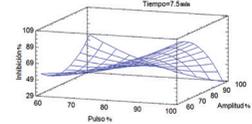


Optimización de la propiedad antibacteriana de un copolímero de etileno-co-acetato de vinilo (EVA) sobre la bacteria *Escherichia coli* (E. Coli)



Antibacterial property optimization of an ethylene-co-vinyl acetate copolymer (EVA) on the bacterium *Escherichia coli* (E. Coli)



Javier Cruz-Salgado¹, Anayansi Estrada-Monje², Edgar Ruelas-Santoyo³ y Sergio Álvarez-Rodríguez⁴

¹ Universidad Politécnica del Bicentenario. Dpto. Investigación y Desarrollo Tecnológico. Carr. Nacional Romita Km. 2, San Juan los Durán - 36283 Silao, Gto. (México).

² Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas. Fraccionamiento Industrial Delta. Omega #201 - 37545 León, Gto (México).

³ Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Carretera Silao-Irapuato km 12.5 El Copal - 36821 Irapuato, Gto. (México).

⁴ Instituto Tecnológico José Mario Molina Pasquel y Henríquez. Libramiento Tecnológico No. 5000, Colonia Portugalejo de los Romanes - 47480 Lagos de Moreno, Jal. (México).

DOI: <http://dx.doi.org/10.6036/9039> | Recibido: 07/11/2018 • Inicio Evaluación: 14/11/2018 • Aceptado: 08/04/2019

ABSTRACT

- In the present work, the effect of the ultrasonic parameters on the deagglomeration and dispersion of the TiO₂ nanoparticles in a polymer matrix of EVA (ethylene-co-vinyl acetate copolymer) was systematically studied. The ultrasonic parameters studied were amplitude, pulse and time. The antibacterial property of the composite material against the bacterium *Escherichia coli* (E.coli) was also studied. A significant statistical effect of the ultrasound parameters on the deagglomeration and dispersion of the TiO₂ nanoparticles was found and the amplitude, pulse and time levels of the ultrasonic treatment which maximize the percentage of growth inhibition of the studied bacteria were established.
- **Key Words:** Ultrasonic, antibacterial, *Escherichia coli* (E. coli), TiO₂, Experimental design.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió de manera sistemática el efecto de los parámetros ultrasónicos sobre la desaglomeración y dispersión de las nanopartículas de TiO₂ en una matriz polimérica de EVA (copolímero de etileno-co-acetato de vinilo). Los parámetros ultrasónicos estudiados fueron amplitud, pulsos y tiempo. Así mismo se estudió la propiedad antibacteriana del material compuesto contra la bacteria *Escherichia coli* (E.coli). Se encontró un efecto estadísticamente significativo de los parámetros del ultrasonido sobre la desaglomeración y la dispersión de las nanopartículas de TiO₂ y se establecieron los niveles de amplitud, pulsos y tiempo del tratamiento ultrasónico, que maximizan el porcentaje de inhibición del crecimiento de la bacteria estudiada.

Palabras Clave: Ultrasonido, antibacteriano, *Escherichia coli* (E.coli), TiO₂, Diseño de experimentos.

1. INTRODUCCIÓN

La propiedad antibacteriana de una matriz polimérica puede mejorarse al incorporar nanopartículas [1]. La incorporación de cargas nanométricas modifica drásticamente las propiedades físico-químicas de los materiales obtenidos [2]. En particular, la incorporación de nanopartículas metálicas con propiedades antimicrobianas tales como plata [3], cobre [4], oro [5], dióxido de titanio

[6] y óxido de zinc [7], entre otras, en polímeros, ha permitido la obtención de compuestos capaces de prevenir el crecimiento y la propagación de microorganismos, siendo las nanopartículas de plata las más empleadas [8]. La nanopartícula de dióxido de titanio (TiO₂) es una de las cargas más recientemente utilizada como antimicrobiano [9] y su efecto antibacteriano ha sido probado contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus* y *Pseudomonas* [10], *Penicillium Expansum* [11], *Pseudomonas Aeruginosa*, *Cándida Albicans* y *Bacillus Subtilis* [12].

En la actualidad la tecnología de envases activos es un área dinámica de investigación en la que el envase desarrollado, además de cumplir con las funciones básicas de un envase flexible pasivo (contención, protección y conservación), incluye funciones para solucionar problemas específicos del producto a envasar. Una de las características buscadas en una película para el empaque de alimentos es que tenga propiedades antibacterianas. Esto se logra al incorporar agentes antibacterianos capaces de actuar contra los microorganismos, en la matriz polimérica, previniendo el deterioro del alimento.

Con el fin de impartir propiedades antimicrobianas con las nanopartículas, éstas son depositadas en la superficie o se incorporan dentro de la matriz polimérica [13]. Para este propósito, algunos autores han planteado la preparación de nanocompuestos mediante métodos tales como atomización (*spraying*) [14], pulverización catódica (*sputtering*) [15], deposición por plasma [16] y deposición en capas [17].

En la literatura se ha analizado la incorporación de TiO₂ en copolímeros de EVA para modificar las propiedades eléctricas del nanocompuesto [18]. En este estudio se encontró que el tamaño de la nanopartícula de TiO₂ influye significativamente en las propiedades eléctricas del material. Otro estudio es el de Jo M. *et al* [19] que realizó una comparación de la propiedad antibacteriana de las formas anatasa y rutilo del TiO₂ incluidos en el EVA, contra las bacterias *S. aureus* y *E. coli*; los materiales compuestos fueron probados con el método del matraz con agitación y se encontró que la forma rutilo presenta una mejor propiedad antibacteriana. Sin embargo, en los trabajos de investigación mencionados anteriormente no se estudió el efecto de la dispersión de las nanopartículas de TiO₂ sobre las propiedades antibacterianas del material final y tampoco se utilizó el método de ultrasonido para mejorar la dispersión y, en consecuencia, la propiedad antibacteriana [20].

Dentro de los factores predeterminantes para la obtención de materiales nanoestructurados, se encuentra la dispersión uniforme de las partículas en la matriz y su compatibilidad con el polímero. En este sentido se ha establecido que, a mayor dispersión, mayor será el efecto antibacteriano [13]. Se ha planteado que la aplicación de energía ultrasónica permite dispersar las partículas de alúmina en baño electrolítico de sulfamato de níquel [21-24]. Así mismo, fomenta la destrucción de aglomerados de suelo en agregados pequeños, esto sin utilizar agentes químicos [20]. Sin embargo, la gran mayoría de los estudios que describen el efecto de los procesos ultrasónicos sobre la dispersión de las nanopartículas, se enfocan a sistemas acuosos [25]. Por otra parte, es importante resaltar que la información referente a sistemas de alta viscosidad como polímeros en solución, aún es insuficiente, lo cual representa un área de oportunidad en materia de investigación.

Los factores de mayor importancia son en el ultrasonido son: pulsaciones, amplitud y tiempo [13]. Diferentes niveles de estos parámetros generan diferentes grados de dispersión de las nanopartículas y, consecuentemente, diferentes grados de inhibición en el crecimiento de los microorganismos. En este sentido, si el interés se centra en obtener un copolímero con buenas propiedades antibacterianas, uno de los grandes retos es determinar los niveles de los factores operacionales del tratamiento ultrasónico. Dichos factores deben proveer un grado satisfactorio de dispersión de las nanopartículas metálicas, para, por ende, obtener un nanocompuesto con propiedades antibacterianas competitivas.

Por otra parte, el diseño de experimentos (DDE) es una estrategia eficiente para mejorar las propiedades de los materiales compuestos, mediante evidencias objetivas que permiten responder interrogantes planteadas en tareas experimentales. Dentro del DDE se encuentra los diseños factoriales mixtos (DFM) [26]. Los DFM se utilizan cuando dos o más factores experimentales tienen diferente número de niveles. Los DFM ofrecen la posibilidad de estudiar efectos de curvatura de los factores con más de dos niveles [26]. Los efectos de curvatura se presentan cuando la relación entre un factor operacional y una propiedad o característica de un producto (variable de respuesta) no es lineal. El DDE ha sido aplicado en estudios para la mejora u optimización de propiedades en materiales compuestos [27, 28], como Montazer M., *et al* [29], en donde se estudió el efecto de la concentración del nanocompuesto de Ag/TiO₂ sobre la actividad antibacteriana de un tejido de lana contra las bacterias *S. aureus* y *E. coli*. Otro trabajo para evaluar la actividad antibacteriana mediante DDE fue el de Espitia P., *et al*. [30], en el cual se evaluó la actividad de las nanopartículas de óxido de zinc en una matriz de metilcelulosa contra las bacterias *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*. El DDE también se ha utilizado para estudiar diferentes propiedades en los materiales compuestos con TiO₂. Este es el caso de una tela de algodón en la que se estudió, el efecto de la adición de TiO₂ sobre la protección UV, la autolimpieza y la resistencia a la tensión del material [31]. A fecha actual, no se encuentra ningún estudio que analice, el uso de DFM en la optimización de la propiedad antibacteriana de copolímeros de etileno-co-acetato de vinilo con nanopartículas de TiO₂. Esto representa un área de oportunidad importante en materia de investigación, debido a las grandes ventajas que puede aportar la experimentación diseñada.

En el presente trabajo se aplicó un DDE factorial mixto, para optimizar la propiedad antibacteriana de un copolímero de EVA, con nanopartículas de TiO₂ obtenido mediante el método de disolución asistido con ultrasonido. El objetivo fue determinar los niveles de los factores operacionales del tratamiento ultrasónico, que promueven la dispersión de las nanopartículas favoreciendo la propiedad antibacteriana.

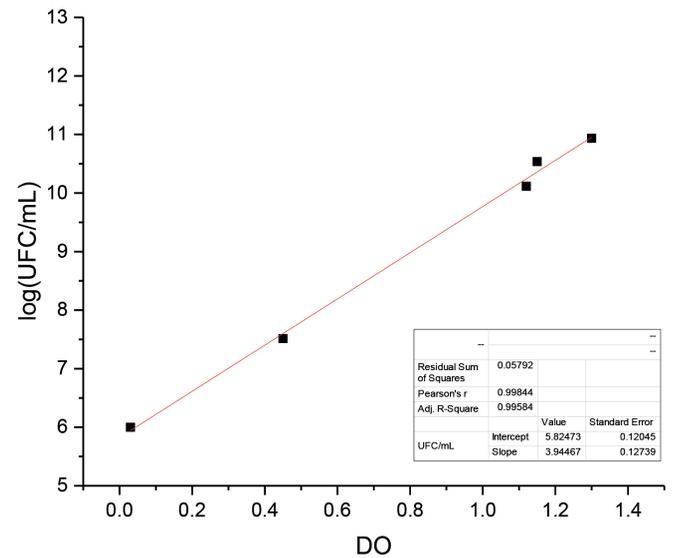


Fig. 1: Curva de calibración para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC) de la bacteria *E. coli* contra el tiempo

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

Se utilizaron nanopartículas de TiO₂ fase anatasa en polvo de 20 nm de tamaño promedio de partícula de Sigma-Aldrich, un copolímero etileno-co-acetato de vinilo (EVA) PROMALENE con 18% de acetato de vinilo y tolueno como solvente de Sigma-Aldrich. La concentración de nanopartículas de TiO₂ utilizada fue de 5 mg/g de EVA.

2.2. PROCESAMIENTO DE NANOCOMPUESTOS

El EVA fue disuelto en tolueno a 100 °C durante 30 minutos con agitación magnética para preparar una solución al 5% en peso de EVA. La dispersión de las nanopartículas en solución se llevó a cabo en un ultrasonido Hielscher modelo UP200Ht. La potencia máxima de entrada y frecuencia son 400 W y 20 kHz, respectivamente. El sonostrodo S26d7 utilizado tiene un diámetro de punta de 7 mm, la amplitud de sonicación (movimiento de la punta) se encuentra en el intervalo de 10-100%. Para reducir el calentamiento de las suspensiones durante la sonicación se utilizó un baño de agua fría. Las películas se prepararon en una placa recubierta de teflón, posterior a la sonificación. Dichas películas se secaron en una estufa a 100 °C por 60 minutos. La dispersión de las nanopartículas fue caracterizada mediante un Microscopio Electrónico de Transmisión de Emisión de Campo, JEM-2200FS.

Para estudiar el efecto del ultrasonido sobre la degradación de la matriz polimérica, se realizaron experimentos adicionales al 100 % de los parámetros de pulso y amplitud; el tiempo de tratamiento ultrasónico se varió de 0 a 15 minutos y se monitoreó mediante FTIR la formación de dobles enlaces C=C consecuencia de la reacción de degradación Norrish II, con la cuantificación de la banda de absorción en 1655 cm⁻¹ y la banda de referencia en 2850 cm⁻¹.

2.3. CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS

Las propiedades antimicóticas del nanocompuesto se evaluaron mediante la densidad óptica (D.O.) por espectrofotometría de luz ultravioleta. Se construyó una curva de calibración siguiendo el crecimiento de la bacteria *E. coli* contra la densidad óptica (a diferentes tiempos de incubación), midiendo la transmitancia a 590 nm de longitud de onda (Figura 1). En la curva de calibración se

puede observar que a medida que aumenta el número de unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra (UFC/mL), se obtiene una densidad óptica mayor. Este es un procedimiento estándar que se utiliza para evaluar de manera indirecta cómo aumenta o disminuye el crecimiento bacteriano con el tiempo.

Posteriormente, 1 cm² de película del nanocompuesto de EVA/TiO₂ se introdujo en un matraz con medio de cultivo y un inóculo de la bacteria *E. coli*. El matraz con el medio de cultivo y la película de EVA/TiO₂ se expuso a radiación UV-visible con lámparas de mercurio de 250 W (4900 lúmenes de flujo lumínico) por 30 min. Posteriormente se realizaron mediciones de D.O. con el espectrofotómetro de UV para monitorear crecimiento de la bacteria con el tiempo y se determinó la concentración de colonias de *E. coli* para, de esta manera, determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento de la bacteria por el material compuesto.

2.4. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

La investigación se llevó a cabo mediante un DDE factorial mixto 3x3x2 [26], los números 3, 3 y 2 corresponden a los niveles en que fueron estudiados cada uno de los tres factores. Los tres factores estudiados son: pulsaciones, amplitud y tiempo. Los factores pulsación y amplitud fueron estudiados en tres niveles, mientras que el tiempo se analizó en dos niveles. La variable de respuesta de interés es el porcentaje de inhibición bacteriana en el copolímero. Los niveles de dichos factores se muestran en la Tabla 1. De acuerdo con los diseños factoriales mixtos, el número total de combinaciones que se pueden realizar con un diseño 3x3x2 son 18. En la Tabla 2 se muestran los 18 arreglos experimentales, así como, los porcentajes de inhibición bacteriana obtenidos.

Factores	Niveles
Pulso (P)	60, 80 y 100 %
Amplitud (A)	60, 80 y 100 %
Tiempo (T)	5 y 10 min

Tabla 1: Factores experimentales y sus niveles

La relación existente entre los factores operacionales del ultrasonido y el porcentaje de inhibición bacteriana del copolímero, se modeló mediante una ecuación de segundo orden, obtenida mediante la técnica de regresión lineal múltiple [26]. La ecuación de segundo grado se presenta a continuación:

$$\begin{aligned}
 \text{Inhibición} = & -780.0 - 3.427P + 7.824A + 244.2T + 0.02286P^2 + 0.2353PA - 1.357PT \\
 & + 0.02376A^2 - 4.659AT - 0.00243PA^2 + 0.03548PAT + 0.0A^2T
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

El diseño y análisis del experimento se llevaron a cabo utilizando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XV (Versión 15.2.06, StatPoint, Inc).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, las propiedades asociadas a los materiales compuestos son altamente dependientes del tamaño de la nanopartícula utilizada como reforzante. En este sentido, cuanto más pequeña sea la nanopartícula, más elevada será su tendencia a aglomerarse debido a las fuerzas de atracción entre ellas. En el contexto anterior, es de suma importancia romper los aglomerados formados por las nanopartículas y, de forma ideal, obtener la nanopartícula aislada que, como consecuencia, mejorará las propiedades del material compuesto. En la Figura 2 observan una micrografía de una película de EVA/TiO₂ obtenida con trata-

Experimento	Pulso (P) (%)	Amplitud (A) (%)	Tiempo (T) (min)	Inhibición (I) (%)
1	60	60	5	28
2	60	80	5	56
3	60	100	5	70
4	60	60	10	84
5	60	80	10	34
6	60	100	10	82
7	80	60	5	77
8	80	80	5	74
9	80	100	5	56
10	80	60	10	69
11	80	80	10	33
12	80	100	10	36
13	100	100	5	32
14	100	100	10	26
15	100	80	10	39
16	60	100	10	82
17	80	100	10	36
18	100	100	10	26

Tabla 2: Diseño de experimentos factorial mixto

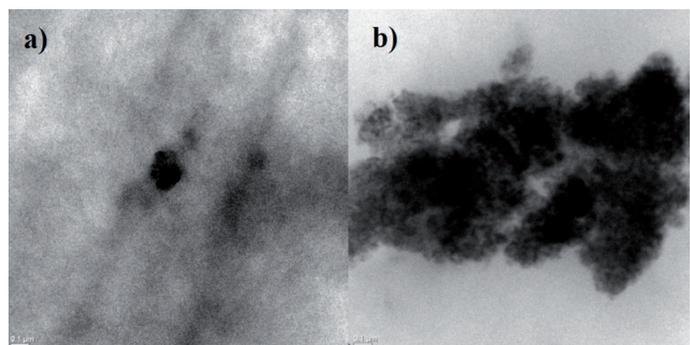


Fig. 2: Microscopías de TEM de a) película de EVA/TiO₂ obtenida con tratamiento ultrasónico y b) película de EVA/TiO₂ obtenida sin ultrasonido

miento ultrasónico (a) y una micrografía de una película de EVA/TiO₂ obtenida sin ultrasonido (b). En las micrografías utilizando la

misma magnificación, se observa que el tamaño de las partículas de TiO₂ en (a) son mucho más pequeñas comparadas con las obtenidas sin el ultrasonido (b). Con las imágenes a) y b) de la Figura 2, se demuestra que el tratamiento ultrasónico contribuye a la desaglomeración de las nanopartículas de TiO₂ y ayuda a obtener una dispersión más uniforme del reforzante en la matriz polimérica. Un sistema con una buena dispersión del reforzante en la matriz polimérica, generalmente permite obtener un material compuesto con mejores propiedades [32].

Por otro lado, los resultados de la inhibición del crecimiento de la bacteria *E. coli* como consecuencia de la incorporación de TiO₂ en una matriz de EVA, concuerda con lo expuesto en la literatura para un sistema similar [19], así como con otros sistemas poliméricos como el PMMA y el polipropileno en los que fue incorporado el TiO₂ [33, 34]. El TiO₂ posee una alta degradabilidad cuando se expone a la radiación UV [35] y muestra la generación de radi-

cales libres bajo radiación visible. Por lo tanto, se podría esperar también que la gran relación área superficial/volumen de las nanopartículas proporcione una ventaja adicional al efecto tóxico en los microorganismos; cabe mencionar que la buena dispersión de las nanopartículas en la matriz polimérica, también juega un papel primordial en la inhibición del crecimiento de las bacterias como lo hace con otras propiedades de los materiales compuestos (36). De acuerdo a lo anterior, no es sorprendente que a pesar de que no todas las nanopartículas de TiO_2 están disponibles para interactuar con los microorganismos e inhibir su crecimiento, las que se encuentran en la superficie de la matriz polimérica son suficientes para inhibir la proliferación de las UFC (Unidades formadoras de colonias) de la *E. coli* y propiciar una actividad antibacteriana satisfactoria en el material compuesto.

En la Figura 3 se puede observar que el número de UFC/mL obtenidas en cada experimento a un tiempo de incubación de 12 horas, es mayor en el experimento al que no se le aplicó ultrasonido (Experimento 19). Por lo tanto, la inhibición del crecimiento de la bacteria *E. coli* varía con los parámetros de ultrasonido utilizado en cada experimento. En este trabajo se comparó la actividad antibacteriana del EVA con nanopartículas de TiO_2 sometido a diferentes tratamientos ultrasónicos (y sin ultrasonido). Faltaría evaluar la película de material compuesto para ver si cumple con los requerimientos de las normas establecidas para empaques de alimentos, lo cual no hemos realizado hasta el momento.

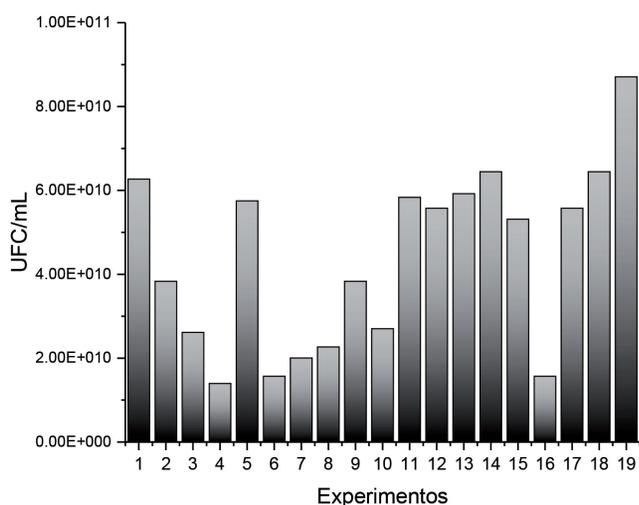


Fig. 3: Gráfico en el que se muestran las UFC/mL obtenidas de cada experimento a un tiempo de incubación de 12 horas. En el experimento 19 no se utilizó ultrasonido

Aunque se ha demostrado que el ultrasonido es una técnica innovadora y efectiva para la dispersión de las nanopartículas, presenta algunas desventajas cuando se trabaja con materiales poliméricos, ya que, al ser compuestos orgánicos, están sujetos a la degradación. El mayor efecto del ultrasonido en un medio líquido se atribuye al fenómeno de cavitación. Durante el proceso de cavitación se forman microburbujas que una vez colapsadas, crean puntos transitorios de elevadas temperaturas y presiones, los cuales aceleran dramáticamente la reactividad química del medio [37]. Como se observó en la Figura 3, los diferentes parámetros de ultrasonido aplicados en los tratamientos, tienen un efecto diferente sobre el crecimiento de la bacteria *E. coli*, por lo que el efecto de dichos parámetros se discutirá más adelante.

Adicionalmente a los 19 experimentos, se utilizó el 100 % del pulso y la amplitud del ultrasonido, variando el tiempo del tratamiento de 0 a 15 minutos, con el objetivo de estudiar la degradación en el material compuesto. La degradación se estudió

mediante espectroscopia de infrarrojo (FT-IR) monitoreando la formación de dobles enlaces C=C en la estructura del polímero, producto de la degradación. Las bandas de absorción infrarroja en 1655 y 2850 cm^{-1} están asignada a las secuencias de dobles enlaces C=C y a una banda de referencia en el material para eliminar la interferencia del espesor en el análisis, respectivamente. El eje de las ordenadas de la Figura 4 muestra la relación entre las bandas de absorción infrarroja en 1655 cm^{-1} y en 2850 cm^{-1} . En dicha Figura puede observarse un aumento en la relación entre las bandas mencionadas, y dado que la banda en 2850 cm^{-1} no cambia de intensidad (por eso se tomó como banda de referencia) el aumento en la relación de éstas bandas, es el aumento en la formación de secuencias de dobles enlace C=C en el material.

Los resultados de los experimentos adicionales mostraron la formación de secuencias de dobles enlaces C=C, producto de la degradación del material polimérico, como se puede observar en la Figura 4. Si bien se encontró que el tratamiento ultrasónico causa cierta degradación en la matriz de EVA mediante la formación de C=C productos de la reacción Norrish II asociada a la termo-oxidación [38], no se estudiaron los efectos de dicha degradación sobre las propiedades mecánicas del material compuesto.

El tratamiento ultrasónico ha demostrado ser un método efectivo para romper los aglomerados de nanopartículas y obtener una distribución homogénea. Durante la sonicación, las ondas de choque provocadas por la cavitación son las principales responsables

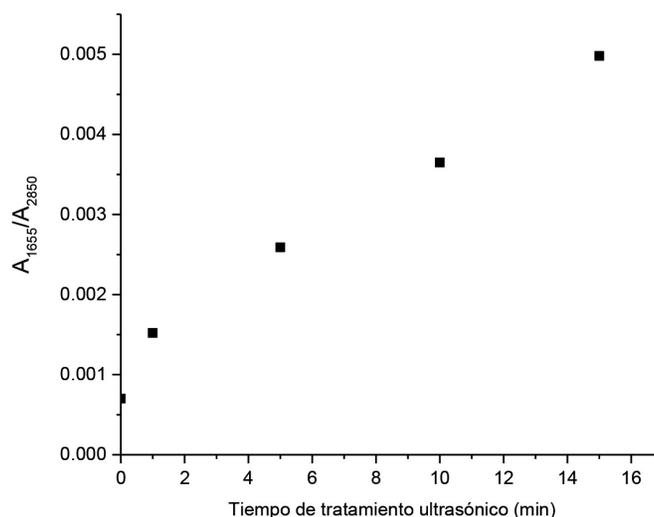


Fig. 4: Gráfica de del incremento en la intensidad de la banda de absorción infrarroja en 1655 cm^{-1} , debida a la formación de C=C en el EVA

Efecto	Estimado	Error Estd.
Promedio	56.64	2.597
P:Pulso	38.21	9.025
A:Amplitud	-26.24	5.413
T:Tiempo	-50.17	6.809
PP	18.29	7.767
PA	-46.48	7.639
PT	-33.98	5.223
PAA	-38.88	10.36
PAT	25.44	5.804
AAT	45.51	7.598

Tabla 3: Efectos principales y de interacción estimados y error estándar de cada efecto

de la energía para romper los aglomerados. Los aglomerados, de hecho, sirven como un núcleo donde se inicia el proceso de cavitación. Para maximizar una respuesta determinada, en este caso la inhibición del crecimiento de la bacteria *E. coli*, se deben determinar qué parámetros del tratamiento ultrasónico afectan de manera significativa la variable de respuesta, así como cuál podría ser el porcentaje de inhibición esperado en las condiciones óptimas.

En la Tabla 3 se muestra los efectos, principales y de interacción estimados, así como el error estándar de cada uno de estos efectos. Como se puede ver en la Tabla 3 el mayor efecto lo presenta el factor tiempo, sin embargo, se debe tener en cuenta que los efectos de interacción tienen prioridad sobre los efectos principales, de la misma forma los efectos de interacción dobles tienen prioridad sobre los efectos de interacción triples [26]. Los efectos de interacción se presentan cuando dos factores interactúan, es decir, cuando el efecto de un factor sobre una respuesta (en este caso el % de inhibición del crecimiento de la bacteria) depende del nivel del otro factor [26]. Es por esto que los efectos de interés son aquellos de interacción dobles (Pulso*Amplitud) y (Pulso*Tiempo). Antes de interpretar estos efectos, es necesario determinar si dichos efectos son estadísticamente significativos. En la Tabla 4 se presenta el Análisis de la Varianza. Para determinar si los efectos son estadísticamente significativos se utiliza el criterio del valor-p, los efectos con un valor-p menor a 0.05 tienen un efecto estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95%.

De acuerdo con la columna del valor-p de la Tabla 4, tanto el efecto PA como el efecto PT tienen un efecto estadísticamente significativo al 95% de confianza. El valor-p de magnitud tan pequeña para los dos efectos, muestra que la conclusión es contundente.

En la Figura 5 se muestra la gráfica de interacción del efecto PA. En esta gráfica se aprecia un efecto notable de interacción entre el pulso y la amplitud, ya que las pendientes de las dos curvas son muy distintas. El efecto de la amplitud sobre la inhibición depende del pulso: si se utiliza una amplitud de 60 %, la inhibición puede ir de 50 hasta 98 % dependiendo del nivel del factor pulso. El mayor porcentaje de Inhibición se presenta cuando se utiliza una amplitud de 60 %, siempre que el pulso este en su nivel más alto, es decir, 100 %.

En la Figura 6 se muestra la gráfica de interacción del efecto PT, en este caso el porcentaje de Inhibición mayor se presenta a un tiempo de 5 minutos y un pulso de 100 %.

El modelo de regresión (Ec. 1) se ajustó a los datos experimentales con la finalidad de determinar los niveles de los factores

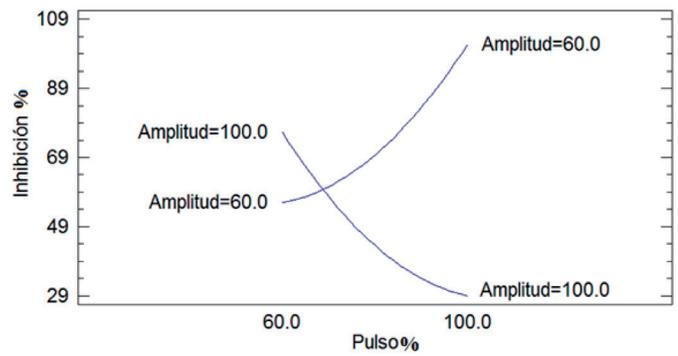


Fig. 5: Gráfica de interacción del pulso y amplitud para la respuesta "Inhibición del crecimiento de la bacteria *E. coli*"

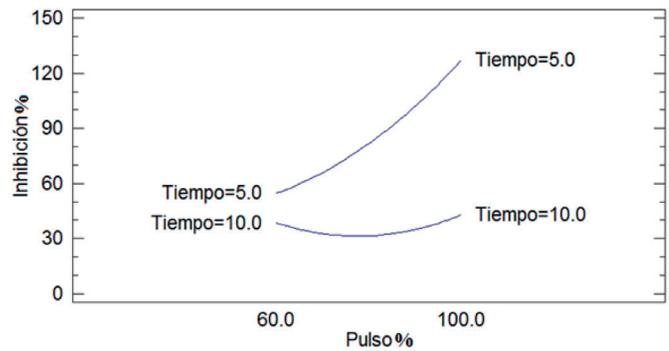


Fig. 6: Gráfica de interacción pulso y tiempo para Inhibición

que maximizan el porcentaje de inhibición bacteriana, además de predecir el porcentaje de inhibición en diferentes niveles de los factores estudiados. Esto se realizó utilizando el Software STAT-GRAPHICS. En la Tabla 5 se presentan los niveles de los factores estudiados, tales que se maximiza el porcentaje de Inhibición, así como la respuesta predicha del porcentaje de Inhibición.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Pulso (P)	60	100	100
Amplitud (A)	60	100	72
Tiempo (T)	5	10	5
Valor óptimo = 100 (% Inhibición estimado)			

Tabla 5. Combinación de los niveles de los factores que maximizan la inhibición

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
P:Pulso	819.3	1	819.3	17.92	0.0029
A:Amplitud	1074	1	1074	23.5	0.0013
T:Tiempo	2482	1	2482	54.28	0.0001
PP	253.5	1	253.5	5.55	0.0463
PA	1692	1	1692	37.01	0.0003
PT	1935	1	1935	42.33	0.0002
PAA	644.3	1	644.3	14.09	0.0056
PAT	878.4	1	878.4	19.22	0.0023
AAT	1640	1	1640	35.88	0.0003
Error total	365.7	8	45.71		
Total (corr.)	8259	17			

Tabla 4: Análisis de la varianza para Inhibición

La precisión de las predicciones del modelo ajustado (Ec. 1), sobre el comportamiento de los diferentes niveles de los factores en la inhibición bacteriana, depende de la calidad de ajuste del modelo. Los coeficientes de determinación y (ajustada), son estadísticos útiles para medir la calidad global del modelo de regresión (Ec. 1). Estos estadísticos muestran el porcentaje de la variación en las variables de respuesta (inhibición), que es explicada por el correspondiente modelo, valores mayores al 70% indican un ajuste satisfactorio [26]. En este caso, los valores de los estadísticos R^2 y R^2_{aj} son de 0.90 y 0.85 respectivamente. De esta manera, de acuerdo con los estadísticos R^2 y el modelo ajustado (Ec. 1) explica más del 90 % del comportamiento de la inhibición, observado en el experimento. Por lo tanto, los efectos atribuibles a factores no estudiados, así como el efecto de errores experimentales, fueron muy pequeños en comparación con el efecto de los factores estudiados.

La Gráfica de superficie de respuesta es una representación visual de la (Ec.1) del comportamiento de la variable de respuesta en la región experimental. En la Figura 7 se representa el factor pulso y amplitud (A) contra la inhibición (I), dejando fijo el factor tiempo en 7.5 minutos. En la Figura 8 se muestra el factor pulso (P) y tiempo (T) contra la inhibición (I), dejando fijo el factor amplitud (A) en 80%. De esta manera es más fácil visualizar el comportamiento de la inhibición (I) sobre la región experimental, para de esta forma comprender cómo los factores estudiados afectan la inhibición (I).

Por otra parte, es importante mencionar que los supuestos del modelo, normalidad, varianza constante e independencia de los residuales, se cumplen satisfactoriamente [26].

Cabe mencionar que los resultados obtenidos en el presente estudio, concuerdan con los reportados en la literatura en relación al efecto significativo de los parámetros del ultrasonido sobre el proceso de desaglomeración de nanopartículas. Sin embargo, se requiere una mayor investigación sobre el mecanismo de los parámetros del ultrasonido sobre la propiedad antibacteriana de los materiales compuestos.

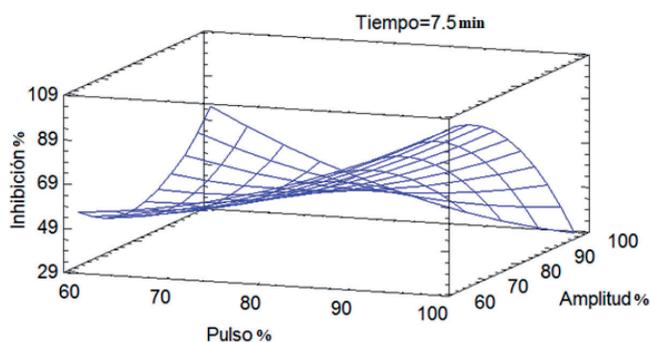


Fig. 7: Superficie de respuesta para pulso y amplitud

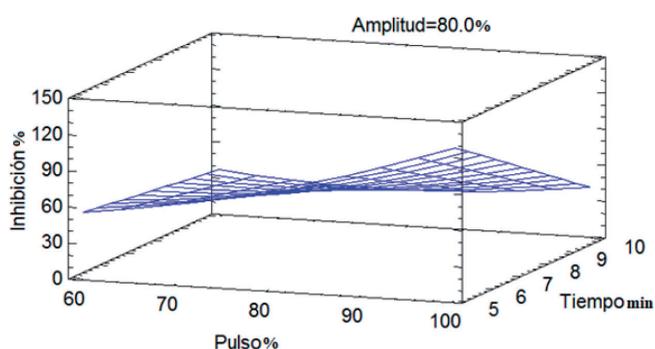


Fig. 8: Superficie de respuesta para pulso y tiempo

5. CONCLUSIONES

Se obtuvieron materiales compuestos de EVA/TiO₂ mediante un método asistido por ultrasonido. El ultrasonido demostró ser un método eficiente para obtener distribuciones homogéneas del reforzante en la matriz polimérica, lo que garantiza, en cierta medida, buenas propiedades en el material final. El material nanocompuesto obtenido presenta propiedades antibacterianas contra la bacteria *E. coli*, que podrían ser utilizadas en una amplia variedad de aplicaciones. Sin embargo, el ultrasonido puede provocar cierta degradación en la matriz polimérica, lo que se comprobó al evaluar la formación de C=C en el EVA después del tratamiento ultrasónico.

Asimismo, se describió una metodología estadística para minimizar el crecimiento de la bacteria *E. coli* en el compuesto de EVA/nanopartículas de TiO₂ y se encontró que los factores del ultrasonido pulsaciones, amplitud y tiempo, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la inhibición bacteriana, a un nivel de confianza del 95%.

Cabe mencionar que el presente artículo, es una de las primeras aproximaciones del uso de la sonicación, en soluciones de alta viscosidad como los polímeros en solución.

REFERENCIAS

- [1] Fages E, Pascual J, Fenollar O, García-Sanoguera D, Balart R. "Study of Antibacterial Properties of Polypropylene Filled with Surfactant-Coated Silver Nanoparticles". *Polymer Engineering & Science*. Vol.51-4 p.804-811. DOI: <https://doi.org/10.1002/pen.21889>
- [2] Caseri W. "Nanocomposites of polymers and metals or semiconductors: Historical background and optical properties". *Macromolecular Rapid Communications*. Vol.21-11 p.705-722. DOI: [https://doi.org/10.1002/1521-3927\(20000701\)21:11<705::AID-MARC705>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1521-3927(20000701)21:11<705::AID-MARC705>3.0.CO;2-3)
- [3] Sondi I, Salopek-Sondi B, "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria". *Journal of Colloid and Interface Science*. Vol.275-1 p.177-182. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>
- [4] Ren G, Hu D, Eileen W, Cheng C, et al. "Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications". *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 33-6 p.587-590. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.12.004>
- [5] Akhiles R, Prabhune A, Perry-Carole C. "Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings". *Journal of Materials Chemistry*. Vol.20-32 p.6789-6798. DOI: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/jm/c0jm00817f#!divAbstract>
- [6] Lun-Yeung K, Kin-Leung W, Yao N, et al. "Reactivity and antimicrobial properties of nanostructured titanium dioxide". *Catalysis Today*. Vol.143-3 p.218-224. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.09.036>
- [7] Liu Y, He L, Mustapha A, et al. "Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7". *Journal of Applied Microbiology*. Vol.107-4 p.1193-1201. DOI: <http://www.reviberpol.iibcaudo.com.ve/pdf/ENE13/estrada.pdf>
- [8] Estrada-Monje A, "Síntesis de materiales a base de uretano reforzados con nanopartículas metálicas. I Síntesis y caracterización". *Revista Iberoamericana de Polímeros*. p.28-30. DOI: <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/JUL12/herrera.pdf>
- [9] Fujishima A, Rao T, Tryk D. "Titanium dioxide photocatalysis" *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. Vol.1-1, p.1-21. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1389-5567\(00\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S1389-5567(00)00002-2)
- [10] Santhosh S, Natarajan K. "Antibiofilm Activity of Epoxy/Ag-TiO₂ Polymer Nanocomposite Coatings against *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*". *Coatings*. Vol.5-2 p.95-114. DOI: <https://doi.org/10.3390/coatings5020095>
- [11] Hayata Y, Maneerat C. "Antifungal activity of TiO₂ photocatalysis against *Penicillium expansum* in vitro and in fruit tests". *International*

- Journal of Food Microbiology. Vol.107-2 p.99-103. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.018
- [12] Pişkin S, Palantöken A, Sari-Yılmaz M. "Antimicrobial Activity of Synthesized TiO₂ Nanoparticles". International Conference on Emerging Trends in Engineering and Technology (ICETET'2013) Patong Beach, Phuket (Thailand). DOI: http://iieng.org/images/proceedings_pdf/1521E1213004.pdf
- [13] García-Morales M. "Reportes verano de la ciencia". [En línea]. Available: <http://concyteg.gob.mx/resources/reportesVerano2014/MARIA%20INES%20GARCIA%20MORALES%20.pdf>. [Último acceso: Enero 2015].
- [14] Yuping H, Brown C, He Y, Fan J, Lundgren C, et al. "Porous three-dimensional nanorod arrays through selective chemical etching of nanocomposites" Chemical Communications. Vol.48-62, p.7741. DOI: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/cc/c2cc33389a#ldivAbstract>
- [15] Dowling D, Betts A, Pope C, et al. "Anti-bacterial silver coatings exhibiting enhanced activity through the addition of platinum". Surface and Coatings Technology. Vol.163 p.637-640. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0257-8972\(02\)00689-8](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(02)00689-8)
- [16] Jiang H, Manolache S, Amy C, et al. "Plasma-enhanced deposition of silver nanoparticles onto polymer and metal surfaces for the generation of antimicrobial characteristics". Journal of Applied Polymer Science. Vol.93-3 p.1411-1422. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.20561>
- [17] Dubas S, Kumlangdudsana P, Potiyaraj P. "Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers". Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. Vol.289-3 p.105-109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.04.012>
- [18] Fabiani D, Carlo-Montanari G, Palmieri F. "Effect of nanoparticle size on space charge behavior of EVA/TiO₂ nanocomposites". Proceedings of the Annual Report Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena (CEIDP '11). P.322-325. DOI: https://www.researchgate.net/publication/233959435_Effect_of_nanoparticle_size_on_space_charge_behavior_of_EVA-TiO2_nanocomposites.
- [19] Jo M, Yoon J, Kim M, et al. "Preparation and applicability of EVOH/TiO₂ nanocomposites prepared by simple saponification method". ECCM15 - 15TH EUROPEAN CONFERENCE ON COMPOSITE MATERIALS. DOI: <http://www.escm.eu/eccm15/data/assets/2296.pdf>
- [20] Mayer H, Winfried E, Mentler A, "Characterization of soil aggregate stability by ultrasonic dispersion". International Agrophysics. Vol.18 p.39-45. DOI: https://www.researchgate.net/publication/26551890_Characterisation_of_soil_aggregate_stability_by_ultrasonic_dispersion
- [21] Sheng-Lung K, Yann-Cheng C, Ming-Der G, et al. "Nano-particles dispersion effect on Ni/Al₂O₃ composite coatings". Materials Chemistry and Physics. Vol.86-1 p.5-10. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2003.11.040
- [22] Song X, Qiu G, Yang Z. "Dispersion behaviors of CeO₂ nanoparticles in water suspension". Rare Metals. Vol.29-2 p.167-172. DOI: https://www.researchgate.net/publication/290809887_Dispersion_behaviors_of_CeO2_nanoparticles_in_water_suspension
- [23] Q Xiaoming, L Huawu. "Modeling and Analyse the Embedding Mechanism of Nanoparticles into Porous Materials under Ultrasonic Action". Advanced Materials Research. Vol.332-334 p.924-929. DOI: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.332-334.924>
- [24] Popenko E, Gromov A, Shamina Y, et al. "Combustion of Agglomerated Ultrafine Aluminum Powders in Air". Combustion, Explosion and Shock Waves. Vol.38-6 p.665-669. DOI: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1021140227639>
- [25] Raman V, Abbas A. "Experimental investigations on ultrasound mediated particle breakage" Ultrasonics Sonochemistry. Vol.15-1 p.55-64. DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417707000132>
- [26] Gutiérrez Pulido H y De la Vara Salazar R, Aálisis y diseño de experimentos. 2da. Edición. Mc Graw Hill,. México. 2008. 338p. ISBN: 970-10-652.
- [27] Cruz-Salgado J, Alonso-Romero S, Zitzumbo-Guzmán R, et al. "Optimization of the Tensile and Flexural Strength of a Wood-PET Composite". Ingeniería, Investigación y Tecnología. Vol.16-1 p.105-112. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1405-7743\(15\)72111-6](https://doi.org/10.1016/S1405-7743(15)72111-6)
- [28] Cruz-Salgado J, Alonso-Romero S. "Optimization by Response Surface Methodology Applied to Compounds from Recycled Plastic and Wood Waste". July 2012. International Conference on Industrial Engineering and Operations Management, Istanbul, Turkey. DOI: <http://ieom.org/ieom2012/pdfs/31.pdf>
- [29] Montazer M, Behzadnia A, Pakdel E, et al. "Photo induced silver on nano titanium dioxide as an enhanced antimicrobial agent for wool". Journal of Photochemistry and Photobiology. Vol.103-3 p.207-214. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.03.009>
- [30] Espitia P, Soares-Nde F, Teófilo R. "Physical-mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles". Carbohydrate Polymers. Vol.94-1 p.199-208. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.01.003
- [31] Akhavan-Sadr F, Montazer M. "In situ sonosynthesis of nano TiO₂ on cotton fabric". Ultrasonics Sonochemistry. Vol.21-2 p.681-691. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.09.018>
- [32] Saravanan N, Bhuvaneshwari M, Shanthana L. "Antibacterial and antifouling activities of Chitosan/TiO₂/Ag NPs nanocomposite films against packaged drinking water bacterial isolates". Environmental Science and Pollution Research. Vol. 23-19 DOI: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-016-7102-6>
- [33] Al-Refaeie A, Ming-Hsien C, "Optimizing the Performance of Plastic Injection Molding Using Weighted Additive Model in Goal Programming". International Journal of Fuzzy System Applications. Vol. 2 P. 43-54 DOI: 10.4018/ijfsa.2011040104.
- [34] L. Reijnders, "Are forestation, bio-char and landfilled biomass adequate offsets for the climate effects of burning fossil fuels?". Energy Policy. Vol.37-8, p.2839-2841. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2009.03.047>
- [35] Pingret D, Anne-Sylvie F, Chemat F, "Degradation during application of ultrasound in food processing: A review". Food Control. Vol.31-1 p.593-606. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.039>
- [36] Abrusci C, Pablos J, Espin E, et al "Photodegradation and biodegradation by Bacteria of Mulching Films Based on Ethylene-Vinyl Acetate copolymer: Effect of Pro-oxidant Additives". Journal of Applied Polymer Science. Vol.126-5 p.1664-1675. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.36989>
- [37] Suslick K, Price G, "Applications of ultrasound to material chemistry". Annual Review of Materials Research. Vol. 29 p.295-326. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.29.1.295>
- [38] Jin J, Chen S, Zhang J, "UV aging behaviour of ethylene-vinyl acetate copolymers (EVA) with different vinyl acetate contents". Polymer Degradation and Stability. Vol. 95-5 p.725-732. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.02.020>