCs/mL que crecieron en cada grupo. **C.** Tabla con el porcentaje de inhibición. PP (polipropileno sin recubrimiento), AgCu (PP recubierto con AgCu), ZnO (PP recubierto con ZnO), TiO₂ (PP recubierto con TiO₂). ** $p < 0.001$.

En cuanto al porcentaje de inhibición por contacto directo (gota) de las bacterias anaerobias expuestas a los diferentes tipos de nanorecubrimientos fueron los siguientes; el contacto con el nanorecubrimiento de AgCu fue de 92 - 99 %, con el nanorecubrimiento de ZnO fue de 83 - 95 % y con el nanorecubrimiento de TiO₂ se obtuvo un porcentaje de inhibición del 55 - 95 % (**Figura 36**).

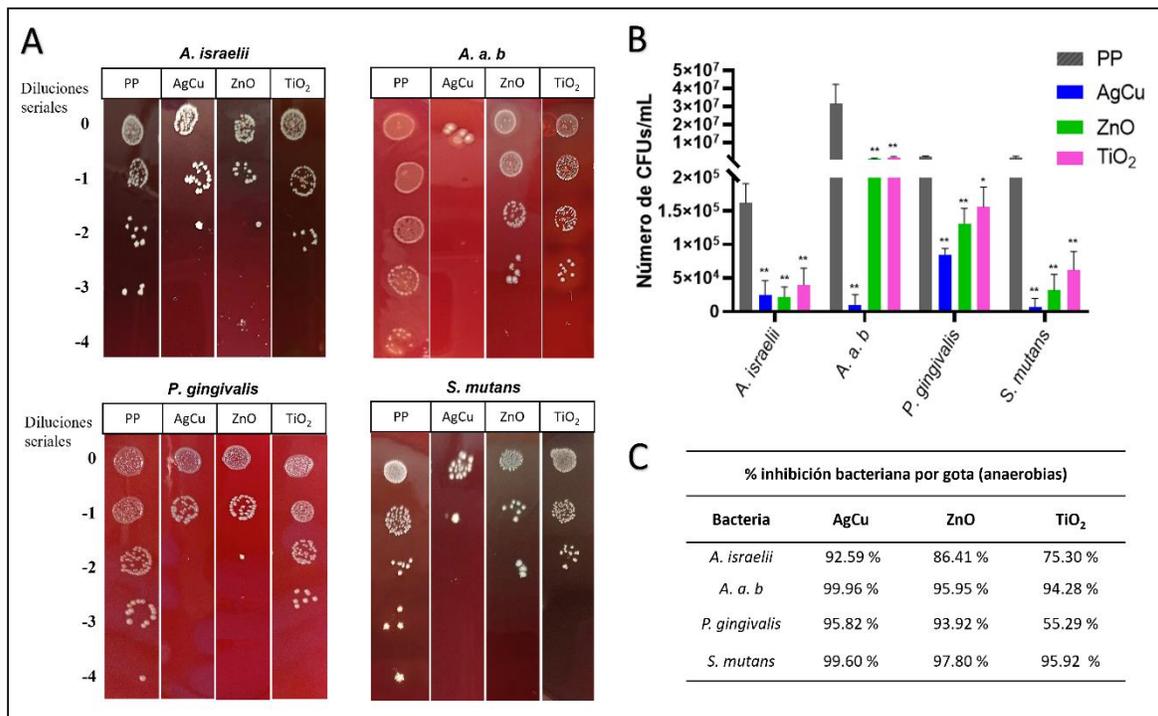


Figura 36. Evaluación de bacterias anaerobias por contacto directo (gota) con los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂. **A** UFCs en placas de Petri con agar que crecieron al estar en contacto con o sin los nanorecubrimientos. **B.** Gráfica con el número de UFCs/mL que crecieron en cada grupo. **C.** Tabla con el porcentaje de inhibición. PP (polipropileno sin recubrimiento), AgCu (PP recubierto con AgCu), ZnO (PP recubierto con ZnO), TiO₂ (PP recubierto con TiO₂). ** $p < 0.001$.

Los resultados antibacterianos obtenidos con ambas metodologías mostraron que el nanorecubrimiento más efectivo contra las diferentes especies bacterianas fue el de AgCu, seguido del de ZnO. A pesar de que el nanorecubrimiento de TiO₂ fue el menos efectivo, también tuvo una capacidad antibacteriana, aunque en menor porcentaje.

5.2 Evaluación antiviral

5.2.1 Inactivación de aerosoles virales

Los resultados del ensayo de aerosoles virales (bacteriófagos) que fueron evaluados en un sistema de filtración en contacto con los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂ se muestran en **figura 37**. Los nanorecubrimientos de AgCu y ZnO lograron una disminución significativa del número de unidades formadoras de placas líticas (UFPs) en los fagos de RNA (PaMx54, 60 y 61). Específicamente, con el nanorecubrimiento de AgCu el porcentaje de inactivación del aerosol vírico fue del 16 - 64 %. Mientras que, con el nanorecubrimiento de ZnO la inactivación viral fue del 11.6 – 48.6 % y con el nanorecubrimiento de TiO₂ se obtuvo una inactivación viral del 4 – 14 %.

Cabe resaltar que los aerosoles víricos de los bacteriófagos de RNA (PaMx54, 60 y 61) fueron los más sensibles al contacto con los nanorecubrimientos. Mientras que ninguno de los nanorecubrimientos logró inactivar de manera significativa los aerosoles víricos que contenían al fago de DNA PhiX174 (**Figura 37B**).

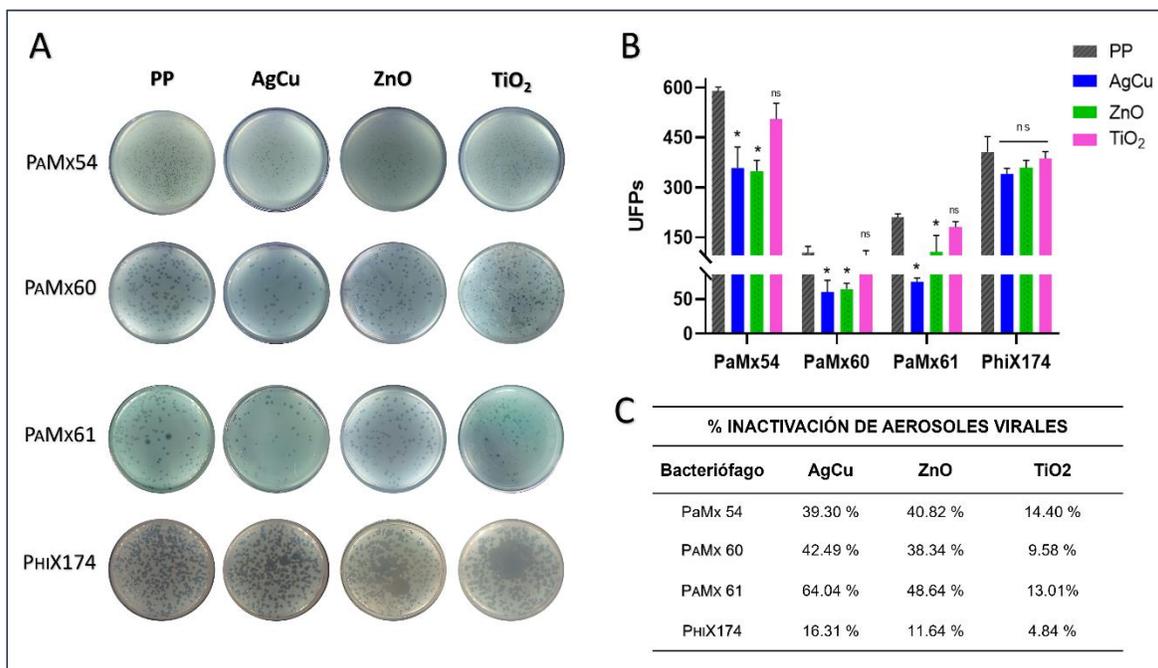


Figura 37. Evaluación de la viabilidad de aerosoles virales (fagos). **A.** Placas de Petri representativas de las UFPs formadas por los diferentes bacteriófagos después de atravesar los textiles con o sin los nanorecubrimientos. **B.** Gráfica con el número de UFPs/mL cuantificados después del ensayo de aerosoles virales. **C.** Porcentaje de la inactivación de aerosoles virales al interactuar con los nanorecubrimientos de AgCu y ZnO. PP (polipropileno sin recubrimiento), AgCu (PP recubierto con AgCu), ZnO (PP recubierto con ZnO). * $p < 0.05$, ns = no significativo.

5.2.2 Inactivación viral por contacto directo (gota)

Los resultados del ensayo antiviral por contacto directo, que consistió en aplicar una gota de cada virus (fagos 1×10^8 UFPs) sobre los textiles de PP con y sin los nanorecubrimientos, mostraron una efectividad para disminuir la infectividad viral con respecto al tiempo de contacto de los virus con los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂. Los resultados obtenidos de estos ensayos se muestran en la **Figura 38 A y B**.

El nanorecubrimiento de AgCu inactivó en su totalidad los fagos PaMx60 y 61 a las 4 h de incubación, mientras que el fago PaMx54 se inactivó desde las 2 h de contacto con el nanorecubrimiento. El fago de DNA PhiX174 presentó una inactivación menor, ya que la

mayor reducción del título viral se obtuvo hasta las 24 h de contacto, pero sin alcanzar la inactivación total observada en los otros virus de RNA.

Con respecto al nanorecubrimiento de ZnO, se observó una inactivación total de todos los fagos de RNA (PaMx54, 60 y 61) a las 12 h. Sin embargo, contra el fago de DNA PhiX174 el nanorecubrimiento no mostró ningún efecto inhibitorio en ninguno de los tiempos evaluados.

Por último, el nanorecubrimiento de TiO₂ inactivó en su totalidad los fagos PaMx60 y 61 a las 24 h de contacto, mientras que en el caso del fago PaMx54 no se observó una inactivación completa a las 24 h. Finalmente, el nanorecubrimiento de TiO₂ tampoco inactivó al fago PhiX174 en ninguno de los tiempos evaluados.

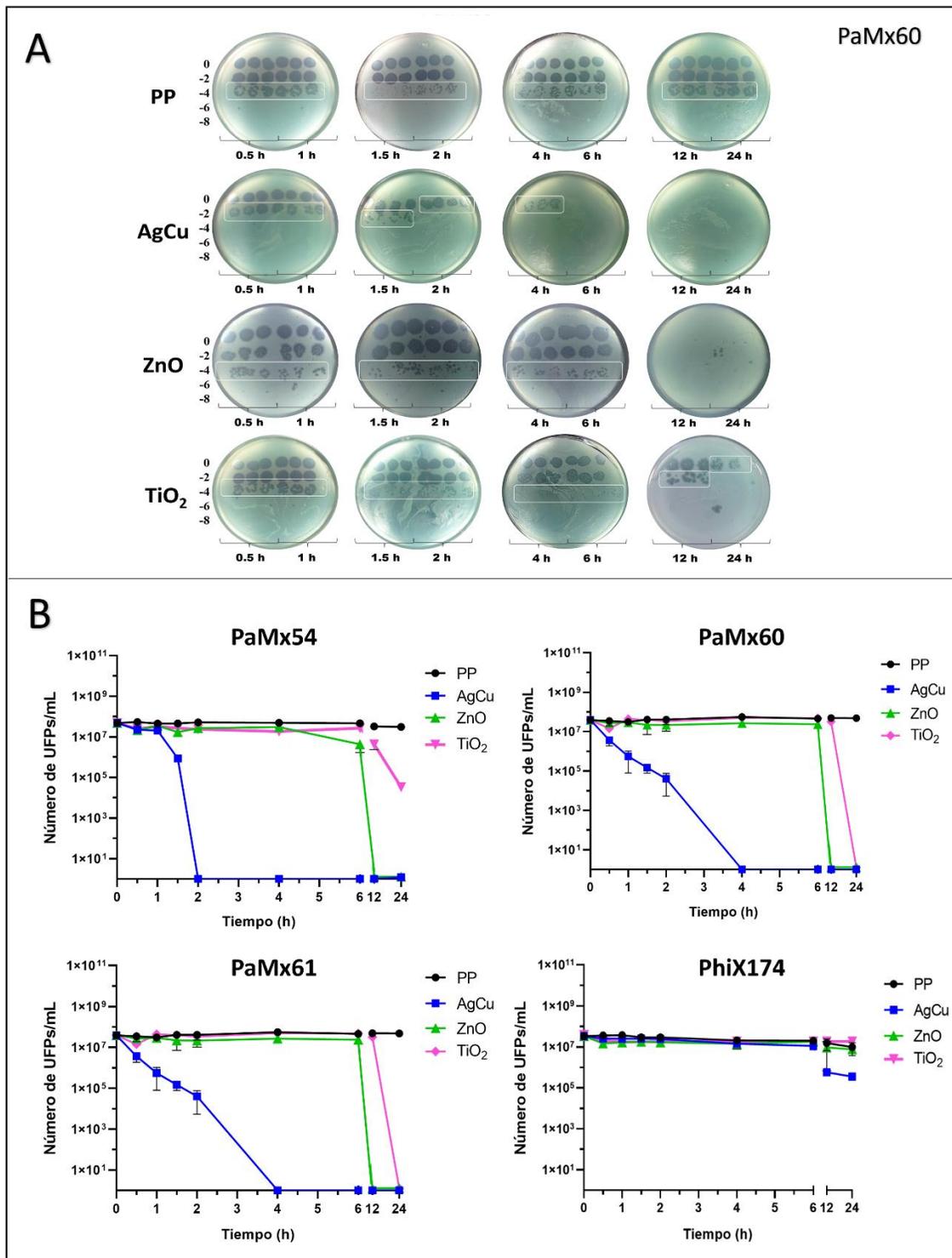


Figura 38. Evaluación antiviral por contacto directo. A. Placas Petri representativas del ensayo por contacto directo (gota) de los textiles de PP con y sin los nanorecubrimientos contra el fago PaMx60 en diferentes a diferentes tiempos de incubación (0.5 - 24 h) y diluciones. **B.** Gráficas con el número de UFPs/mL cuantificadas en los diferentes tiempos de contacto (0.5 - 24 h) expuestos a los diferentes textiles de PP con y sin nanorecubrimientos.

VIII. DISCUSIÓN

Con la finalidad de analizar e innovar estrategias para combatir enfermedades infecciosas transmitidas a través de aerosoles bacterianos y víricos, en este proyecto se evaluaron las propiedades antibacterianas y antivirales de los nanorecubrimientos AgCu, ZnO y TiO₂ depositados mediante la técnica de magnetrón sputtering sobre un textil de PP, mediante el contacto directo (gotas) o por medio del contacto con bioaerosoles.

El depósito homogéneo de los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂ sobre las fibras de PP se logró mediante la técnica de magnetrón sputtering, la cual es ampliamente reconocida por su eficacia para recubrir de manera uniforme diversos sustratos, como polímeros, vidrio y materiales metálicos con diversas composiciones químicas y topografías (Gao & Li, 2004; Liu et al., 2007). La técnica de magnetrón sputtering, permite depositar recubrimientos de tamaño nanométrico o micrométrico (Bobzin et al., 2009).

Otras metodologías investigadas para el recubrimiento de textiles de PP con propiedades antimicrobianas han sido las siguientes; Cerkez y cols, desarrollaron recubrimientos poliméricos utilizando el procedimiento “*Pad-Dry*” que consiste en impregnar textiles con soluciones químicas (Cerkez et al., 2013); sin embargo, este procedimiento presenta desventajas como limitado control de uniformidad y posible daño del textil. En otra investigación aplicaron una solución híbrida de polietilenimina, ácido láurico y sales de Cu²⁺ por atomización y secado en horno para recubrir textiles de PP, previamente tratados con plasma de aire, para favorecer la adhesión del recubrimiento. Este recubrimiento mostró una eficaz capacidad antibacteriana (Calais et al., 2023). En otro estudio combinaron diversas técnicas para recubrir textiles de PP con partículas de Cu, las técnicas empleadas fueron electrodeposición selectiva, serigrafía y pulverización con arco de alambre (*wire arc spray coating*) (Sarafpour et al., 2016). A pesar de mostrar buena efectividad para recubrir textiles, el estudio concluye que el combinar tres técnicas eleva la complejidad de su uso.

En este estudio, la uniformidad de los nanorecubrimientos AgCu, ZnO y TiO₂ sobre el PP fue comprobada mediante microscopía óptica. Las imágenes microscópicas mostraron que las fibras no experimentaron cambios importantes en su morfología ni en su tamaño después del depósito, manteniéndose comparables en estos aspectos al control de PP sin recubrimiento. En el caso del textil recubierto con AgCu, la información sobre la homogeneidad en el depósito de AgCu sobre las fibras de PP se complementó mediante SEM, donde también se apreciaron fibras uniformes.

La composición elemental del nanorecubrimiento de AgCu se analizó mediante las técnicas de EDS y XPS. El análisis con EDS confirmó la presencia y porcentaje de la composición elemental de la Ag y del Cu, mientras que con el XPS se detectó la composición superficial de Ag y Cu en alta resolución, detectando los orbitales Ag3d y Cu2p, respectivamente. Estos resultados coinciden con los espectros mencionados en la literatura, donde las señales más prominentes para la Ag y el Cu han sido Ag3d_{5/2} y Cu2p_{3/2} (Taner et al., 2011).

Mientras que en el análisis de la composición superficial del nanorecubrimiento de ZnO obtenido por XPS, se identificaron los elementos característicos del ZnO en las regiones de Zn2p y O1s, lo cual es similar a los hallazgos descritos por otros autores (Al-Gaashani et al., 2013). Con respecto a la composición superficial identificada para el nanorecubrimiento de TiO₂, se apreciaron las regiones de enlace Ti2p y O1s, característico de este óxido metálico (Jeong et al., 2004; Nezar et al., 2017). En el caso de los nanorecubrimientos de ZnO y TiO₂ se denominaron “subesquemeométricos” (ZnO_x y TiO_{2x}), debido a que los depósitos se realizaron sobre textiles de PP por medio de la técnica de magnetron sputtering y por las propiedades del textil no fue factible aumentar la temperatura a 200 - 400 °C durante los depósitos (Rodil et al., 2023) ya que el PP tiene un punto de fusión de 160 °C (Zhu & Yang, 2007).

Respecto al análisis de la mojabilidad de los nanorecubrimientos depositados sobre PP, los resultados mostraron que los tres tipos de nanorecubrimientos aumentaron la hidrofobicidad en comparación con el textil de PP sin recubrimiento. El hecho de que los tres tipos de nanorecubrimientos aumenten la hidrofobicidad del textil es favorable, ya que, en los EPP como los cubrebocas o batas quirúrgicas se busca que la tela no absorba gotas contaminadas con partículas virales y/o bacterianas (Irzmańska et al., 2022).

Respecto a la liberación de los iones metálicos en los tres tipos de nanorecubrimiento a las 24 h de exposición en agua o media, la liberación de iones detectada se encontró por debajo de los límites permitidos en agua potable que inducen citotoxicidad (**Tabla 5**).

Tabla 5. Liberación de iones metálicos de los nanorecubrimientos comparado con los límites de citotoxicidad descritos en otras investigaciones.

Nano recubrimiento	Iones metálicos liberados	Concentración (ppm) de iones metálicos liberados de los nanorecubrimientos a las 24 h		Concentración límite permitida en agua potable	Referencias
		Agua	Medio de cultivo		
AgCu	Ag ⁺	0.040	0.60	Ag ⁺ y Cu ²⁺ < 1ppm	(Council et al., 2000; Tran et al., 2013; Wu et al., 2012; Yamamoto et al., 1998).
	Cu ²⁺	0.240	0.70		
ZnO	Zn ²⁺	1.88	2.58	Zn < 5 ppm	(ATSDR, 2005).
TiO ₂	Ti ⁴⁺	0.12	0.44	Ti < 2 ppm	(Jin et al., 2022; Zhu et al., 2018).

De manera general, en los tres tipos de nanorecubrimientos al estar inmersos en el medio de cultivo TSB, se observó una mayor liberación de iones metálicos en comparación

con el agua. Esto último podría ser atribuido a diversas razones; la interacción de los iones metálicos con los nutrientes que componen al TSB como triptona, peptona de caseína, NaCl y glucosa que podrían favorecer la liberación de iones Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ti^{4+} , en comparación con el agua destilada. Además, la viscosidad del TSB podría proporcionar una mayor interacción entre los iones metálicos y los componentes del medio, promoviendo así mayor liberación de estos iones (Ng, 2020; Rewak-Soroczynska et al., 2022).

En cuanto a las propiedades antibacterianas de los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO_2 evaluados contra bioaerosoles y mediante contacto directo con gotas que contenían bacterias patógenas, se observó un notable potencial antimicrobiano en la mayoría de las especies aerobias y anaerobias evaluadas, con especial eficacia contra las bacterias anaerobias.

En el caso del nanorecubrimiento de AgCu, su capacidad antibacteriana coincide con diversas publicaciones en las que describen que la Ag y Cu tanto de manera individual o en combinación bimetálica en tamaños micro y nanométricos, tienen un alto efecto bactericida (Fan et al., 2021; Vaidya et al., 2017). Se ha demostrado que el potencial antimicrobiano de la Ag y el Cu es más efectivo comparándolos con otros materiales como Al, Zr y Ti frente a cepas Gram negativas como *E. coli* (Mihut et al., 2019) y *P. aeruginosa* (Hsu & Wu, 2019). Del mismo modo, se ha observado un buen efecto antibacteriano utilizando recubrimientos de CuAg (65-35 at %) contra *S. aureus* (Dinca et al., 2020). Más recientemente se evaluó la efectividad bactericida de un nanorecubrimiento de AgCu (SakCu®) frente a bacterias patógenas asociadas a neumonía (ESKAPE) como *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* y *S. aureus*, obtenidas a partir de aislados clínicos (Bello-Lopez et al., 2021).

Respecto a los resultados obtenidos con el nanorecubrimiento de ZnO, éste mostró favorable actividad antibacteriana tanto por contacto directo como con los bioaerosoles. Nuestros resultados son congruentes con la literatura, ya que el ZnO sintetizado en forma

de nanopartículas o nanorecubrimientos ha mostrado reducir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo cepas que representan un problema importante en las infecciones nosocomiales como *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y orales como *S. mutans* y *P. gingivalis* (Álvarez-Chimal et al., 2021; Álvarez-Chimal et al., 2022; Emami-Karvani & Chehrazi, 2012; Kachoei et al., 2016; Prado-Prone et al., 2018). Este potencial antibacteriano del ZnO sugiere que podría ser utilizado para combatir los bioaerosoles dentales que se generan durante los procedimientos médicos y dentales y son causantes de diversas infecciones como COVID-19 (Deogade & Naitam, 2021; Kim et al., 2022).

En el caso de los resultados obtenidos cuando se estudió el nanorecubrimiento de TiO₂, este nanorecubrimiento fue el que presentó menor efecto antibacteriano. Aun así, los resultados mostraron una inhibición significativa del crecimiento microbiano de diversas especies cuando se probaron en aerosoles, pero más aún cuando se evaluaron por contacto directo (gota) donde las bacterias tuvieron mayor tiempo en contacto (24 h) con el nanorecubrimiento demostrando que el TiO₂. En la literatura, ha sido ampliamente estudiado que el TiO₂, tiene un potencial antibacteriano además de sus reconocidas propiedades biocompatibles (Chouirfa et al., 2019; Ferraris & Spriano, 2016) por lo que diversos biomateriales son manufacturados utilizando este óxido metálico. Raju y cols. desarrollaron un recubrimiento de TiO₂ sobre resina acrílica utilizada en dentaduras. Sus resultados mostraron que este recubrimiento era capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos como *S. aureus* y *Streptococcus sanguinis*, asociados a la formación de biopelículas (Raju et al., 2022).

Otras investigaciones han comprobado las propiedades antibacterianas del TiO₂ cuya capacidad bactericida se potencia al ser activado con luz UV, induciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kumaravel et al., 2021; Yadav et al., 2016). Más aún, se ha demostrado que en ausencia de luz, el TiO₂ también puede tener efectos

antibacterianos, aunque con menor efectividad, debido a la liberación de iones metálicos que contribuyen a su acción antimicrobiana (Erdem et al., 2015). Un grupo de investigación evaluó el efecto antimicrobiano del TiO_2 con y sin activación del efecto fotocatalítico contra *E. coli*. Los resultados mostraron que con y sin activación fotocatalítica se logró la inhibición del crecimiento bacteriano, aunque el efecto antimicrobiano fue más rápido con activación de la fotocatalisis (Verdier et al., 2014). Otra investigación combinó recubrimientos de TiO_2 con NPs de hierro mostrando actividad bactericida en condiciones de oscuridad contra especies Gram positivas como *S. aureus*, aunque no en especies Gram negativas como *E. coli* (Tian et al., 2014).

En relación con la evaluación antiviral, se utilizaron los bacteriófagos PaMx54, PaMx60, PaMx61 y PhiX174 como modelos sustitutos de virus respiratorios que afectan células eucariontes; como los norovirus (NoV) (Dawson et al., 2005), virus H1N1, H5N1 (Coulliette et al., 2014), SARS-CoV-2 (Fedorenko et al., 2020) y otros virus entéricos humanos como el enterovirus D68 (Kim et al., 2017). En los últimos años ha aumentado el uso de bacteriófagos como sustitutos virales para investigar las propiedades antivirales de diferentes agentes, incluido su uso para evaluación de bioaerosoles (Turgeon et al., 2014), debido a que no representan un riesgo de infección a seres humanos (Fedorenko et al., 2020).

Los resultados de los ensayos antivirales por contacto directo (gota), específicamente con los nanorecubrimientos de AgCu y ZnO mostraron su capacidad de inactivar la totalidad del título viral en cortos periodos de tiempo contra los bacteriófagos de RNA (PaMx54, PaMx60 y PaMx61). Y aunque el TiO_2 no inactivo a los virus de RNA en corto tiempo, se observó una inactivación significativa tras 24 h de contacto. El hecho de que los fagos de RNA fueran totalmente inactivados (AgCu a las 2 h de contacto, ZnO a las 12 h de contacto y TiO_2 a las 24 h de contacto) con una reducción mayor a 7 \log_{10} , es un resultado

importante, debido a que con una reducción de 4 o más \log_{10} se considera que el material evaluado posee alto potencial antiviral (Ruppach, 2013).

Este potencial virucida del nanorecubrimiento de AgCu, concuerda con las investigaciones donde han utilizado iones de Cu y Ag contra fagos de RNA como el MS2 (Soliman et al., 2020) y Phi6 (Molan et al., 2022) que fueron inactivados en su totalidad. Adicionalmente, el efecto del nanorecubrimiento de AgCu contra el SARS-CoV-2 donde se inactivo el 100 % del título viral en menos de 24 h, confirma su efectividad contra virus de RNA (Bello-Lopez et al., 2021).

En el caso del nanorecubrimiento de ZnO, también se observó un potencial antiviral tanto en los ensayos de contacto directo como en bioaerosoles. En el ensayo utilizando aerosoles virales (que representa un breve periodo de contacto), el nanorecubrimiento de ZnO mostró la capacidad de inactivar aproximadamente el 40% de los virus RNA evaluados. Más aún, cuando se utilizó la prueba de contacto directo con gotas (que representa un mayor tiempo de contacto), el nanorecubrimiento de ZnO mostró una inactivación total de los mismos virus después de 12 horas de contacto. De manera similar, en otra investigación, se comparó el efecto de un nanorecubrimiento de ZnO contra virus de RNA como el SARS-CoV-2, el cual fue inactivado al 99% tras 24 h de contacto (Primo et al., 2022). También se ha estudiado el potencial de nanopartículas ZnO como agente antiviral para una potencial aplicación en cubrebocas y EPP contra virus subrogados del SARS-CoV-2 como el virus TGEV "*Transmissible gastroenteritis virus*", los resultados de dicho estudio mostraron una reducción de 3 \log_{10} del título viral entre 10-30 min de contacto (Gonzalez et al., 2021). En otra investigación se evaluó la capacidad antiviral de NPs-ZnO embebidas en PP, utilizando al bacteriófago MS2 como modelo viral subrogante, los resultados mostraron una buena efectividad de inactivación viral (reducción de 4-6 \log_{10}) (Ferreira et al., 2023). Mientras que, Gopal y cols. investigaron el efecto antiviral del Zn embebido en poliamida, el cual logró

inactivar en $2 \log_{10}$ (más del 90%) el virus SARS-CoV-2 así como el virus de la influenza (Gopal et al., 2021).

Respecto a la efectividad antiviral del nanorecubrimiento de TiO_2 , los resultados obtenidos utilizando la metodología con aerosoles virales y la de contacto directo (gota) fueron contrastantes. Por una parte, no se logró inactivar significativamente ninguno de los virus evaluados con la metodología de corto tiempo de interacción (aerosoles). Sin embargo, en la metodología de contacto directo (gota) de mayor tiempo de interacción, los virus de RNA evaluados (PaMX54, PaMx60 y PaMx61), fueron susceptibles a las 24 h de contacto con el nanorecubrimiento de TiO_2 , obteniendo una inactivación entre el 90-100%. Este potencial antiviral del TiO_2 contra virus de RNA fue similar en otra investigación donde por medio de nanotubos o NPs- TiO_2 tanto en condiciones de oscuridad y/o incidiendo luz UV se inactivó el bacteriófago Q-beta (subrogante de virus de RNA envueltos) (Baudys et al., 2024).

Por otro lado, en este estudio, la efectividad antiviral de los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO_2 contra el fago de DNA (PhiX174) fue nula en el caso del nanorecubrimiento de ZnO y TiO_2 y muy baja con el nanorecubrimiento de AgCu. En la literatura se han descrito resultados similares estudiando la capacidad virucida de los iones Cu^{2+} , Ag^+ y de nanopartículas de hierro contra virus subrogantes de DNA (PhiX174), mencionando que los virus de DNA fueron menos sensibles que los virus de RNA (Soliman et al., 2020). Además, recientemente se evaluaron los subtipos 16 y 18 del virus del papiloma humano (VPH) que tampoco mostraron ser susceptibles al nanorecubrimiento de AgCu (Bello-Lopez et al., 2021). En el caso del nanorecubrimiento de ZnO que no inactivó al fago de DNA (PhiX174) en aerosoles ni en contacto directo (gota) podría estar asociado a que algunos virus de DNA son resistentes al ZnO. Esta observación coincide con los resultados de un estudio en el que se desarrolló una nanoformulación que contenía NPs-ZnO, el cual mostró una eficacia mayor contra los virus RNA (H1N1 y HCoV-229E) en

comparación con los virus de DNA (HSV-2 y Ad-7), respectivamente (AbouAitah et al., 2021). Estos hallazgos indican colectivamente que las formulaciones basadas en ZnO, incluida la nanocapa de ZnO, muestran una mejor actividad antiviral contra los virus RNA que contra los virus de DNA. Por otro lado, una ventana de oportunidad se ha abierto a este respecto, ya que se ha reportado que la capacidad infectiva de ciertos bacteriófagos de DNA como PB10 y PA19, puede ser potencializada con NPs-ZnO, actuando como un sistema antibacteriano más efectivo contra biopelículas de *P. aeruginosa* (Alipour-Khezri et al., 2024).

Con relación al nanorecubrimiento de TiO₂ contra el fago de DNA (PhiX174), este nanorecubrimiento no mostró efectividad antiviral con ninguna de las metodologías aplicadas. De manera contraria a esta investigación, un estudio reportó un alto potencial antiviral de un nanorecubrimiento amorfo subesquemeométrico de TiO₂ (TiO_{2x}) depositado con la técnica de magnetron sputtering, contra el baculovirus (virus DNA bicatenario que infecta artrópodos) (Mittireddi et al., 2021).

Finalmente, el hecho de que el virus de DNA haya sido menos sensible que los fagos de RNA probados en este estudio, podría atribuirse a la naturaleza y estructura de la molécula de RNA, ya que puede desestabilizarse más fácil que la molécula de DNA que es mucho más estable (Minchin & Lodge, 2019).

En lo que respecta al mecanismo de acción de los nanomateriales metálicos y óxidos metálicos sobre bacterias y virus, se ha reportado que la nanocapa AgCu puede promover la oxidación de los fosfolípidos presentes tanto en las membranas de virus y bacterias, generando la exposición y ruptura de la membrana ocasionando daño del material genético de los virus y bacterias (Bello-Lopez et al., 2021). Otro de los mecanismos antimicrobianos más eficaces de las superficies que contienen Cu es el denominado "contact killing", que consiste en el daño en corto tiempo de bacterias y virus en las superficies de Cu, debido a los iones de Cu que afectan de manera simultánea al

microorganismo, ocasionando la muerte celular o la inactivación viral (Chatterjee et al., 2014; Grass et al., 2011; Vincent et al., 2018).

El principal mecanismo antimicrobiano de la nanocapa de ZnO, podría atribuirse a la liberación de iones Zn^{2+} (Puspasari et al., 2022). En especies bacterianas, estos iones metálicos podrían causar un efecto bactericida, ya que los iones Zn^{2+} pueden entrar en las células bacterianas y formar interacciones con grupos funcionales como los grupos sulfhídrico, amino e hidroxilo, alterando la homeostasis celular, provocando un desequilibrio en los procesos metabólicos bacterianos y causando la muerte celular (Qi et al., 2017). Por otro lado, las bacterias pueden ser atraídas a la superficie de la nanocapa de ZnO debido a interacciones electrostáticas o a interacciones atractivas de Van der Waals entre el ZnO y las bacterias; dicha atracción podría deformar la membrana bacteriana (Puspasari et al., 2022). También se ha mencionado que los ácidos teicoicos y lipoteicoicos presentes en la envoltura celular de las bacterias Gram positivas, sirven como agentes quelantes para el Zn^{2+} donde el agente quelante es transportado al interior de la célula (Mendes et al., 2022). Un tercer mecanismo de daño de la membrana bacteriana es la peroxidación lipídica debida al proceso de transporte de electrones entre la superficie de ZnO y la membrana que ocasiona la ruptura de esta estructura, así como cambios conformacionales de las proteínas y la degradación del DNA (Hoseinzadeh et al., 2017; Raghunath & Perumal, 2017). Teniendo esto en cuenta, en el caso de virus como SARS-CoV-2, otros estudios demostraron que los iones Zn^{2+} podían unirse a proteínas como la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y la proteinasa 3C-like (3CL), que son necesarias para la replicación viral (Pormohammad et al., 2021). Además, los iones Zn^{2+} bloquean el metabolismo de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), implicada en la infectividad de los virus RNA (McPherson et al., 2020; Speth et al., 2014).

Respecto al TiO_2 uno de los principales mecanismos de acción antimicrobiana descritos en la diversas investigaciones, hacen referencia a su capacidad fotocatalítica que

conduce a la generación de ROS (Verdier et al., 2014). Incluso en ausencia de luz UV, pequeñas cantidades de ROS, como el peróxido de hidrógeno o los radicales libres, pueden generarse en la superficie del TiO₂ ocasionando un daño en las estructuras superficiales como lípidos, proteínas e inclusive llega a afectar al material genético, afectando tanto virus y bacterias (Carol López de et al., 2020). Otro mecanismo de acción ampliamente reconocido es la liberación de iones metálicos Ti⁴⁺, los cuales tienen una alta afinidad por las superficies de las membrana celulares, que suelen tener carga negativa. Estos iones no solo se adhieren a la membrana, sino que también pueden generar ROS, que contribuyen a la disrupción de la membrana celular microbiana (Yougbaré et al., 2021; Zhang et al., 2017). Una vez dañada la membrana, se produce su ruptura, lo que expone y afecta a las estructuras celulares. A pesar de que los iones Ti⁴⁺ del TiO₂ generan un efecto antimicrobiano menor en comparación con los iones de Ag⁺, Cu²⁺ o Zn²⁺, la acumulación excesiva de metales o iones metálicos es tóxico para las células bacterianas (Li et al., 2012; Shang et al., 2022).

De manera general, en los tres nanorecubrimientos (AgCu, ZnO y TiO₂) las tasas de inactivación de los fagos de RNA PaMx54, 60 y 61 (*Fiersvirus*) fueron superiores a las del fago DNA PhiX174 (*Microvirus*). Y aunque se desconocen los mecanismos antivirales exactos de los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂, algunas posibles explicaciones de este fenómeno podrían atribuirse al impacto de los iones metálicos liberados para reducir la infectividad viral al adherirse a su superficie, bloqueando la infección viral o desactivando las partículas virales al alterar el genoma viral y las proteínas de la cápside (Bertram et al., 2011; Glowacka et al., 2011; Kumar et al., 2018; Pasquet, Chevalier, Pelletier, et al., 2014; Shereen et al., 2020). A este respecto, es importante considerar que los virus de RNA (*Fiersvirus*) tienen un genoma lineal de ssRNA y sólo dos proteínas estructurales (1 copia de la proteína de maduración y 180 copias de la proteína de la cubierta), mientras que los virus de DNA (*Microvirus*) tienen un genoma circular de ssDNA y seis proteínas

estructurales (60 copias de cada una de las proteínas F, G y J; y 12 copias de la proteína H) (Kirchberger & Ochman, 2023; van den Worm et al., 2006). Por tanto, el tipo de genoma y la complejidad de las proteínas estructurales virales podrían estar asociados a las tasas de inactivación por iones metálicos.

Finalmente, cabe remarcar que los textiles de PP se utilizan habitualmente para fabricar equipos de protección médica debido a sus propiedades superficiales, como hidrofobicidad o porosidad, que mejoran su eficacia de filtración. Sin embargo, los textiles de PP no tienen propiedades antimicrobianas en sí mismos y una vez contaminados, pueden albergar microorganismos infecciosos durante largos periodos de tiempo, convirtiéndose en nichos de contaminación (Kasloff et al., 2021). El potencial antimicrobiano de los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂ sugiere nuevas posibilidades para su uso en diversas aplicaciones biomédicas como protección adicional frente a patógenos bacterianos y víricos. Entre ellas se incluyen los entornos sanitarios, los equipos de protección del personal, los sistemas de purificación del aire y otros entornos de alto riesgo.

IX. CONCLUSIONES

Depósito y caracterización de los nanorecubrimientos

- Se realizó de manera exitosa el depósito de los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂ mediante la técnica de magnetron sputtering sobre textiles de PP utilizados para la fabricación de EPP como cubrebocas, gorros y batas.
- La caracterización con las técnicas microscópicas, así como EDS, XPS y WCA, permitió observar la homogeneidad de los nanorecubrimientos, comprobar su composición elemental e identificar sus comportamientos hidrofóbicos.

Evaluación antibacteriana

- Los tres tipos de nanorecubrimientos mostraron un efecto importante en la reducción de la viabilidad bacteriana de todas las especies (aerobias y anaerobias) presentes

en aerosoles y también por contacto directo, siendo las bacterias anaerobias, las más susceptibles a la presencia de los nanorecubrimientos.

- El recubrimiento de AgCu logró un mayor efecto antibacteriano, seguido del ZnO y por último el de TiO₂.

Evaluación antiviral

- Los nanorecubrimientos de AgCu y ZnO tuvieron un potencial antiviral contra los bacteriófagos de RNA en cortos periodos de tiempo, mientras que el nanorecubrimiento de TiO₂ logró la inactivación de los virus de RNA hasta las 24 h.
- El efecto de los tres tipos de nanorecubrimientos contra el fago de DNA fue menor que en los virus de RNA.

De manera general se concluye que los nanorecubrimientos de AgCu, ZnO y TiO₂ depositados sobre textiles de PP mediante magnetron sputtering, mostraron un potencial antimicrobiano contra diferentes bacterias patógenas y virus subrogados de importancia médica y odontológica. Siendo el nanorecubrimiento de AgCu el que mayor potencial antimicrobiano mostró, seguido por el de ZnO y el que menor inhibición microbiana logró fue el de TiO₂. Además, en el caso del nanorecubrimiento de AgCu se logró una reducción viral exponencial de virus subrogantes en un corto periodo de tiempo, demostrando su posible potencial antiviral frente a virus respiratorios.

Por tal motivo, los nanorecubrimientos evaluados tienen el potencial para utilizarse como recubrimientos de equipos de protección personal (EPP) como cubrebocas con la finalidad de reducir y prevenir la transmisión de diversas bacterias y virus patógenos transmitidos por aerosoles presentes en consultorios médicos, dentales, así como en clínicas y hospitales.

X. REFERENCIAS

1. Abdel-Karim, R., & Waheed, A. F. (2013). Nanocoatings. In A. Mahmood (Ed.), *Modern Surface Engineering Treatments* (pp. Ch. 6). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/55776>
2. Abedon, S. T. (2008). *Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses* (Vol. 15). Cambridge University Press.
3. AbouAitah, K., Allayh, A. K., Wojnarowicz, J., Shaker, Y. M., Swiderska-Sroda, A., & Lojkowski, W. (2021). Nanof ormulation Composed of Ellagic Acid and Functionalized Zinc Oxide Nanoparticles Inactivates DNA and RNA Viruses. *Pharmaceutics*, 13(12), 2174. <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/12/2174>
4. Ackermann, H.-W. (2009). Phage Classification and Characterization. In M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (pp. 127-140). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13
5. Akhtar, K., Khan, S. A., Khan, S. B., & Asiri, A. M. (2018). Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization. In S. K. Sharma (Ed.), *Handbook of Materials Characterization* (pp. 113-145). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_4
6. Al-Gaashani, R., Radiman, S., Daud, A. R., Tabet, N., & Al-Douri, Y. (2013). XPS and optical studies of different morphologies of ZnO nanostructures prepared by microwave methods. *Ceramics International*, 39(3), 2283-2292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.08.075>
7. Alipour-Khezri, E., Moqadami, A., Barzegar, A., Mahdavi, M., Skurnik, M., & Zarrini, G. (2024). Bacteriophages and Green Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles in Combination Are Efficient against Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Viruses*, 16(6). <https://doi.org/10.3390/v16060897>
8. Álvarez-Chimal, R., García-Pérez, V. I., Álvarez-Pérez, M. A., & Arenas-Alatorre, J. Á. (2021). Green synthesis of ZnO nanoparticles using a *Dysphania ambrosioides* extract. Structural characterization and antibacterial properties. *Materials Science and Engineering: C*, 118, 111540. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111540>
9. Álvarez-Chimal, R., García-Pérez, V. I., Álvarez-Pérez, M. A., Tavera-Hernández, R., Reyes-Carmona, L., Martínez-Hernández, M., & Arenas-Alatorre, J. Á. (2022). Influence of the particle size on the antibacterial activity of green synthesized zinc oxide nanoparticles using *Dysphania ambrosioides* extract, supported by molecular docking analysis. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(6), 103804. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103804>
10. Álvarez-Chimal, R., Rodríguez-Cruz, C., Alvarez-Gayosso, C., & Arenas-Alatorre, J. (2024). Study of ZnO nanoparticle-doped dental adhesives on enamels with fluorosis: Electron microscopy, elemental composition and shear bond strength analysis. *Journal of microscopy*. <https://doi.org/10.1111/jmi.13353>
11. Araki, T. (2017). The history of optical microscope. *Mechanical Engineering Reviews*, 4(1), 16-00242-00216-00242. <https://doi.org/10.1299/mer.16-00242>
12. Aspect, A., & Villain, J. (2017). The birth of wave mechanics (1923–1926). *Comptes Rendus Physique*, 18(9), 583-585. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crhy.2017.10.007>
13. ASTM. (2020). *Surrogates and the fight against COVID-19*. Retrieved 2023 from <https://sn.astm.org/features/surrogates-and-fight-against-covid-19.html>
14. ATSDR, A. f. T. S. a. D. R. (2005). *Toxicological profile for Zinc*. Atlanta, GA: U.S. <https://wwwn.cdc.gov/TSP/PHS/PHS.aspx?phsid=300&toxid=54>

15. Aziz, M., & Ismail, A. F. (2017). Chapter 5 - X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). In N. Hilal, A. F. Ismail, T. Matsuura, & D. Oatley-Radcliffe (Eds.), *Membrane Characterization* (pp. 81-93). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00005-X>
16. Bar-On, Y. M., Flamholz, A., Phillips, R., & Milo, R. (2020). SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife*, 9, e57309. <https://doi.org/10.7554/eLife.57309>
17. Baudys, M., Sopha, H., Hodek, J., Rusek, J., Bartková, H., Ulrychová, L., Macak, J. M., Weber, J., & Krýsa, J. (2024). Inactivation of influenza virus as representative of enveloped RNA viruses on photocatalytically active nanoparticle and nanotubular TiO₂ surfaces. *Catalysis Today*, 430, 114511. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cattod.2024.114511>
18. Becker, M. R., Paster, B. J., Leys, E. J., Moeschberger, M. L., Kenyon, S. G., Galvin, J. L., Boches, S. K., Dewhirst, F. E., & Griffen, A. L. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *Journal of clinical microbiology*, 40(3), 1001-1009.
19. Behzadi, P., Baráth, Z., & Gajdács, M. (2021). It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010042>
20. Bello-Lopez, J. M., Silva-Bermudez, P., Prado, G., Martínez, A., Ibáñez-Cervantes, G., Cureño-Díaz, M. A., Rocha-Zavaleta, L., Manzo-Merino, J., Almaguer-Flores, A., Ramos-Vilchis, C., & Rodil, S. E. (2021). Biocide effect against SARS-CoV-2 and ESKAPE pathogens of a noncytotoxic silver-copper nanofilm. *Biomed Mater*, 17(1). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac3208>
21. Ben-David, A., & Davidson, C. E. (2014). Estimation method for serial dilution experiments. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 214-221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.023>
22. Bertram, S., Glowacka, I., Müller, M. A., Lavender, H., Gnirss, K., Nehlmeier, I., Niemeyer, D., He, Y., Simmons, G., Drosten, C., Soilleux, E. J., Jahn, O., Steffen, I., & Pöhlmann, S. (2011). Cleavage and Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by Human Airway Trypsin-Like Protease. *Journal of Virology*, 85(24), 13363-13372. <https://doi.org/doi:10.1128/jvi.05300-11>
23. Bickley, R. I., Gonzalez-Carreno, T., Lees, J. S., Palmisano, L., & Tilley, R. J. D. (1991). A structural investigation of titanium dioxide photocatalysts. *Journal of Solid State Chemistry*, 92(1), 178-190. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-4596\(91\)90255-G](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-4596(91)90255-G)
24. Bobzin, K., Bagcivan, N., Immich, P., Bolz, S., Alami, J., & Cremer, R. (2009). Advantages of nanocomposite coatings deposited by high power pulse magnetron sputtering technology. *Journal of Materials Processing Technology*, 209(1), 165-170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2008.01.035>
25. Bostanci, N., & Belibasakis, G. N. (2012). *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS microbiology letters*, 333(1), 1-9.
26. Calais, G. B., Rocha Neto, J. B. M., Bataglioli, R. A., Chevalier, P., Tsukamoto, J., Arns, C. W., Mantovani, D., & Beppu, M. M. (2023). Bioactive textile coatings for improved viral protection: A study of polypropylene masks coated with copper salt and organic antimicrobial agents. *Applied Surface Science*, 638, 158112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2023.158112>
27. Calendar, R., & Abedon, S. T. (2006). *The Bacteriophages*. Oxford University Press, USA. <https://books.google.com.mx/books?id=hYcRDAAAQBAJ>
28. Callanan, J., Stockdale, S. R., Shkoporov, A., Draper, L. A., Ross, R. P., & Hill, C. (2018). RNA Phage Biology in a Metagenomic Era. *Viruses*, 10(7), 386. <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/7/386>

29. Cann, A. J. (2008). Replication of Viruses. In B. W. J. Mahy & M. H. V. Van Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of Virology (Third Edition)* (pp. 406-412). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00486-6>
30. Caro, C., Castillo, P. M., Klippstein, R., Pozo, D., & Zaderenko, A. P. (2010). Silver nanoparticles: sensing and imaging applications. *Silver nanoparticles*, 95, 201-224.
31. Carol López de, D., Matias Guerrero, C., Fernanda, B. M., Camilo, S., & Maria José, G. (2020). Antimicrobial Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles. In M. Mihai, L. Swee Hua Erin, L. Kok-Song, & C. Romeo-Teodor (Eds.), *Antimicrobial Resistance* (pp. Ch. 5). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90891>
32. Castillo-Ruiz, M., Vinés, E. D., Montt, C., Fernández, J., Delgado, J. M., Hormazábal, J. C., & Bittner, M. (2011). Isolation of a novel Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotype b bacteriophage capable of lysing bacteria within a biofilm. *Appl Environ Microbiol*, 77(9), 3157-3159. <https://doi.org/10.1128/aem.02115-10>
33. CDC, C. f. D. C. a. P. (2020). *100 Years of Respiratory Protection History*. <https://www.cdc.gov/niosh/npptl/Respiratory-Protection-history.html>
34. Cerkez, I., Worley, S. D., Broughton, R. M., & Huang, T. S. (2013). Antimicrobial surface coatings for polypropylene nonwoven fabrics. *Reactive and Functional Polymers*, 73(11), 1412-1419. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.07.016>
35. Chanishvili, N. (2012). *Literature review of the practical application of bacteriophage research*. Nova Science Publishers, Incorporated.
36. Chappell, J. D., & Dermody, T. S. (2015). Biology of Viruses and Viral Diseases. In J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)* (pp. 1681-1693.e1684). W.B. Saunders. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00134-X>
37. Chatterjee, A. K., Chakraborty, R., & Basu, T. (2014). Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology*, 25(13), 135101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/13/135101>
38. Chouirfa, H., Bouloussa, H., Migonney, V., & Falentin-Daudré, C. (2019). Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta Biomaterialia*, 83, 37-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.036>
39. Chow, E. J., & Mermel, L. A. (2017). Hospital-Acquired Respiratory Viral Infections: Incidence, Morbidity, and Mortality in Pediatric and Adult Patients. *Open Forum Infect Dis*, 4(1), ofx006. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx006>
40. Clarke, J. K. (1924). On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British journal of experimental pathology*, 5(3), 141.
41. Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31-45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
42. Conti, A. A. (2020). Protective face masks through centuries, from XVII century plague doctors to current health care professionals managing the COVID-19 pandemic. *Acta Biomed*, 91(4), e2020124. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i4.10231>
43. Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14, 147-156. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752012000200016&nrm=iso
44. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, 284(5418), 1318-1322.

45. Coulliette, A. D., Perry, K. A., Fisher, E. M., Edwards, J. R., Shaffer, R. E., & Noble-Wang, J. (2014). MS2 Coliphage as a Surrogate for 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus (pH1N1) in Surface Survival Studies on N95 Filtering Facepiece Respirators. *J Int Soc Respir Prot*, 21(1), 14-22.
46. Council, N. R., Sciences, C. o. L., Studies, B. o. E., & Water, C. o. C. i. D. (2000). Copper in drinking water.
47. Cowling, B. J., Ip, D. K. M., Fang, V. J., Suntarattiwong, P., Olsen, S. J., Levy, J., Uyeki, T. M., Leung, G. M., Malik Peiris, J. S., Chotpitayasunondh, T., Nishiura, H., & Mark Simmerman, J. (2013). Aerosol transmission is an important mode of influenza A virus spread. *Nature Communications*, 4(1), 1935. <https://doi.org/10.1038/ncomms2922>
48. da Silva, R. T., de Souza Grilo, M. M., Magnani, M., & de Souza Pedrosa, G. T. (2021). Double-Layer Plaque Assay Technique for Enumeration of Virus Surrogates. In M. Magnani (Ed.), *Detection and Enumeration of Bacteria, Yeast, Viruses, and Protozoan in Foods and Freshwater* (pp. 157-162). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1932-2_14
49. Dawson, D. J., Paish, A., Staffell, L. M., Seymour, I. J., & Appleton, H. (2005). Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus. *J Appl Microbiol*, 98(1), 203-209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02439.x>
50. de la Cruz, F., & Gadd, G. M. (2012). Nanobiotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 23(4), 501-502. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.05.002>
51. del Pozo, J. L., & Patel, R. (2007). The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82(2), 204-209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100247>
52. Deogade, S. C., & Naitam, D. (2021). COVID-19 and dental aerosols: The infection connection. *Avicenna J Med*, 11(2), 107-109. https://doi.org/10.4103/ajm.ajm_185_20
53. Di Gianfrancesco, A. (2017). 8 - Technologies for chemical analyses, microstructural and inspection investigations. In A. Di Gianfrancesco (Ed.), *Materials for Ultra-Supercritical and Advanced Ultra-Supercritical Power Plants* (pp. 197-245). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100552-1.00008-7>
54. Dinca, P., Butoi, B., Lungu, M., Porosnicu, C., Jepu, I., Staicu, C., Lungu, C. P., Niculescu, A., Burducea, I., Trusca, O., Diaconu, M., Cretescu, I., & Soreanu, G. (2020). Antibacterial Efficiency of Stainless-Steel Grids Coated with Cu-Ag by Thermionic Vacuum Arc Method. *Coatings*, 10(4), 322. <https://www.mdpi.com/2079-6412/10/4/322>
55. Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 125-138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
56. Dollwet, H. (1985). Historic uses of copper compounds in medicine. *Trace Elem. Med.*, 2, 80-87.
57. Drewnick, F., Pikmann, J., Fachinger, F., Moormann, L., Sprang, F., & Borrmann, S. (2021). Aerosol filtration efficiency of household materials for homemade face masks: Influence of material properties, particle size, particle electrical charge, face velocity, and leaks. *Aerosol Science and Technology*, 55(1), 63-79. <https://doi.org/10.1080/02786826.2020.1817846>
58. Emami-Karvani, Z., & Chehrizi, P. (2012). Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 5. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.159>
59. Erdem, A., Metzler, D., Cha, D. K., & Huang, C. P. (2015). The short-term toxic effects of TiO2 nanoparticles toward bacteria through viability, cellular respiration, and lipid peroxidation. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), 17917-17924. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5018-1>

60. Fadley, C. S. (2010). X-ray photoelectron spectroscopy: Progress and perspectives. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 178-179, 2-32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.elspec.2010.01.006>
61. Fan, X., Yahia, L. H., & Sacher, E. (2021). Antimicrobial Properties of the Ag, Cu Nanoparticle System. *Biology*, 10(2), 137. <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/2/137>
62. Fedorenko, A., Grinberg, M., Orevi, T., & Kashtan, N. (2020). Survival of the enveloped bacteriophage Phi6 (a surrogate for SARS-CoV-2) in evaporated saliva microdroplets deposited on glass surfaces. *Scientific Reports*, 10(1), 22419. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79625-z>
63. Feng, S. (2018). Introductory Chapter: Basic Theory of Magnetron Sputtering. In S. Dr. Feng (Ed.), *Magnetron Sputtering* (pp. Ch. 4). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80550>
64. Fernandez, M. O., Thomas, R. J., Garton, N. J., Hudson, A., Haddrell, A., & Reid, J. P. (2019). Assessing the airborne survival of bacteria in populations of aerosol droplets with a novel technology. *Journal of The Royal Society Interface*, 16(150), 20180779. <https://doi.org/doi:10.1098/rsif.2018.0779>
65. Ferraris, S., & Spriano, S. (2016). Antibacterial titanium surfaces for medical implants. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 965-978. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.062>
66. Ferreira, T., Vale, A. C., Pinto, A. C., Costa, R. V., Pais, V., Sousa, D., Gomes, F., Pinto, G., Dias, J. G., Moreira, I. P., Mota, C., Bessa, J., Antunes, J. C., Henriques, M., Cunha, F., & Figueiro, R. (2023). Comparison of Zinc Oxide Nanoparticle Integration into Non-Woven Fabrics Using Different Functionalisation Methods for Prospective Application as Active Facemasks. *Polymers*, 15(17), 3499. <https://www.mdpi.com/2073-4360/15/17/3499>
67. Gao, W., & Li, Z. (2004). ZnO thin films produced by magnetron sputtering. *Ceramics International*, 30(7), 1155-1159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2003.12.197>
68. Gessard, C. (1984). On the blue and green coloration that appears on bandages. *Reviews of Infectious Diseases*, 6(Supplement_3), S775-S776.
69. Ghaffari, H., Tavakoli, A., Moradi, A., Tabarraei, A., Bokharaei-Salim, F., Zahmatkeshan, M., Farahmand, M., Javanmard, D., Kiani, S. J., Esghaei, M., Pirhajati-Mahabadi, V., Monavari, S. H., & Ataei-Pirkooh, A. (2019). Inhibition of H1N1 influenza virus infection by zinc oxide nanoparticles: another emerging application of nanomedicine. *J Biomed Sci*, 26(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0563-4>
70. Glowacka, I., Bertram, S., Müller, M. A., Allen, P., Soilleux, E., Pfefferle, S., Steffen, I., Tsegaye, T. S., He, Y., Gnirss, K., Niemeyer, D., Schneider, H., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2011). Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *Journal of Virology*, 85(9), 4122-4134. <https://doi.org/doi:10.1128/jvi.02232-10>
71. Gonzalez, A., Aboubakr, H. A., Brockgreitens, J., Hao, W., Wang, Y., Goyal, S. M., & Abbas, A. (2021). Durable nanocomposite face masks with high particulate filtration and rapid inactivation of coronaviruses. *Sci Rep*, 11(1), 24318. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03771-1>
72. Gopal, V., Nilsson-Payant, B. E., French, H., Siegers, J. Y., Yung, W.-s., Hardwick, M., & Velthuis, A. J. W. (2021). Zinc-Embedded Polyamide Fabrics Inactivate SARS-CoV-2 and Influenza A Virus. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(26), 30317-30325. <https://doi.org/10.1021/acsmi.1c04412>

73. Grass, G., Rensing, C., & Solioz, M. (2011). Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol*, 77(5), 1541-1547. <https://doi.org/10.1128/aem.02766-10>
74. Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 717-725.
75. Harding, H., Broom, A., & Broom, J. (2020). Aerosol-generating procedures and infective risk to healthcare workers from SARS-CoV-2: the limits of the evidence. *Journal of Hospital Infection*, 105(4), 717-725. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.05.037>
76. Harris, L. G., Foster, S. J., & Richards, R. G. (2002). An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur Cell Mater*, 4, 39-60. <https://doi.org/10.22203/ecm.v004a04>
77. Hoseinzadeh, E., Makhdoumi, P., Taha, P., Hossini, H., Stelling, J., Amjad Kamal, M., & Md. Ashraf, G. (2017). A Review on Nano-Antimicrobials: Metal Nanoparticles, Methods and Mechanisms. *Current Drug Metabolism*, 18(2), 120-128. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdm/2017/00000018/00000002/art00007>
78. Hossain, M. T., Shahid, M. A., Mahmud, N., Habib, A., Rana, M. M., Khan, S. A., & Hossain, M. D. (2024). Research and application of polypropylene: a review. *Discover Nano*, 19(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s11671-023-03952-z>
79. Hou, X., Amais, R. S., Jones, B. T., & Donati, G. L. (2016). Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 1-25). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5110.pub3>
80. How, K. Y., Song, K. P., & Chan, K. G. (2016). Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology*, 7, 53-53. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053>
81. How, K. Y., Song, K. P., & Chan, K. G. (2016). Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol*, 7, 53. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053>
82. Hsu, Y.-H., & Wu, W.-Y. (2019). Antibacterial AgCu coatings deposited using an asymmetric bipolar high-power impulse magnetron sputtering technique. *Surface and Coatings Technology*, 362, 302-310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.02.001>
83. Inkson, B. J. (2016). 2 - Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In G. Hübschen, I. Altpeter, R. Tschuncky, & H.-G. Herrmann (Eds.), *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods* (pp. 17-43). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X>
84. Ippolito, M., Vitale, F., Accurso, G., Iozzo, P., Gregoretti, C., Giarratano, A., & Cortegiani, A. (2020). Medical masks and Respirators for the Protection of Healthcare Workers from SARS-CoV-2 and other viruses. *Pulmonology*, 26(4), 204-212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.04.009>
85. Irzmańska, E., Korzeniewska, E., Pawlak, R., Tomczyk, M., Smejda-Krzewicka, A., & Adamus-Włodarczyk, A. (2022). Enhanced Hydrophobicity of Polymers for Personal Protective Equipment Achieved by Chemical and Physical Modification. *Materials*, 15(1), 106. <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/1/106>
86. Jafari, S., Mahyad, B., Hashemzadeh, H., Janfaza, S., Gholikhani, T., & Tayebi, L. (2020). Biomedical Applications of TiO2 Nanostructures: Recent Advances. *Int J Nanomedicine*, 15, 3447-3470. <https://doi.org/10.2147/IJN.S249441>
87. Jagaran, K., & Singh, M. (2020). Nanomedicine for COVID-19: Potential of copper nanoparticles. *Biointerface Res Appl Chem*, 11(3), 10716-10728.

88. Jeong, S.-H., Kim, J.-K., Kim, B.-S., Shim, S.-H., & Lee, B.-T. (2004). Characterization of SiO₂ and TiO₂ films prepared using rf magnetron sputtering and their application to anti-reflection coating. *Vacuum*, 76(4), 507-515. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2004.06.003>
89. Jin, T., Costa, M., & Chen, X. (2022). Chapter 34 - Titanium. In G. F. Nordberg & M. Costa (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals (Fifth Edition)* (pp. 857-868). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822946-0.00030-1>
90. Joseph, J., Baby, H. M., Zhao, S., Li, X.-L., Cheung, K.-C., Swain, K., Agus, E., Ranganathan, S., Gao, J., Luo, J. N., & Joshi, N. (2022). Role of bioaerosol in virus transmission and material-based countermeasures. *Exploration*, n/a(n/a), 20210038. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/EXP.20210038>
91. Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
92. Kachoei, M., Nourian, A., Divband, B., Kachoei, Z., & Shirazi, S. (2016). Zinc-oxide nanocoating for improvement of the antibacterial and frictional behavior of nickel-titanium alloy. *Nanomedicine*, 11(19), 2511-2527. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0171>
93. Kampf, G., Steinmann, J., & Rabenau, H. (2007). Suitability of vaccinia virus and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) for determining activities of three commonly-used alcohol-based hand rubs against enveloped viruses. *BMC Infect Dis*, 7, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-5>
94. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
95. Kasloff, S. B., Leung, A., Strong, J. E., Funk, D., & Cutts, T. (2021). Stability of SARS-CoV-2 on critical personal protective equipment. *Scientific Reports*, 11(1), 984. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80098-3>
96. Kattan, P. (2011). Ratio of Surface Area to Volume in Nanotechnology and Nanoscience.
97. Kelly, P. J., & Arnell, R. D. (2000). Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications. *Vacuum*, 56(3), 159-172. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0042-207X\(99\)00189-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0042-207X(99)00189-X)
98. Khan, S. T., Ahamed, M., Al-Khedhairi, A., & Musarrat, J. (2013). Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation. *Materials Letters*, 97, 67-70.
99. Khandekar, S., Panigrahi, P. K., Lefèvre, F., & Bonjour, J. (2010). Local hydrodynamics of flow in a pulsating heat pipe: a review.
100. Kim, D.-K., Kim, S.-J., & Kang, D.-H. (2017). Inactivation modeling of human enteric virus surrogates, MS2, Qβ, and ΦX174, in water using UVC-LEDs, a novel disinfecting system. *Food Research International*, 91, 115-123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.042>
101. Kim, J.-H., Lee, G.-H., Ma, J., Lee, S., & Su Kim, C. (2022). Facile nanostructured zinc oxide coating technique for antibacterial and antifouling air filters with low pressure drop. *Journal of Colloid and Interface Science*, 612, 496-503. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.12.139>
102. Kirchberger, P. C., & Ochman, H. (2023). Microviruses: A World Beyond phiX174. *Annual Review of Virology*, 10(Volume 10, 2023), 99-118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100120-011239>
103. Klinger, R. (1912). Untersuchungen über menschliche aktinomykose. *Zentralbl. Bakteriol.(Orig)*, 62, 191-200.

104. Knöner, W., & Schultheiss, D. (2003). James Israel (1848-1926). His contribution to oral and maxillofacial surgery. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 7(3), 146-150. <https://doi.org/10.1007/s10006-003-0467-y> (James Israel (1848-1926). Sein Beitrag für die Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.)
105. Konstantinidis, S., Hemberg, A., Dauchot, J. P., & Hecq, M. (2007). Deposition of zinc oxide layers by high-power impulse magnetron sputtering. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena*, 25(3), L19-L21. <https://doi.org/10.1116/1.2735968>
106. Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In *Bacteriophages* (pp. 69-76). Springer.
107. Kumar, R., Sahoo, G., Pandey, K., Nayak, M. K., Topno, R., Rabidas, V., & Das, P. (2018). Virostatic potential of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on capsid protein of cytoplasmic side of chikungunya virus. *International Journal of Infectious Diseases*, 73, 368. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.4247>
108. Kumar, R., Umar, A., Kumar, G., & Nalwa, H. S. (2017). Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review. *Ceramics International*, 43(5), 3940-3961. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.12.062>
109. Kumaravel, V., Nair, K. M., Mathew, S., Bartlett, J., Kennedy, J. E., Manning, H. G., Whelan, B. J., Leyland, N. S., & Pillai, S. C. (2021). Antimicrobial TiO₂ nanocomposite coatings for surfaces, dental and orthopaedic implants. *Chemical Engineering Journal*, 416, 129071. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129071>
110. Kwok, D. Y., & Neumann, A. W. (1999). Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 81(3), 167-249. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00087-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00087-6)
111. La Rosa, G., Fratini, M., Della Libera, S., Iaconelli, M., & Muscillo, M. (2013). Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. *Ann Ist Super Sanita*, 49(2), 124-132. https://doi.org/10.4415/ann_13_02_03
112. Lambert, A. (2017). Does the use of personal protective equipment (PPE) while examining patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) decrease the incidence of nosocomial transmission in the hospital setting? *Evidence-Based Practice*, 20(6), 14. <https://doi.org/10.1097/01.EBP.0000541740.44585.b1>
113. Leggat, P. A., & Kedjarune, U. (2001). Bacterial aerosols in the dental clinic: a review. *International Dental Journal*, 51(1), 39-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1875-595X.2001.tb00816.x>
114. Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J., & Brady, L. J. (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology spectrum*, 7(1), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018>
115. Li, K., Chen, Y., Zhang, W., Pu, Z., Jiang, L., & Chen, Y. (2012). Surface interactions affect the toxicity of engineered metal oxide nanoparticles toward *Paramecium*. *Chemical research in toxicology*, 25(8), 1675-1681.
116. Licitra, G. (2013). *Etymologia: Staphylococcus*. *Emerg Infect Dis*. 2013 Sep;19(9):1553. doi: 10.3201/eid1909.ET1909.
117. Lim, J. Y., Yoon, J., & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol*, 20(1), 5-14.
118. Liou, J. W., & Chang, H. H. (2012). Bactericidal effects and mechanisms of visible light-responsive titanium dioxide photocatalysts on pathogenic bacteria. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 60(4), 267-275. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0178-x>

119. Lipovsky, A., Gedanken, A., Nitzan, Y., & Lubart, R. (2011). Enhanced inactivation of bacteria by metal-oxide nanoparticles combined with visible light irradiation. *Lasers Surg Med*, 43(3), 236-240. <https://doi.org/10.1002/lsm.21033>
120. Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 22(4), 582-610. <https://doi.org/10.1128/cmr.00040-09>
121. Liu, Y.-y., Yuan, Y.-z., Gao, X.-t., Yan, S.-s., Cao, X.-z., & Wei, G.-x. (2007). Deposition of ZnO thin film on polytetrafluoroethylene substrate by the magnetron sputtering method. *Materials Letters*, 61(23), 4463-4465. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.02.020>
122. Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological reviews*, 50(4), 353-380.
123. Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H., & Chen, R. (2013). Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(6), 1465-1471. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4894-5>
124. Luther, W., Nass, R., Schuster, F., Kallio, M., & Lintunen, P. (2004). Industrial application of nanomaterials-changes and risks: Technology analysis.
125. Lyell, A. (1989). Alexander Ogston, micrococci, and Joseph Lister. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 20(2, Part 1), 302-310. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(89\)70035-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0190-9622(89)70035-9)
126. Lynteris, C. (2018). Plague Masks: The Visual Emergence of Anti-Epidemic Personal Protection Equipment. *Med Anthropol*, 37(6), 442-457. <https://doi.org/10.1080/01459740.2017.1423072>
127. Machado, G. T., Pinto, C. R. C., da Fonseca, L. A. V., Ramos, T., Paggi, T. F. P., & Spira, B. (2021). Bacteriophages as surrogates for the study of viral dispersion in open air. *Arch Microbiol*, 203(7), 4041-4049. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02382-8>
128. Mancera, G. G., & Amaya, M. E. N. (2006). *Principios de microscopía electrónica de barrido y microanálisis por rayos X característicos*. UNAM, Facultad de Química. <https://books.google.com.mx/books?id=Moo5QwAACAAJ>
129. Martín, R., Miquel, S., Langella, P., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2014). The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. 5(3), 413-423. <https://doi.org/10.4161/viru.27864>
130. Mathews, S., Kumar, R., & Solioz, M. (2015). Copper Reduction and Contact Killing of Bacteria by Iron Surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 81(18), 6399-6403. <https://doi.org/10.1128/aem.01725-15>
131. Mazarakioti, E. C., Zotos, A., Thomatou, A.-A., Kontogeorgos, A., Patakas, A., & Ladavos, A. (2022). Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS), a Useful Tool in Authenticity of Agricultural Products' and Foods' Origin. *Foods*, 11(22), 3705. <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/22/3705>
132. McAlister, M., Aranha, H., & Larson, R. (2004). Use of bacteriophages as surrogates for mammalian viruses. *Dev Biol (Basel)*, 118, 89-98.
133. McMullan, D. (1995). Scanning electron microscopy 1928–1965. *Scanning*, 17(3), 175-185. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/sca.4950170309>
134. McPherson, S. W., Keunen, J. E., Bird, A. C., Chew, E. Y., & Van Kuijk, F. J. (2020). Investigate oral zinc as a prophylactic treatment for those at risk for COVID-19. *American journal of ophthalmology*, 216, A5.

135. Melo, M. A. (2020). Bacterial Interactions with Dental and Medical Materials. *J Funct Biomater*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/jfb11040083>
136. Mendes, C. R., Dilarri, G., Forsan, C. F., Sapata, V. d. M. R., Lopes, P. R. M., de Moraes, P. B., Montagnolli, R. N., Ferreira, H., & Bidoia, E. D. (2022). Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. *Scientific Reports*, 12(1), 2658. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06657-y>
137. Mermet, J.-M. (2006). Fundamental Principles of Inductively Coupled Plasmas. In *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications* (pp. 27-60). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470988794.ch2>
138. Mihut, D. M., Afshar, A., Lackey, L. W., & Le, K. N. (2019). Antibacterial effectiveness of metallic nanoparticles deposited on water filter paper by magnetron sputtering. *Surface and Coatings Technology*, 368, 59-66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.04.039>
139. Minchin, S., & Lodge, J. (2019). Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem*, 63(4), 433-456. <https://doi.org/10.1042/ebc20180038>
140. Mittireddi, R. T., Patel, N. M., Gautam, A. R. S., Soppina, V., & Panda, E. (2021). Non-stoichiometric amorphous TiO_x as a highly reactive, transparent anti-viral surface coating. *Journal of Alloys and Compounds*, 881, 160610. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.160610>
141. Molan, K., Rahmani, R., Krklec, D., Brojan, M., & Stopar, D. (2022). Phi 6 Bacteriophage Inactivation by Metal Salts, Metal Powders, and Metal Surfaces. *Viruses*, 14(2), 204. <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/2/204>
142. Morquecho-Marín, D., Silva-Bermudez, P., Millán-Ramos, B., Victoria-Hernández, J., Letzig, D., Ramírez-Ortega, D., Depablos-Rivera, O., García-López, J., Barrera-Ortega, C. C., & Rodil, S. E. (2020). Unexpected cytotoxicity of TiO₂-coated magnesium alloys. *Materials Letters*, 276, 128236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.128236>
143. Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J., & Duskova, J. (2014). *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research*, 2014, 476068. <https://doi.org/10.1155/2014/476068>
144. Nakano, K., & Ooshima, T. (2009). Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future microbiology*, 4(7), 891-902.
145. Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Soufi, G. J., Iravani, S., & Varma, R. S. (2020). Nanomaterials and nanotechnology-associated innovations against viral infections with a focus on coronaviruses. *Nanomaterials*, 10(6), 1072.
146. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201. <https://doi.org/doi:10.1128/CMR.11.1.142>
147. Nature-education. (2014). *Definition Virus*. Retrieved 10/05/2023 from <https://www.nature.com/scitable/definition/virus-308/>
148. Newman, M. G., Socransky, S. S., Savitt, E. D., Propas, D. A., & Crawford, A. (1976). Studies of the microbiology of periodontosis. *Journal of periodontology*, 47(7), 373-379.
149. Nezar, S., Saoula, N., Sali, S., Faiz, M., Mekki, M., Laoufi, N. A., & Tabet, N. (2017). Properties of TiO₂ thin films deposited by rf reactive magnetron sputtering on biased substrates. *Applied Surface Science*, 395, 172-179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.08.125>
150. Ng, W. (2020). ICP-MS analysis of metal and metalloid concentrations of common microbiological growth media reveals presence of heavy metals. *bioRxiv*, 2020.2009.2025.313221. <https://doi.org/10.1101/2020.09.25.313221>

151. Nghiem, L. D., Iqbal, H. M. N., & Zdarta, J. (2021). The shadow pandemic of single use personal protective equipment plastic waste: A blue print for suppression and eradication. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 4, 100125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100125>
152. Nørskov-Lauritsen, N., Claesson, R., Birkeholm Jensen, A., Åberg, C. H., & Haubek, D. (2019). *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*: Clinical Significance of a Pathobiont Subjected to Ample Changes in Classification and Nomenclature. *Pathogens*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens8040243>
153. Nørskov-Lauritsen, N., & Kilian, M. (2006). Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(9), 2135-2146.
154. Novik, G., Ladutska, A., & Rakhuba, D. (2017). Bacteriophage taxonomy and classification.
155. Ochoa, T. J., & Contreras, C. A. (2011). Enteropathogenic escherichia coli infection in children. *Curr Opin Infect Dis*, 24(5), 478-483. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b>
156. OSHA. (2010). *Personal Protective Equipment*. Retrieved 24 october 2022 from <https://www.osha.gov/personal-protective-equipment>
157. Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. *Nature reviews. Microbiology*, 7(8), 555-567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
158. Palmieri, V., De Maio, F., De Spirito, M., & Papi, M. (2021). Face masks and nanotechnology: Keep the blue side up. *Nano Today*, 37, 101077. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101077>
159. Pasquet, J., Chevalier, Y., Couval, E., Bouvier, D., Noizet, G., Morlière, C., & Bolzinger, M.-A. (2014). Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 460(1), 92-100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.10.031>
160. Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D., & Bolzinger, M.-A. (2014). The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457, 263-274. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.05.057>
161. Pinto, G., Silva, M. D., Peddey, M., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). The role of bacteriophages in periodontal health and disease. *Future microbiology*, 11(10), 1359-1369.
162. Pirozzi, N. M., Kuipers, J., & Giepmans, B. N. G. (2021). Chapter 5 - Sample preparation for energy dispersive X-ray imaging of biological tissues. In T. Müller-Reichert & P. Verkade (Eds.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 162, pp. 89-114). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.10.023>
163. Pormohammad, A., Monych, N. K., & Turner, R. J. (2021). Zinc and SARS-CoV-2: A molecular modeling study of Zn interactions with RNA-dependent RNA-polymerase and 3C-like proteinase enzymes. *International journal of molecular medicine*, 47(1), 326-334.
164. Potts, T. V., Mitra, T., O'Keefe, T., Zambon, J. J., & Genco, R. J. (1986). Relationships among isolates of oral haemophili as determined by DNA-DNA hybridization. *Archives of microbiology*, 145, 136-141.
165. Prado-Prone, G., Silva-Bermudez, P., Almaguer-Flores, A., García-Macedo, J. A., García, V. I., Rodil, S. E., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2018). Enhanced antibacterial

- nanocomposite mats by coaxial electrospinning of polycaprolactone fibers loaded with Zn-based nanoparticles. *Nanomedicine*, 14(5), 1695-1706. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.04.005>
166. Prado-Prone, G., Silva-Bermudez, P., Rodil, S. E., Ganjkhani, Y., Moradi, A. R., Mendez, F. J., Garcia-Macedo, J. A., Bazzar, M., & Almaguer-Flores, A. (2023). ZnO nanoparticles-modified polycaprolactone-gelatin membranes for guided/bone tissue regeneration, antibacterial and osteogenic differentiation properties. *Biomed Phys Eng Express*, 9(3). <https://doi.org/10.1088/2057-1976/acbe47>
 167. Prakash, J., Cho, J., & Mishra, Y. K. (2022). Photocatalytic TiO₂ nanomaterials as potential antimicrobial and antiviral agents: Scope against blocking the SARS-COV-2 spread. *Micro and Nano Engineering*, 14, 100100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mne.2021.100100>
 168. Primo, J. d. O., Correa, J. d. S., Horsth, D. F. L., Das, A., Zając, M., Umek, P., Wattiez, R., Anaissi, F. J., Onderwater, R. C. A., & Bittencourt, C. (2022). Antiviral Properties against SARS-CoV-2 of Nanostructured ZnO Obtained by Green Combustion Synthesis and Coated in Waterborne Acrylic Coatings. *Nanomaterials*, 12(23), 4345. <https://www.mdpi.com/2079-4991/12/23/4345>
 169. Pushpalatha, C., Suresh, J., Gayathri, V. S., Sowmya, S. V., Augustine, D., Alamoudi, A., Zidane, B., Mohammad Albar, N. H., & Patil, S. (2022). Zinc Oxide Nanoparticles: A Review on Its Applications in Dentistry. *Front Bioeng Biotechnol*, 10, 917990. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.917990>
 170. Puspasari, V., Ridhova, A., Hermawan, A., Amal, M. I., & Khan, M. M. (2022). ZnO-based antimicrobial coatings for biomedical applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(9), 1421-1445. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02733-9>
 171. Qi, K., Cheng, B., Yu, J., & Ho, W. (2017). Review on the improvement of the photocatalytic and antibacterial activities of ZnO. *Journal of Alloys and Compounds*, 727, 792-820. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.08.142>
 172. Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
 173. Raghunath, A., & Perumal, E. (2017). Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(2), 137-152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011>
 174. Raju, K., NATRAJAN, S., & KRISHNAMURTHY, P. (2022). Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Titanium Dioxide on Dental Plaque Colonisers: An In-vitro Study. *reactions*, 8, 10.
 175. Rewak-Soroczynska, J., Dorotkiewicz-Jach, A., Drulis-Kawa, Z., & Wiglusz, R. J. (2022). Culture Media Composition Influences the Antibacterial Effect of Silver, Cupric, and Zinc Ions against Pseudomonas aeruginosa. *Biomolecules*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/biom12070963>
 176. Reyes-Carmona, L., Rodil, S. E., Sepúlveda-Robles, O. A., Silva-Bermudez, P., Ramos Vilchis, C., & Almaguer-Flores, A. (2024). ZnO nanolayer on polypropylene fabrics: a highly effective antimicrobial coating against pathogenic bioaerosols. *Materials Research Express*. <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/2053-1591/ad7a5a>
 177. Reyes-Carmona, L., Sepúlveda-Robles, O. A., Almaguer-Flores, A., Bello-Lopez, J. M., Ramos-Vilchis, C., & Rodil, S. E. (2023). Antimicrobial activity of silver-copper coating against aerosols containing surrogate respiratory viruses and bacteria. *PLOS ONE*, 18(12), e0294972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294972>

178. Rodil, S. E., Depablos-Rivera, O., & Sánchez-López, J. C. (2023). Tribological Response of δ -Bi₂O₃ Coatings Deposited by RF Magnetron Sputtering. *Lubricants*, 11(5), 207. <https://www.mdpi.com/2075-4442/11/5/207>
179. Rowe, B. R., Canosa, A., Meslem, A., & Rowe, F. (2022). Increased airborne transmission of COVID-19 with new variants, implications for health policies. *Build Environ*, 219, 109132. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2022.109132>
180. Ruppach, H. (2013). Log10 reduction factors in viral clearance studies. *BioProcessing*, 2014.
181. Ruska, E. (1987). The Development of the Electron Microscope and of Electron Microscopy (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 26(7), 595-605. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.198705953>
182. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
183. Sánchez-López, E., Gomes, D., Esteruelas, G., Bonilla, L., Lopez-Machado, A. L., Galindo, R., Cano, A., Espina, M., Ettcheto, M., Camins, A., Silva, A. M., Durazzo, A., Santini, A., Garcia, M. L., & Souto, E. B. (2020). Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 10(2), 292. <https://doi.org/10.3390/nano10020292>
184. Sanders, E. R. (2012). Aseptic laboratory techniques: plating methods. *J Vis Exp*(63), e3064. <https://doi.org/10.3791/3064>
185. Sarafpour, M., Youssefi, M., & Mortazavi, S. M. (2016). Copper functionalization of polypropylene fabric surface in order to use in fog collectors. *Fibers and Polymers*, 17(12), 2041-2046. <https://doi.org/10.1007/s12221-016-6560-2>
186. Sepúlveda-Robles, O., Kameyama, L., & Guarneros, G. (2012). High diversity and novel species of Pseudomonas aeruginosa bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*, 78(12), 4510-4515. <https://doi.org/10.1128/aem.00065-12>
187. Shah, H., & Collins, M. (1988). Proposal for reclassification of Bacteroides asaccharolyticus, Bacteroides gingivalis, and Bacteroides endodontalis in a new genus, Porphyromonas. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(1), 128-131.
188. Shahin, K., Zhang, L., Mehraban, M. H., Collard, J.-M., Hedayatkah, A., Mansoorianfar, M., Soleimani-Delfan, A., & Wang, R. (2022). Clinical and experimental bacteriophage studies: Recommendations for possible approaches for standing against SARS-CoV-2. *Microbial Pathogenesis*, 164, 105442. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105442>
189. Shang, C., Bu, J., & Song, C. (2022). Preparation, Antimicrobial Properties under Different Light Sources, Mechanisms and Applications of TiO₂: A Review. *Materials*, 15(17), 5820. <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/17/5820>
190. Sharma Ghimire, P., Tripathee, L., Chen, P., & Kang, S. (2019). Linking the conventional and emerging detection techniques for ambient bioaerosols: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18(3), 495-523. <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09506-z>
191. Shen, F., & Yao, M. (2023). Bioaerosol nexus of air quality, climate system and human health. *National Science Open*, 2(4), 20220050.
192. Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., & Siddique, R. (2020). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res*, 24, 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
193. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Marubayashi, T., & Murai, K. (2016). Investigation of enteric adenovirus and poliovirus removal by coagulation processes and

- suitability of bacteriophages MS2 and ϕ X174 as surrogates for those viruses. *Science of The Total Environment*, 563-564, 29-39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.090>
194. Silva-Bermudez, P., Almaguer-Flores, A., Garcia, V. I., Olivares-Navarrete, R., & Rodil, S. E. (2017). Enhancing the osteoblastic differentiation through nanoscale surface modifications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(2), 498-509. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.a.35926>
 195. Sim, W., Barnard, R. T., Blaskovich, M. A. T., & Ziora, Z. M. (2018). Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade (2007-2017). *Antibiotics (Basel)*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040093>
 196. Slack, J. M., Landfried, S., & Gerencser, M. A. (1969). Morphological, biochemical, and serological studies on 64 strains of *Actinomyces israelii*. *J Bacteriol*, 97(2), 873-884. <https://doi.org/10.1128/jb.97.2.873-884.1969>
 197. SLOTS, J. (1976). The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *European Journal of Oral Sciences*, 84(1), 1-10.
 198. Slots, J., & Listgarten, M. A. (1988). *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 15(2), 85-93. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1988.tb00999.x>
 199. Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, 38, 135-187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x>
 200. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25(2), 134-144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
 201. Soliman, M. Y. M., Medema, G., Bonilla, B. E., Brouns, S. J. J., & van Halem, D. (2020). Inactivation of RNA and DNA viruses in water by copper and silver ions and their synergistic effect. *Water Research X*, 9, 100077. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100077>
 202. Spelce, D., Rehak, T. R., Metzler, R. W., & Johnson, J. S. (2017). Pre-World War I Firefighter Respirators and the U.S. Bureau of Mines Involvement in WWI. *J Int Soc Respir Prot*, 34(2), 128-135.
 203. Speth, R., Carrera, E., Jean-Baptiste, M., Joachim, A., & Linares, A. (2014). Concentration-dependent effects of zinc on angiotensin-converting enzyme-2 activity (1067.4). *The FASEB journal*, 28, 1067.1064.
 204. Sportelli, M. C., Izzi, M., Loconsole, D., Sallustio, A., Picca, R. A., Felici, R., Chironna, M., & Cioffi, N. (2022). On the Efficacy of ZnO Nanostructures against SARS-CoV-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3040. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/6/3040>
 205. Steier, L., de Oliveira, S. D., & de Figueiredo, J. A. P. (2019). Bacteriophages in Dentistry-State of the Art and Perspectives. *Dentistry journal*, 7(1), 6. <https://doi.org/10.3390/dj7010006>
 206. Steinhardt, R., & Serfass, E. (1951). X-Ray Photoelectron Spectrometer for Chemical Analysis. *Analytical Chemistry*, 23(11), 1585-1590. <https://doi.org/10.1021/ac60059a019>
 207. Stevie, F. A., & Donley, C. L. (2020). Introduction to x-ray photoelectron spectroscopy. *Journal of Vacuum Science & Technology A*, 38(6). <https://doi.org/10.1116/6.0000412>
 208. Swann, S. (1988). Magnetron sputtering. *Physics in Technology*, 19(2), 67. <https://doi.org/10.1088/0305-4624/19/2/304>

209. Taner, M., Sayar, N., Yulug, I. G., & Suzer, S. (2011). Synthesis, characterization and antibacterial investigation of silver–copper nanoalloys [10.1039/C1JM11718A]. *Journal of Materials Chemistry*, 21(35), 13150-13154. <https://doi.org/10.1039/C1JM11718A>
210. Tang, J. W., Eames, I., Li, Y., Taha, Y. A., Wilson, P., Bellingan, G., Ward, K. N., & Breuer, J. (2005). Door-opening motion can potentially lead to a transient breakdown in negative-pressure isolation conditions: the importance of vorticity and buoyancy airflows. *J Hosp Infect*, 61(4), 283-286. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2005.05.017>
211. Tang, J. W., Wilson, P., Shetty, N., & Noakes, C. J. (2015). Aerosol-Transmitted Infections-a New Consideration for Public Health and Infection Control Teams. *Curr Treat Options Infect Dis*, 7(3), 176-201. <https://doi.org/10.1007/s40506-015-0057-1>
212. Taylor, E., & Webster, T. J. (2011). Reducing infections through nanotechnology and nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 6, 1463.
213. Taylor, M. W. (2014). *Introduction: A Short History of Virology*. Viruses and Man: A History of Interactions. 2014 Jul 22:1-22. doi: 10.1007/978-3-319-07758-1_1.
214. Tellier, R. (2009). Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(suppl_6), S783-S790. <https://doi.org/doi:10.1098/rsif.2009.0302.focus>
215. Tian, Y., Cao, H., Qiao, Y., Meng, F., & Liu, X. (2014). Antibacterial activity and cytocompatibility of titanium oxide coating modified by iron ion implantation. *Acta Biomaterialia*, 10(10), 4505-4517. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.002>
216. Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr. (2015). Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, 28(3), 603-661. <https://doi.org/10.1128/cmr.00134-14>
217. Topley, W. W. C., & Wilson, G. S. (1937). The principles of bacteriology and immunity. *Soil Science*, 43(6), 480.
218. Tran, Q. H., Nguyen, V. Q., & Le, A.-T. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 033001. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/4/3/033001>
219. Tsai, C.-Y., Tang, C. Y., Tan, T.-S., Chen, K.-H., Liao, K.-H., & Liou, M.-L. (2018). Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(2), 226-234. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.04.007>
220. Turgeon, N., Toulouse, M.-J., Martel, B., Moineau, S., & Duchaine, C. (2014). Comparison of five bacteriophages as models for viral aerosol studies. *Applied and environmental microbiology*, 80(14), 4242-4250. <https://doi.org/10.1128/AEM.00767-14>
221. Twyman, R. M. (2005). ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY | Principles and Instrumentation. In P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)* (pp. 190-198). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00029-7>
222. Uçkay, I., Pittet, D., Vaudaux, P., Sax, H., Lew, D., & Waldvogel, F. (2009). Foreign body infections due to Staphylococcus epidermidis. *Annals of medicine*, 41(2), 109-119.
223. Ureña, J. L. (2002). *Microbiologia oral 2 Ed*. McGraw-Hill/Interamericana de España. <https://books.google.com.mx/books?id=yYaGAAAACAAJ>
224. Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutr Rev*, 70 Suppl 1(Suppl 1), S38-44. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>

225. Vaidya, M. Y., McBain, A. J., Butler, J. A., Banks, C. E., & Whitehead, K. A. (2017). Antimicrobial Efficacy and Synergy of Metal Ions against *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Planktonic and Biofilm Phenotypes. *Sci Rep*, 7(1), 5911. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05976-9>
226. Valdez-Salas, B., Beltrán-Partida, E., Zlatev, R., Stoytcheva, M., Gonzalez-Mendoza, D., Salvador-Carlos, J., Moreno-Ulloa, A., & Cheng, N. (2021). Structure-activity relationship of diameter controlled Ag@Cu nanoparticles in broad-spectrum antibacterial mechanism. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111501. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111501>
227. van den Worm, S. H. E., Koning, R. I., Warmenhoven, H. J., Koerten, H. K., & van Duin, J. (2006). Cryo Electron Microscopy Reconstructions of the Leviviridae Unveil the Densest Icosahedral RNA Packing Possible. *Journal of Molecular Biology*, 363(4), 858-865. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.08.053>
228. Van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., Tamin, A., Harcourt, J. L., Thornburg, N. J., & Gerber, S. I. (2020). Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England journal of medicine*, 382(16), 1564-1567.
229. Verdier, T., Coutand, M., Bertron, A., & Roques, C. (2014). Antibacterial Activity of TiO₂ Photocatalyst Alone or in Coatings on *E. coli*: The Influence of Methodological Aspects. *Coatings*, 4(3), 670-686. <https://www.mdpi.com/2079-6412/4/3/670>
230. Vielkind, P., Jentsch, H., Eschrich, K., Rodloff, A. C., & Stingu, C.-S. (2015). Prevalence of *Actinomyces* spp. in patients with chronic periodontitis. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(7), 682-688.
231. Vila Estapé, J., & Zboromyrska, Y. (2012). Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas [10.1016/j.gastrohep.2011.10.007]. *Gastroenterología y Hepatología*, 35(2), 89-93. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2011.10.007>
232. Vincent, M., Duval, R. E., Hartemann, P., & Engels-Deutsch, M. (2018). Contact killing and antimicrobial properties of copper. *Journal of Applied Microbiology*, 124(5), 1032-1046. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jam.13681>
233. Visscher, M., & Struik, K. G. (1994). Optical profilometry and its application to mechanically inaccessible surfaces Part I: Principles of focus error detection. *Precision Engineering*, 16(3), 192-198. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0141-6359\(94\)90124-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0141-6359(94)90124-4)
234. Wang, C. C., Prather, K. A., Sznitman, J., Jimenez, J. L., Lakdawala, S. S., Tufekci, Z., & Marr, L. C. (2021). Airborne transmission of respiratory viruses. *Science*, 373(6558), eabd9149. <https://doi.org/doi:10.1126/science.abd9149>
235. Wolff, A., Rodloff, A. C., Vielkind, P., Borgmann, T., & Stingu, C.-S. (2022). Antimicrobial Susceptibility of Clinical Oral Isolates of *Actinomyces* spp. *Microorganisms*, 10(1), 125. <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/1/125>
236. World Health, O. (2020a). *Technical specifications of personal protective equipment for COVID-19: interim guidance, 13 November 2020* CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/336622>
237. World Health, O. (2020b). *Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions: scientific brief, 09 July 2020* CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/333114>
238. World Health, O. (2021a). *Aide memoire: use of medical and non-medical/fabric masks for community outreach activities during the COVID-19 pandemic, based on current WHO guidance, 31 May 2021* CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341570>

239. World Health, O. (2021b). *The impact of COVID-19 on health and care workers: a closer look at deaths* CC BY-NC-SA 3.0 IGO). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345300>
240. World Health Organization, W. (2022). *Plague*. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/plague>
241. Wu, J., Wang, L., He, J., & Zhu, C. (2012). In vitro cytotoxicity of Cu²⁺, Zn²⁺, Ag⁺ and their mixtures on primary human endometrial epithelial cells. *Contraception*, 85(5), 509-518. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.contraception.2011.09.016>
242. Yadav, H. M., Kim, J.-S., & Pawar, S. H. (2016). Developments in photocatalytic antibacterial activity of nano TiO₂: A review. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 33, 1989-1998.
243. Yamamoto, A., Honma, R., & Sumita, M. (1998). Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res*, 39(2), 331-340. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199802\)39:2<331::aid-jbm22>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199802)39:2<331::aid-jbm22>3.0.co;2-e)
244. Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine*, 15, 2555-2562. <https://doi.org/10.2147/ijn.S246764>
245. Yougbaré, S., Mutalik, C., Okoro, G., Lin, I.-H., Krisnawati, D. I., Jazidie, A., Nuh, M., Chang, C.-C., & Kuo, T.-R. (2021). Emerging trends in nanomaterials for antibacterial applications. *International journal of nanomedicine*, 5831-5867.
246. Zachariah, P., & Stockwell, M. S. (2016). Measles vaccine: Past, present, and future. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 56(2), 133-140. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcph.606>
247. Zambon, J., Slots, J., & Genco, R. (1983). Serology of oral Actinobacillus actinomycetemcomitans and serotype distribution in human periodontal disease. *Infection and immunity*, 41(1), 19-27.
248. Zemouri, C., de Soet, H., Crielaard, W., & Laheij, A. (2017). A scoping review on bio-aerosols in healthcare and the dental environment. *PLOS ONE*, 12(5), e0178007.
249. Zhang, X., Xiao, G., Wang, Y., Zhao, Y., Su, H., & Tan, T. (2017). Preparation of chitosan-TiO₂ composite film with efficient antimicrobial activities under visible light for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 169, 101-107.
250. Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>
251. Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., & Joy, D. (2007). Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). In W. Zhou & Z. L. Wang (Eds.), *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications* (pp. 1-40). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1
252. Zhou, X., & Li, Y. (2015a). Chapter 4 - Subgingival Microbes. In X. Zhou & Y. Li (Eds.), *Atlas of Oral Microbiology* (pp. 67-93). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00004-5>
253. Zhou, X., & Li, Y. (2015b). Chapter 5 - Oral Mucosal Microbes. In X. Zhou & Y. Li (Eds.), *Atlas of Oral Microbiology* (pp. 95-107). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00005-7>
254. Zhu, M.-F., & Yang, H. (2007). Polypropylene fibers. *Handbook of fiber chemistry*, 3.
255. Zhu, W. Q., Ming, P. P., Qiu, J., Shao, S. Y., Yu, Y. J., Chen, J. X., Yang, J., Xu, L. N., Zhang, S. M., & Tang, C. B. (2018). Effect of titanium ions on the Hippo/YAP signaling pathway in regulating biological behaviors of MC3T3-E1 osteoblasts. *J Appl Toxicol*, 38(6), 824-833. <https://doi.org/10.1002/jat.3590>

XI. PRODUCTOS ACADÉMICOS

1. PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

- **Reyes-Carmona Lorena**, Sepúlveda-Robles Omar A., Almaguer-Flores Argelia, Bello-López Juan Manuel, Ramos-Vilchis Carlos, Rodil Sandra E. Antimicrobial activity of silver-copper coating against aerosols containing surrogate respiratory viruses and bacteria. *PLOS ONE*, 2023, 18(12), e0294972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294972>.
- **Reyes-Carmona, Lorena**, Rodil Sandra E., Sepúlveda-Robles Omar A., Silva-Bermúdez Phaedra, Ramos-Vilchis Carlos, Almaguer-Flores Argelia. ZnO nanolayer on polypropylene fabrics: a highly effective antimicrobial coating against pathogenic bioaerosols. *Materials Research Express*. 2024. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ad7a5a>

Otras publicaciones durante el doctorado

- **Reyes-Carmona, L.**, Camps, E., Campos-González, E., Mercado-Celis, Pérez-Ibarra, E. A., Álvarez-Chimal, R., Rodil, S. E., & Almaguer-Flores, A. Antimicrobial evaluation of bismuth subsalicylate nanoparticles synthesized by laser ablation against clinical oral microorganisms. *Optics & Laser Technology*, 2023. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2022.108930>
- **Reyes-Carmona, L.**, Prado-Prone, G., Camps, E., & Almaguer-Flores, A. Nanopartículas de subsalicilato de bismuto por ablación láser: efecto contra bacterias asociadas a infecciones nosocomiales. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*. 2024. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2025.34.69835>
- Prado-Prone G., **Reyes-Carmona L.**, Almaguer-Flores A. Biomateriales, aliados indispensables en la regeneración periodontal. *Revista Ciencia UANL*. 2025. <https://doi.org/10.29105/cienciauanl28.129-3>
- Pérez-Bucio VM, Lee-Colín A, **Reyes-Carmona L**, Prado-Prone G, Rodil S, Almaguer-Flores A. Efectividad antibacteriana de un nanorecubrimiento de plata-cobre para mejorar los equipos de protección personal. *Revista Odontológica Mexicana Órgano Oficial de la Facultad de Odontología UNAM*. 2024 (*Aceptado*).

2. CONGRESOS EN LOS QUE SE PRESENTÓ ESTE PROYECTO DE DOCTORADO

- Presentación oral titulada “*Biocide Nano Copper-Silver Layer Active Against Surrogate Virus and Bacteria*” en el congreso Materials Research Society, the Fall Meeting 2022 en Boston, Estados Unidos el 01 de diciembre del 2022.
- Presentación oral titulada “*ZnO_x Nanolayers As Antimicrobial Surfaces*” en el congreso 49th International Conference on Metallurgical Coatings & Films en San Diego, California, Estados Unidos el 22 de mayo del 2023.
- Presentación oral titulada “*Antimicrobial Evaluation of Silver-Copper Nanocoating Against Surrogate Respiratory Viruses And Bacteria*” en el Congreso Estatal del Capítulo Estudiantil-IIM-SMMARTER-MRS del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, México el 8 de junio del 2023. Se ganó la distinción de Mención Honorífica.
- Presentación oral titulada “*Antimicrobial Evaluation Of Zinc Oxide Nanocoatings Against Surrogate Respiratory Viruses And Bacteria*” en el congreso 31st International Materials Research Congress (IMRC 2023), Cancún, México, el 14 de agosto del 2023.

3. PROYECTO DESARROLLADO EN LA ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN INTERNACIONAL

Durante el 6^{to} semestre de doctorado se llevó a cabo una estancia de investigación internacional en el Departamento de Química de la “Università degli Studi di Bari “Aldo Moro” (UNIBA), en Bari, Italia. Bajo la tutoría del Profesor. Nicola Cioffi. Y en colaboración con las Doctoras Rosaria Anna Picca, Chiara Sportelli y Margherita Izzi. Durante la estancia de investigación, se desarrollaron las siguientes actividades:

Síntesis de sub-micropartículas. Síntesis sub-micropartículas de fosfato de zinc por dos diferentes metodologías; síntesis electroquímica sol-gel y precipitación química con temperatura asistida.

Caracterización. Preparación y análisis de muestras con las siguientes técnicas analíticas; Espectroscopía infrarroja (IR), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS), Dispersión de luz dinámica (DLS), Potencial Z, Espectroscopía de fotoelectrones (XPS).

Ensayos antibacterianos. Posterior a la estancia de investigación se realizaron en el Laboratorio de Biointerfases, FO, UNAM, los ensayos antibacterianos de las partículas de fosfato de zinc contra ocho patógenos asociados a infecciones nosocomiales y orales.

El proyecto realizado durante la estancia de investigación fue presentado en los siguientes Congresos:

- Presentación oral del proyecto titulado “*Synthesis And Analytical Characterization Of Zinc Phosphate Particles*” en el congreso “*Chimica sotto l’albero*” edizione 2023”, en Bari, Italia el 19 de diciembre del 2023.
- Presentación oral de los resultados de esta colaboración internacional (UNAM-UNIBA) “*Synthesis And Analytical Characterization Of Zinc Phosphate Particles Against Nosocomial And Oral Bacteria*” en el International Material Research Congress (IMRC 2024) en Cancún, México, el 21 de agosto 2024.