



Fabricación de hidrogeles de fibroína cargados con nanopartículas de cobre u óxidos de cobre para su potencial uso en control antifúngico

Daniela Acevedo León

Trabajo de grado presentado para optar al título de Bioingeniera

Asesoras

Claudia Patricia Ossa Orozco, PhD en Ingeniería Metalúrgica y de Materiales

Ana María Torres López, PhD en Nanotecnología

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Bioingeniería

Medellín, Antioquia, Colombia

2022

Cita	Acevedo León [1]
Referencia	[1] D. Acevedo León, “Fabricación de hidrogeles de fibroína cargados con nanopartículas de cobre u óxidos de cobre para su potencial uso en control antifúngico”, Trabajo de grado profesional, Bioingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia, 2022.
Estilo IEEE (2020)	



Grupo de Investigación Biomateriales.

Centro de Investigación Ambientales y de Ingeniería (CIA).



Centro de Documentación Ingeniería (CENDOI)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes.

Decano/Director: Jesús Francisco Vargas Bonilla.

Coordinador de programa: Juan Diego Lemos Duque.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A mis papás, quiénes me apoyaron y alentaron a continuar cuando todo parecía perdido y no quedaba voluntad de seguir.

Agradecimientos

A todas las personas que me apoyaron e hicieron posible que este trabajo se realice con éxito. En especial a mis asesoras por compartirme sus conocimientos, por su paciencia y dedicación brindada.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
CAPITULO I.....	13
1. INTRODUCCIÓN	13
A. Planteamiento del problema.....	13
2. OBJETIVOS	16
a. Objetivo general	16
b. Objetivos específicos.....	16
3. REFERENCIAS.....	17
CAPITULO II	19
A. MARCO TEÓRICO	19
1. Nanomateriales.....	19
2. Nanopartículas de origen metálico y de óxido de metales.....	19
3. Método de síntesis.....	20
4. Caracterización de nanopartículas	23
B. ANTECEDENTES	27
1. Nanopartículas de cobre.....	27
2. Propiedades antimicrobianas.....	27
3. Factores que afectan la síntesis de nanopartículas	29
C. METODOLOGÍA.....	31
1. Síntesis	31
2. Caracterización.....	33
D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35

1. Espectrofotometría UV-Vis	35
2. Características superficiales macroscópicas	38
3. Morfología y tamaño	39
a. Dispersión dinámica de luz (DLS)	39
b. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	40
4. Composición	42
5. Difracción de rayos X (DRX)	44
6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	46
D. Conclusiones	47
E. REFERENCIAS	49
CAPÍTULO III	56
A. MARCO TEÓRICO	56
1. Hidrogeles	56
2. Clasificación	57
3. Fibroína	58
a. Propiedades de la fibroína	59
B. ANTECEDENTES	60
1. Estudios de fabricación de hidrogeles de fibroína	60
2. Estudios de fabricación de hidrogeles suplementados con nanopartículas metálicas	61
C. METODOLOGÍA	62
1. Fabricación de hidrogeles con nanopartículas incorporadas	62
a. Extracción y solubilización de fibroína:	62
b. Fabricación de hidrogeles e incorporación de nanopartículas	63
c. Diseño del montaje para la evaluación del hinchamiento de los hidrogeles	63
2. Caracterización de los hidrogeles cargados con nanopartículas	66

A. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
E. CONCLUSIONES	72
F. REFERENCIAS	73
CAPÍTULO IV	77
A. MARCO TEÓRICO	77
1. Nanotecnología en la agricultura	77
B. ANTECEDENTES	78
1. Estudios de aplicación de hidrogeles suplementados con cobre.....	78
C. METODOLOGÍA	80
1. Ensayo de liberación.....	80
2. Cuantificación de cobre	81
D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
E. CONCLUSIONES	84
F. REFERENCIAS	86

LISTA DE TABLAS

TABLA I CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES DE LOS PROTOCOLOS REALIZADOS.	33
TABLA II RESUMEN DE LOS RESULTADOS UV-Vis DE LAS NANOPARTÍCULAS DE Cu PARA LOS DIFERENTES MÉTODOS EVALUADOS	37
TABLA III RESULTADOS DE DLS PARA EL SOBRENADANTE Y PRECIPITADO OBTENIDOS CON DIFERENTES MÉTODOS DE SÍNTESIS.	39
TABLA IV VALORES DE MÁXIMO HINCHAMIENTO PARA HIDROGELES TIPO A	68
TABLA V VALORES DE MÁXIMO HINCHAMIENTO PARA HIDROGELES TIPO B	69
TABLA VI PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO DE LOS HIDROGELES TIPO A.....	71
TABLA VII PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO DE LOS HIDROGELES TIPO B.....	71
TABLA VIII CANTIDAD DE COBRE MEDIDA EN ENSAYO DE LIBERACIÓN EN LOS HIDROGELES TIPO B	84

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema de los pasos involucrados en la síntesis por reducción química.....	21
Fig. 2. Proceso de síntesis verde	23
Fig. 3. Mecanismo de acción de los efectos antimicrobianos de las nanopartículas de óxidos de metales (INECOL, s/f)	28
Fig. 4. Espectros UV-Vis de las nanopartículas obtenidas con los diferentes métodos de síntesis evaluados.....	35
Fig. 5. Imágenes del microscopio óptico utilizando objetivo de 40x. (A) partículas obtenidas por el método 1 y (B) partículas obtenidas por método 3	38
Fig. 6. Imágenes TEM de nanopartículas de cobre sintetizadas con el método 2.....	41
Fig. 7. Imágenes TEM de nanopartículas de cobre u óxido de cobre sintetizadas con el método 4	41
Fig. 8. Espectro FTIR de la solución del método 2.....	43
Fig. 9. Espectro FTIR de la solución del método 4.....	44
Fig. 10. DRX de las nanopartículas de cobre por método 2.....	45
Fig. 11. DRX de las nanopartículas de cobre por método 4.....	46
Fig. 12. (A) Imagen SEM y (B) EDS de nanopartículas de cobre metálico sintetizadas con el método 4.....	47
Fig. 13. Estructura de la fibroína de seda (Meng et al., 2012)	58
Fig. 14. Datos históricos del tiempo en Apartadó (<i>Clima Apartadó: Temperatura, Climograma y Tabla climática para Apartadó - Climate-Data.org, s/f</i>).....	64
Fig. 15. Esquema del montaje para el ensayo de retención de agua (A) día 1 a 4 y (B) 5 a 11	65
Fig. 16. Montaje real implementado para el ensayo de retención de agua.....	67
Fig. 17. Variaciones en el peso de los hidrogeles tipo A (con nanopartículas al 1).....	68
Fig. 18. Variaciones en el peso de los hidrogeles tipo B (con nanopartículas al 0,1%).....	69
Fig. 19. Hidrogeles secos tipo A	70
Fig. 20. Hidrogeles secos tipo B	71
Fig. 21. Esquema del montaje para cuantificación de cobre de la tierra proveniente de Apartadó.....	81
Fig. 22. Curva de liberación de cobre en hidrogeles tipo A (concentración de nanopartículas de 1%)	83

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
μl	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CCD	Dispositivo de carga acoplada
cm	Centímetro
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
Cu	Cobre
Cu⁺²	Ion de cobre
CuCl₂	Cloruro de cobre
CuNPs	Nanopartículas de cobre
CuO	Óxido de cobre
CuO-NPs	Óxidos de cobre
CVD	Deposición química en fase vapor
DLS	Dispersión dinámica de luz
DRX	Difracción de rayos X
EDS	Espectroscopía de rayos X de dispersión de electrones
Fe₃O₄	Óxido de hierro
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
FoC 4RT	Fusarium oxysporum f. sp. cubense
g	Gramo
h	Hora
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
INSHT	Instituto Nacional de Seguridad e Higiene del Trabajo
IR	Espectroscopía Raman e Infrarroja
kV	Kilovoltio
LASis	Ablación con láser de pulso en solvente
M	Molar
mA	Miliamperio

MIC	Concentración mínima inhibitoria
ml	Mililitro
mmol	Milimol
NaOH	Hidróxido de sodio
NiO	Óxido de níquel
nm	Nanómetro
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TiO₂	Óxido de titanio
USD	<i>United States Dollar</i>
ZnO	Óxido de zinc
λ	Longitud de onda
μg	Microgramo

RESUMEN

El presente trabajo de investigación estudia la fabricación de hidrogeles de fibroína cargados con nanopartículas de cobre u óxidos de cobre para el control del hongo *Fusarium* en las plantas de banano y plátano. Se evaluaron cinco métodos de síntesis verde y síntesis química, de los cuales se seleccionó el método 4 como el más adecuado para la síntesis de nanopartículas de cobre, utilizando sulfato de cobre pentahidratado como sal precursora, ácido ascórbico como agente reductor y almidón como estabilizante. A partir de este método se obtuvieron nanopartículas de cobre metálico con forma esférica y con un tamaño de 4,5 nm; después, se elaboraron hidrogeles de fibroína con concentración al 1% (tipo A) y al 0,1% (tipo B), estos fueron sometidos a un ensayo en el que se evaluó durante 11 días la liberación de las nanopartículas, el hinchamiento, y, la pérdida de peso de los hidrogeles. Los resultados mostraron que los hidrogeles tipo A perdieron mayor peso que los tipo B. Por su parte, los resultados obtenidos con los hidrogeles tipo B no son concluyentes por las dificultades presentadas con el montaje del ensayo de liberación, lo cual no propició la correcta cuantificación del cobre.

***Palabras clave* — Nanopartículas de cobre, hidrogeles, fibroína, liberación, síntesis.**

ABSTRACT

The present research work studies the fabrication of fibroin hydrogels loaded with copper nanoparticles or copper oxides for the control of the *Fusarium* fungus in banana and plantain plants. Five methods of green synthesis and chemical synthesis were evaluated, of which the 4th method was selected as the most suitable for the synthesis of copper nanoparticles, using copper sulphate pentahydrate as precursor salt, ascorbic acid as reducing agent and starch as stabilizer. From this method spherical copper metal nanoparticles with a size of 4.5 nm were obtained; afterwards, fibroin hydrogels were elaborated with a concentration of 1% (type A) and of 0.1% (type B), these were subjected to a test in which the release of nanoparticles, swelling and weight loss of the hydrogels were tested for 11 days. The results show that the type A hydrogels lost more weight than the type B. On the other hand, the results obtained with the type B hydrogels are not conclusive due to the difficulties presented with the assembly of the release test, which did not lead to the correct quantification of copper.

***Keywords* — Copper nanoparticles, hydrogels, fibroin, release, synthesis.**

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

A. Planteamiento del problema

América Latina y el Caribe producen el 26% del banano y el plátano que se consume a nivel mundial, siendo el banano el cuarto cultivo más importante después del arroz, el trigo y el maíz; además, el plátano representa un elemento básico en la alimentación de la población de esta región (Betancourt et al., 2020).

Las plagas y enfermedades que afectan dichas plantaciones son cada vez más frecuentes y difíciles de tratar, lo que perjudica y dificulta la producción agropecuaria e impide abastecer a la población, y causa un problema económico a los que dependen de dichos cultivos. Dentro de las enfermedades que afectan estas plantaciones se encuentra el “mal de Panamá” causado por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (Foc R4T), el cual causa marchitamiento y muerte de las plantas disminuyendo rápidamente el rendimiento.

Actualmente, cerca de 20 países en todo el mundo han reportado cultivos afectados por el hongo Foc R4T (Vézina, 2014). En Colombia, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), confirmó en agosto de 2019 la contaminación de 175 hectáreas en el departamento de la Guajira. Desde entonces, este organismo se ha aislado de los territorios contaminados para evitar la propagación a otras regiones del país (Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, 2019).

Adicionalmente, el suelo infectado no puede utilizarse para plantaciones de bananos u otros cultivos durante décadas debido a la longevidad del hongo. Si bien no se tienen datos del impacto económico en América Latina y el Caribe, en países como Indonesia las pérdidas ascienden a 121 millones de USD, en Taiwán a 253 millones de USD y en Malasia a 14 millones de USD (*Food and Agriculture administration of the United States*, 2019).

Como se mencionó anteriormente, el control de plagas se ha tratado convencionalmente con el uso de plaguicidas: insecticidas, herbicidas y fungicidas (según el organismo que se quiere

atacar), ya que es un método de acción rápida y actúa de manera eficaz. Sin embargo, estos afectan a organismos polinizadores a medida que actúan sobre las plagas, evitando que el polen sea transportado a otros terrenos e imposibilitando la reproducción de las plantas. Esto sin contar los efectos adversos causados sobre la planta, los frutos, el ambiente y los seres vivos, los cuales incluyen: toxicidad, contaminación ambiental, efectos carcinógenos, disminución de la biodiversidad, contaminación de los suelos y resistencia microbiana (Mesa et al., 2019).

El uso de sustancias químicas para el tratamiento del *Fusarium* es una práctica común pese a que tiene implicaciones negativas en el medio ambiente, genera efectos secundarios en la salud pública y genera altos costos; además, dada su naturaleza química aumenta la resistencia del patógeno (Villa-Martínez et al., 2014). Debido a esto surge la necesidad de encontrar alternativas que permitan controlar el hongo y evitar la muerte de los cultivos de banano y plátano. Al respecto, en los últimos años se han estudiado las nanopartículas para el tratamiento de plantas enfermas, desarrollando diferentes fertilizantes y tratamiento. Particularmente se destacan las nanopartículas de cobre (Cu-NPs) y las de óxidos de cobre (CuO-NPs), las cuales tienen potencial antifúngico (Khatami et al., 2019) y en este sentido, diferentes protocolos para la síntesis de las nanopartículas han sido evaluados. Estos abarcan métodos químicos y físicos (Verma & Kumar, 2019); sin embargo, los químicos resaltan debido a que ciertos factores como el crecimiento y la morfología de las partículas pueden ser controladas optimizando las condiciones de las reacciones (Umer et al., 2012).

La fibroína de seda es la principal proteína de la fibra de seda y se obtiene a partir de los capullos del gusano de seda (*Bombyx mori*). Este polímero natural es de gran interés para el desarrollo de los biomateriales debido a su biodegradabilidad y propiedades mecánicas como resistencia a la rotura, elongación, buena tenacidad y ductilidad (Gaviria Arias & Caballero Mendez, 2015).

Los hidrogeles son polímeros con redes tridimensionales con cadenas flexibles (Arredondo & Londoño López, 2009), estos tienen la capacidad de retener y liberar agua, por lo que a menudo son utilizados como vehículos para la liberación de compuestos de interés como en la industria

farmacéutica para la liberación de fármacos, en la agricultura para la nutrición de cultivos o tratamientos contra enfermedades.

Según lo anterior, los hidrogeles fabricados con fibroína podrían ser un vehículo para las nanopartículas de cobre u óxidos de cobre y ser utilizados en control biológico. De acuerdo con esto, este proyecto tiene como objetivo fabricar hidrogeles a partir de fibroína que contengan nanopartículas de cobre u óxidos de cobre con posible utilización en el tratamiento contra el *Fusarium* en los cultivos de banano y plátano. Para la síntesis de las últimas se utilizarán síntesis química y síntesis verde, el primero consiste en una reducción química con sulfato de cobre (II) pentahidratado como sal precursora y ácido ascórbico como agente reductor. El segundo método se realiza a partir de una fuente biológica, en este caso el extracto de *Ocimum basilicum* comúnmente denominada albahaca morada. Además, se fabricarán hidrogeles de fibroína a los cuales se les añadirán las nanopartículas obtenidas. Posterior a esto, se realizarán diferentes técnicas de caracterización para evaluar tanto las nanopartículas como los hidrogeles con nanopartículas. Finalmente, se evaluarán diferentes propiedades de los hidrogeles con nanopartículas para su potencial uso en el control biológico.

2. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Fabricar hidrogeles de fibroína con adición de nanopartículas de cobre u óxidos de cobre con potencial aplicación en control biológico.

b. Objetivos específicos

1. Implementar protocolos de síntesis verde y de síntesis química para la producción de nanopartículas de cobre u óxido de cobre.
2. Fabricar hidrogeles de fibroína con adición de nanopartículas de cobre u óxido de cobre.
3. Caracterizar física y químicamente las nanopartículas obtenidas y los hidrogeles producidos.
4. Evaluar la potencial aplicación de los hidrogeles cargados con nanopartículas en el control biológico.

3. REFERENCIAS

- [1] Arredondo, A., & Londoño López, M. E. (2009). Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica*, 3(5), 83–94.
- [2] Betancourt, M., Dita, M., Saini, E., & Salazar, L. (2020). Agenda para la prevención y el manejo de brotes de la raza 4 tropical de *Fusarium* (R4T) en el cultivo de musáceas en AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE (ALC). En *Banco Interamericano de Desarrollo*. <https://bit.ly/3FQCGgV>
- [3] Food and Agriculture administration of the United States. (2019). *Food Outlook: Biannual report on global food markets*. <https://bit.ly/3eOsLws>
- [4] Gaviria Arias, D., & Caballero Mendez, L. C. (2015). Uso de biomateriales a partir de la fibroína de la seda de gusano de seda (*Bombyx mori* L.) Para procesos de medicina regenerativa basada en ingeniería de tejidos. *Revista Médica de Risaralda*, 21(1), 38–47. <https://bit.ly/330d4jx>
- [5] Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. (2019, agosto 8). *ICA amplía y refuerza las medidas, que ya venía implementando, para atender la presencia de Fusarium R4T en cultivos de banano en La Guajira*. <https://bit.ly/3eRaXRy>
- [6] Khatami, M., Varma, R. S., Heydari, M., Sedighi, A., Askari, H. A., Rohani, M., Arkia, S., Seyedi, F., Khatami, S., Khatami, M., Varma, R. S., Heydari, M., Peydayesh, M., & Sedighi, A. (2019). Copper Oxide Nanoparticles Greener Synthesis Using Tea and its Antifungal Efficiency on *Fusarium solani* Copper Oxide Nanoparticles Greener Synthesis Using Tea and its Antifungal. *Geomicrobiology Journal*, 36(9), 777–781. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1621963>
- [7] Mesa, V. A. ., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve, Z. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 45(1), 23–30. <https://bit.ly/335FzMt>
- [8] Umer, A., Shahid, N., Naveed, R., & Rafique, M. S. (2012). Selection of a suitable method for the synthesis of copper nanoparticles. *NANO: Brief Reports and reviews*, 7(5). <https://doi.org/10/gbb7j6>
- [9] Verma, N., & Kumar, N. (2019). Synthesis and Biomedical Applications of Copper Oxide Nanoparticles: An Expanding Horizon [Review-article]. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5(3), 1170–1188. <https://doi.org/10/hbzig>

[10] Vézina, A. (2014). *Tropical race 4*. <https://bit.ly/3pUisNP>

[11] Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-parra, J. M., & Martínez-Agudelo, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp . y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>

CAPITULO II

A. MARCO TEÓRICO

1. Nanomateriales

A la fecha, no se tiene una definición unificada de qué es un nanomaterial, debido a que diferentes autores y organizaciones regulatorias difieren en el rango dimensional en el que se define un nanomaterial. La comisión europea en 2011 estableció la siguiente definición: “*Se entiende como nanomaterial es un material natural, accidental o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado, y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más de las dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre un nanómetro y 100 nanómetros. En casos específicos y cuando se justifique por preocupaciones de medio ambiente salud seguridad o competitividad, el umbral de la granulometría numérica del 50% puede sustituirse por un umbral comprendido entre el 1% y 50%*” (Dolez, 2015; Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), 2015). En Colombia, el Consejo Nacional Asesor adopta la siguiente definición: “*Material natural o artificialmente sintetizado, manufacturado o fabricado que exhibe propiedades, fenómenos o efectos biológicos que son atribuibles a sus dimensiones hasta una escala límite de un micrómetro. En el caso específico de materiales nanoparticulados, se consideran así cuando estos presenten una distribución mayor al 10% de partículas inferiores o iguales a 100 nm en al menos una de sus dimensiones. Además de esta clasificación se incluyen los materiales no necesariamente nanoparticulados pero que han sido modificados a escala nanométrica en su conformación o interfase para dar lugar a un material con nuevas propiedades.*” (Camacho et al., 2016).

2. Nanopartículas de origen metálico y de óxido de metales

Las nanopartículas pueden ser de origen metálico, de óxidos de metales, bimetálicas, cerámicas, poliméricas, a base de carbono y a base de lípidos (Khan et al., 2019). Las nanopartículas de naturaleza metálica y de óxidos de metales son ampliamente estudiadas en la ciencia y la ingeniería debido a sus propiedades ópticas, electrónicas, químicas, físicas y mecánicas, las cuales van ligadas al tamaño, la estructura cristalina, la morfología y la composición

de las partículas (Yadav, 2016). La característica más importante de las nanopartículas es la relación entre el área de superficie y el volumen, la cual les permite interactuar fácilmente con otras partículas; esta característica hace que la difusión sea más rápida y posible en temperaturas bajas (Kumar K et al., 2018).

Las de naturaleza metálica como la plata, el cobre, el zinc, el oro; y las de óxidos de metales como el óxido de cobre (CuO), el óxido de titanio (TiO₂), el óxido de hierro (Fe₃O₄), el óxido de zinc (ZnO) y el óxido de níquel (NiO) son utilizadas en procesos catalíticos, de sensado, en ingeniería de tejidos, en aplicaciones farmacéuticas y en tratamientos antimicrobianos (Din & Rehan, 2017). Son usualmente sintetizadas mediante métodos físicos y químicos y las características obtenidas están fuertemente ligadas a tipo de método empleado. Por ejemplo, al reducir el tamaño de partícula, los átomos en la superficie se volverán más activos debido al incremento de la distancia entre las coordenadas atómicas y los sitios insaturados (Kamiya et al., 2018).

3. Método de síntesis

La síntesis de nanopartículas se realiza a partir de diferentes procedimientos, los cuales se pueden clasificar como: *bottom-up* o métodos químicos y *top-down* o métodos físicos. Ambos métodos tienen ventajas y desventajas y según sea el propósito de uso de las nanopartículas, es recomendable usar un protocolo u otro.

Métodos químicos

Los métodos *bottom-up* consisten en emplear sustancias simples para sintetizar las nanopartículas, es decir, a partir de átomos, moléculas o *clusters* se “construyen” las nanopartículas. De estos métodos resalta la facilidad para controlar el tamaño de partícula y su morfología, a partir del control de las condiciones de la reacción, como: la concentración y la temperatura del surfactante, el agente precursor, el agente estabilizante y el tipo de solvente (Umer et al., 2012). Algunos métodos químicos son: método coloidal o microemulsión, descomposición térmica, fotoquímica o sonoquímica, deposición química en fase vapor (CVD), síntesis electroquímica, método sol-gel y reducción química.

En el presente trabajo se utilizará el método de reducción química, el cual consiste en utilizar una sal metálica y un agente reductor disueltos en un mismo solvente y en presencia de un estabilizador para controlar la agregación y el crecimiento de las partículas (Gómez Villarraga, 2016) como se ilustra en la Fig. 1. Inicialmente ocurre la nucleación, en la que la sal metálica se reduce a átomos metálicos cerivalentes, estos átomos se encuentran con otros iones, átomos y grupos metálicos; después, se forman los núcleos críticos, agregados estables que permiten el crecimiento de los mismos. El crecimiento de los núcleos depende de la fuerza de los enlaces metal-metal y los potenciales redox de la sal metálica el agente reductor (Ferrando, 2016).

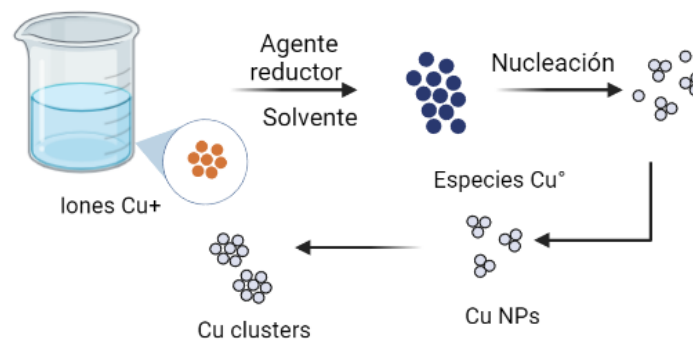


Fig. 1. Esquema de los pasos involucrados en la síntesis por reducción química

Métodos físicos

Los métodos *top-down* consisten en “destruir”, ya que se parte de un volumen macroscópico que es sometido a múltiples fragmentaciones mecánicas hasta llegar a un tamaño específico. Entre los métodos de síntesis física se encuentran:

- a. *Ablación / deposición con láser de pulso*: este método consiste en la producción de nanopartículas a partir de diferentes solventes. La ablación con láser de pulso en solvente (LASis) se realiza en una cámara de vacío en presencia de gases inertes. Las características de las nanopartículas obtenidas son influenciadas por factores como el tipo de láser, la duración del pulso y el tipo del solvente (Ealias & Saravanakumar, 2017; Khodashenas & Ghorbani, 2014).

- b. Molienda de partículas:* este es un método mecánico que se realiza con materia de tamaño micrométrico. Los equipos que comúnmente se utilizan son: molino de bolas de desgaste, molino de bolas planetario, molino de bolas vibrante, molino de bolas de alta energía y molino de tambor de baja energía. Algunas de las limitaciones de la síntesis de nanopartículas con este método es la dificultad de producir partículas ultrafinas. Sin embargo, es de bajo costo, fácil operación y las nanopartículas se pueden producir a gran escala (Khodashenas & Ghorbani, 2014; Rajpant, 2015; Umer et al., 2012).
- c. Pulverización catódica (Sputtering):* es la deposición de nanopartículas en una superficie expulsando partículas de la misma al chocar con iones. La forma y el tamaño de las nanopartículas están determinadas por el grosor de la capa, la temperatura y la duración del recocido, el tipo de sustrato, entre otros factores (Ealias & Saravanakumar, 2017).
- d. Descarga de alambre pulsado:* este método consiste en tomar un alambre de metal y evaporarlo mediante una corriente pulsada para producir vapor, el cual es enfriado posteriormente por un gas ambiental y obtener nanopartículas. Es una técnica ideal para materiales con alta conductividad eléctrica (Umer et al., 2012).

Biosíntesis o síntesis verde

La síntesis verde de nanopartículas surge como una necesidad de encontrar alternativas menos costosas y con menor uso de reactivos químicos tóxicos que disminuyan el impacto ambiental. Por tal razón, se han estudiado diferentes protocolos de síntesis que involucran organismos vivos como bacterias, hongos y plantas, encontrando que tienen gran potencial en la síntesis de nanopartículas metálicas. En el proceso de síntesis, como el mostrado en la Fig. 2, los componentes de las plantas transforman los iones metálicos en nanopartículas de metal utilizando las capacidades reductoras de los metabolitos y las proteínas de ellos mismos. Este método, además de ser de bajo costo, no tóxico e involucrar materia altamente disponible, permite controlar fácilmente la distribución en el tamaño de la partícula, no obstante, tienen una velocidad de reacción lenta (Singh et al., 2018).

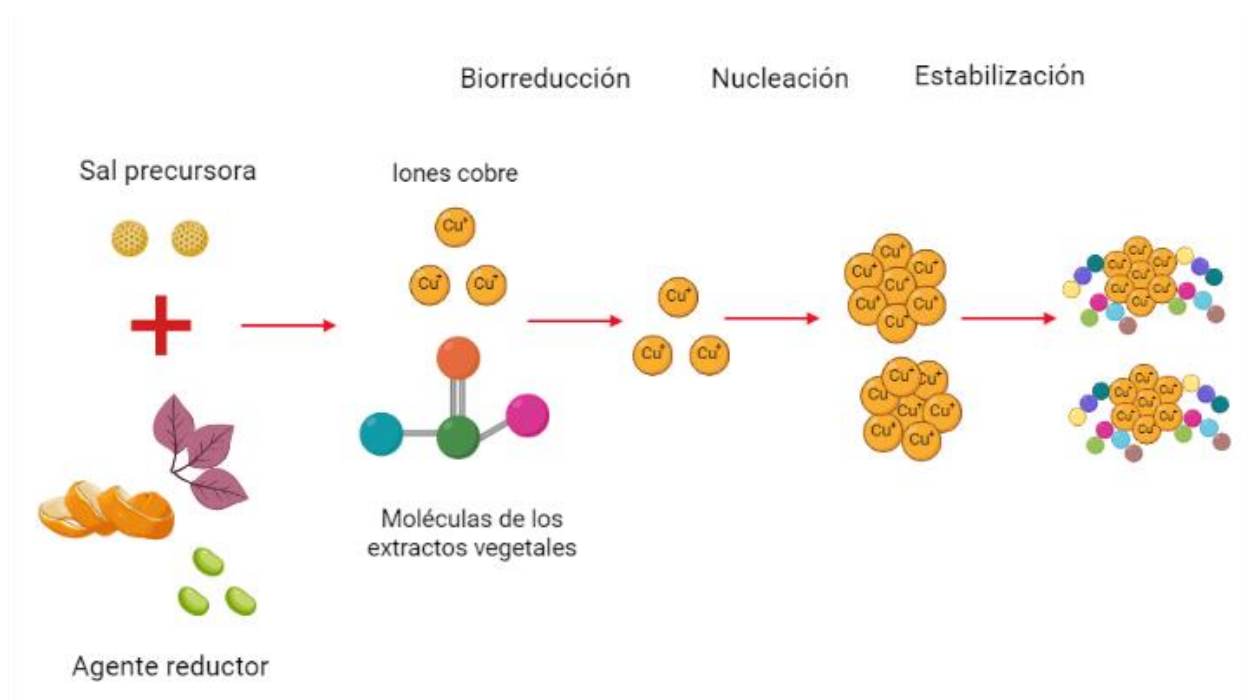


Fig. 2. Proceso de síntesis verde

Las plantas en la síntesis de nanopartículas metálicas actúan como agentes reductores y como agentes de encapsulamiento (*capping agents*) que ayudan a minimizar la acumulación de partículas, controlar su morfología, protegerlas y estabilizarlas. Este método consiste en la obtención del extracto de la planta mediante diferentes procedimientos, posteriormente, el extracto se mezcla con una solución de sal metálica a temperatura ambiente. Las características de las nanopartículas obtenidas son afectadas por la concentración del extracto de la planta, su naturaleza, la concentración de la sal metálica, la temperatura, el pH, entre otros (Gómez Garzón, 2018; Harish et al., 2018; Khodashenas & Ghorbani, 2014; Umer et al., 2012).

4. Caracterización de nanopartículas

Según la aplicación, se buscan características específicas en el tamaño, la composición, la morfología, el área de superficie, la rugosidad, la estabilidad y la distribución, por tal razón, es necesario utilizar técnicas que permitan estudiar y verificar las propiedades físicas, químicas, eléctricas, ópticas, biológicas, etc. A continuación, se indican algunas de las técnicas de caracterización comúnmente empleadas para la caracterización de las nanopartículas:

-
- a. *Espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDS)*: brinda información de las propiedades químicas. Los sistemas de EDS están integrados generalmente en un equipo de SEM, incluyen un detector de rayos X sensible, un Dewar de nitrógeno líquido para enfriamiento y un software que permite recolectar y analizar los espectros de energía. Esta técnica se basa en “bombardear” con un rayo de electrones una muestra que desplaza electrones al interior de ella, y allí se emite una longitud de onda igual a la diferencia de energía del electrón que sale. Es por esto que en un EDS se mide cuánto hay de cierto elemento en determinada longitud de onda, y cada longitud corresponde a un elemento químico. De acuerdo a la fórmula de Rydberg cada elemento tiene longitudes de onda diferentes, lo cual permite identificar los elementos presentes en una muestra. Además, esta técnica permite cuantificar dichos elementos (Garratt-Reed & Bell, 2003)
- b. *Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)*: esta técnica da información de los grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas metálicas. Esta técnica permite identificar los materiales orgánicos, midiendo las bandas de absorción infrarroja de los componentes moleculares y sus estructuras. Este espectro se grafica como intensidad versus número de onda (cm^{-1}). La intensidad suele ser representado como un porcentaje de la luz transmitida o absorbida en cada número de onda (Silverstein et al., 2005).
- c. *Espectrofotometría UV-Vis*: la resonancia del plasmón de superficie es la manifestación de un efecto de resonancia debido a la interacción de los electrones de conducción de las nanopartículas metálicas con fotones incidentes (Jana et al., 2016). Este fenómeno depende del tamaño, la forma, la naturaleza y composición del medio de dispersión, y genera una banda de resonancia característica al usar espectroscopía UV-Vis. Por tal razón, dependiendo de la naturaleza de la nanopartícula se obtiene un máximo de absorción en un intervalo u otro, y, este a su vez, puede presentar corrimientos dependiendo del tamaño y la forma de las nanopartículas (Parveen et al., 2016). La espectrofotometría UV-Vis es una técnica cuantitativa que permite caracterizar

nanopartículas mediante la medición de la longitud de onda; con esta se puede obtener información de la formación de nanopartículas en solución acuosa. El equipo utiliza un rayo con una longitud entre 180 y 1100 nm que atraviesa una solución contenida en una celda de cuarzo. La muestra absorbe la radiación visible y la cantidad de luz absorbida por la solución depende la concentración, de la longitud del camino de la luz a través de la cubeta y qué tan bien se absorbe la luz a determina longitud de onda. La transmitancia es definida como el cociente entre la radiación saliente y la entrante; si la solución no absorbe luz, la transmitancia es 100%. Esta técnica funciona muy bien en muestras líquida y en soluciones, pero si la muestra es más una solución de partículas sólida, la muestra dispersará la luz más que absorberla y los datos serán sesgados (Raja & Barron, 2021).

Las bandas de resonancia de las nanopartículas de cobre metálico están en el rango de 550 a 600 nm (Dhas et al., 1998); sin embargo, el cobre es altamente inestable y tiende a oxidarse fácilmente, convirtiéndose en óxidos de cobre, los cuales tienen bandas de resonancia en longitudes diferentes al cobre metálico. Diferentes autores han reportado formación de nanopartículas de óxido de cobre (II) en bandas de absorción entre 230 y 300 nm (Rafique et al., 2018; Shankar & Rhim, 2014; Singh et al., 2019); y, para óxido de cobre (I) se han reportado picos de absorción entre 590 y 800 nm (Cuevas et al., 2015), aunque algunos reportan bandas en longitudes similares a las del óxido de cobre (II).

- d. *Microscopía electrónica de transmisión (TEM)*: proporciona información del tamaño de partícula, la morfología, la cristalinidad y la interacción entre partículas. Este sistema utiliza un filamento de tungsteno para producir un rayo de electrones en una cámara de vacío, utilizando un campo electromagnético los electrones son acelerados y focalizados para pasar a través de la muestra. La muestra se prepara de tal manera que quede una película muy delgada, menor a 100 nm. Los electrones que atraviesan la muestra golpean una pantalla de fósforo, un dispositivo de carga acoplada (CCD) o una película y allí se produce una imagen. La imagen puede ser más brillante en los lugares donde la

muestra es menos densa, y por el contrario, más oscura en las zonas en las que es más densa, debido a que menos electrones pueden atravesarla (Harish et al., 2018)

- e. *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*: esta poderosa técnica permite observar la superficie de las nanopartículas con una resolución de aproximadamente 1nm. Además, brinda información de la pureza de la muestra. A diferencia de los microscopios convencionales, esta técnica se basa en generar una imagen a partir de electrones. Un haz de electrones se produce en la parte superior del microscopio mediante un cañón, el haz sigue un camino vertical mientras se mantiene en el vacío. El rayo se enfoca hacia la muestra viajando a través de campos electromagnéticos y lentes. Cuando el rayo golpea la muestra, los electrones y los rayos X son expulsados de la misma. Finalmente, los detectores del equipo recolectan los rayos, electrones retrodispersados y secundarios y los convierten en una señal que se envía a una pantalla donde se produce la imagen (Harish et al., 2018). Las muestras metálicas no requieren preparación debido a que son conductoras, pero, las no-metálicas deben ser recubiertas con una fina capa de un material conductor como el oro.
- f. *Dispersión dinámica de luz (DLS)*: brinda información de la distribución de tamaño hidrodinámico. El DLS es una técnica utilizada para determinar el tamaño de las partículas con movimiento browniano en suspensiones coloidales. El movimiento browniano es un movimiento aleatorio de las partículas debido al bombardeo de las moléculas del solvente circundante. El principio es el siguiente: un láser con luz monocromática incide sobre una solución de partículas esféricas en movimiento browniano, provocando un desplazamiento Doppler cuando la luz golpea las partículas en movimiento, haciendo que la longitud de onda entrante cambie. Este cambio está relacionado con el tamaño de partícula y es posible extraer la distribución del tamaño (índice de polidispersidad) y dar una descripción de la partícula en movimiento midiendo el coeficiente de difusión de la partícula y utilizando la función de autocorrelación, la ecuación utilizada es la de Stokes-Einstein (Malvern Instruments Ltd, s/f; Pal et al., 2011).

- g. *Difracción de rayos X (DRX)*: revela información estructural, como la composición química, la estructura cristalina, el tamaño de los cristales, la deformación, la orientación preferida y el espesor de las capas. La difracción de rayos X se basa en la interferencia constructiva de rayos X monocromáticos y una muestra en polvo cristalina. Estos rayos X son generados por un tubo de rayos catódicos, filtrados para producir radiación monocromática, colimados para concentrarse y dirigidos hacia la muestra. La interacción de los rayos incidentes con la muestra produce una interferencia constructiva cuando satisface la ley de Bragg. Finalmente, los rayos X difractados se detectan, procesan y cuentan. La conversión de los picos de difracción a espaciamentos d permite la identificación del material (Harish et al., 2018).

B. ANTECEDENTES

1. Nanopartículas de cobre

El cobre es uno de los metales no ferrosos más importantes, utilizado a menudo por la combinación de sus propiedades químicas, físicas, mecánicas y eléctricas en la construcción, en la industria automotriz, el transporte, la industria química y alimenticia, la industria eléctrica, la salud, etc. De estas propiedades resaltan la excelente conductividad eléctrica y térmica, resistencia a la corrosión, ductilidad y maleabilidad, no obstante, estas características están presentes en escala macrométrica (Khodashenas & Ghorbani, 2014). Cuando el cobre se encuentra en tamaño nanométrico, su comportamiento cambia y sus propiedades mejoran. En consecuencia, las nanopartículas de cobre han sido un foco de interés por poseer cualidades como sensibilidad ultravioleta-visible, conductividad eléctrica, propiedades ópticas y catalíticas y efectos antimicrobianos (Verma & Kumar, 2019).

2. Propiedades antimicrobianas

Las nanopartículas de cobre (CuNPs) son reconocidas por su actividad antimicrobiana. A pesar de que su mecanismo de acción no está completamente esclarecido, se cree que dicha

actividad se debe a la interacción directa de las CuNPs con las membranas microbianas, allí se produce estrés oxidativo por acción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como radicales libres, que permiten el ingreso de las nanopartículas al interior de las células. Una vez están dentro, se liberan iones Cu^{+2} que generan un mal funcionamiento en los organelos intracelulares, y en consecuencia, se produce la inactivación de proteínas, lípidos, peptidoglicanos, daños a enzimas, alteración de procesos bioquímicos, disrupción de ADN, y por último, la muerte celular, conforme se evidencia en la Fig. 3 (Ramyadevi et al., 2012). También se ha atribuido los efectos antimicrobianos al tamaño nanométrico y la alta relación entre la superficie y el volumen de las nanopartículas, lo cual les permite interactuar de cerca con las membranas microbianas, y no únicamente a la liberación de iones (Román et al., 2017; Wei et al., 2010).

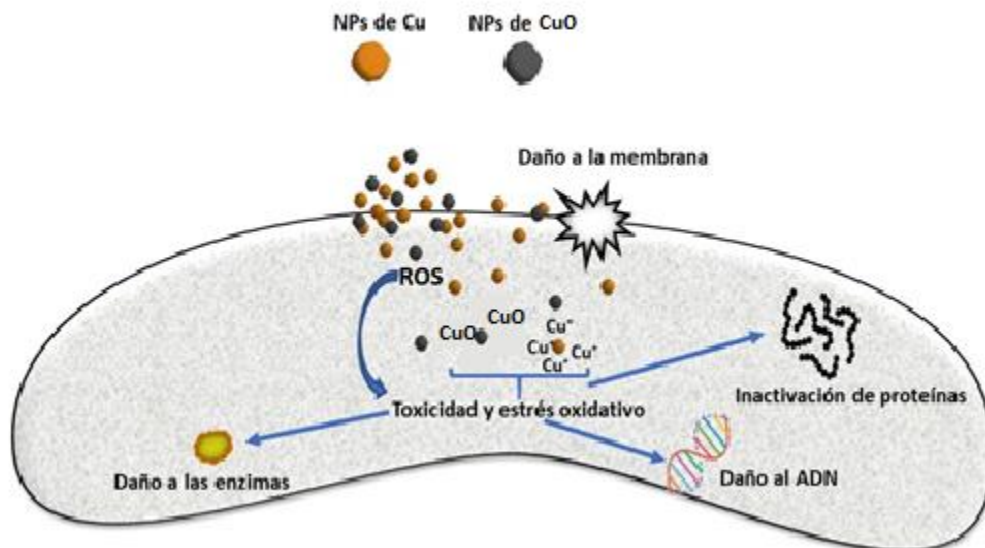


Fig. 3. Mecanismo de acción de los efectos antimicrobianos de las nanopartículas de óxidos de metales (INECOL, s/f)

Kanhed et al. (Kanhed et al., 2014) estudiaron la eficacia de las nanopartículas de cobre con revestimiento de bromuro de hexadeciltrimetilamonio contra hongos patogénicos comunes en los cultivos, como *F. oxysporum*, *C. lunata*, *A. alternata*, y *P. destructiva*; encontrando que la actividad antifúngica era superior al fungicida comercial Bavistin, utilizado como fungicida de acción curativa y preventiva. Por otro lado, Ramyadevi et al. estudiaron el efecto de las nanopartículas de cobre en tres cepas antifúngicas diferentes: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*; en los ensayos se utilizaron suspensiones de $50 \mu\text{l}$ que contenían 10^4 ml^{-1} de células

fúngicas y 50 µl de nanopartículas de cobre recién preparadas. Las muestras fueron incubadas inicialmente por 15 minutos a 4°C, para permitir la difusión, posteriormente se dejaron a 37°C por 48 h. Después del periodo de incubación observaron zonas de inhibición alrededor de la muestra depositada. Los investigadores resaltan que, si bien el valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC) fue menor en comparación a los reportados con ácido carneico (25 µg/ml), penicilina (100 µg/ml) o itraconazole (0.1–100 mg/ml), los resultados obtenidos muestran un valor mayor de MIC en comparación a la actinomicina D.

3. Factores que afectan la síntesis de nanopartículas

La morfología y el tamaño de las nanopartículas son factores que están directamente condicionados por los procesos de síntesis que se utilizan para su fabricación. En los procesos de síntesis química y síntesis verde, el tipo de sal precursora, el agente reductor, la temperatura y el pH, son algunos de los factores causantes que provocan cambios en las características finales de las nanopartículas de cobre.

- a. *Efecto de la sal precursora:* Shankar & Rhim (Shankar & Rhim, 2014) estudiaron el efecto de diferentes sales de cobre en las características de las nanopartículas de cobre. En su estudio evaluaron acetato de cobre, cloruro de cobre y sulfato de cobre en presencia de hidróxido de sodio o ácido ascórbico, ambos como agentes reductores. Encontraron que había diferencias en tamaño y forma según la sal precursora y el agente reductor que utilizaban. En los ensayos con NaOH obtuvieron nanopartículas fibrosas con diferentes tamaños, y en los ensayos con ácidos ascórbico obtuvieron nanopartículas en forma de varilla, esféricas y triangulares. Al igual que los ensayos con NaOH, el tamaño de las partículas variaba con el tipo de sal.
- b. *Efecto del agente reductor:* el agente reductor es el encargado de proveer electrones a los iones precursores que forman átomos, y estos a su vez forman moléculas después de combinarse. En consecuencia, el tamaño de las partículas puede ser resultado de las concentraciones utilizadas para el agente reductor. Chandra et al. (Chandra et al., 2014)

recomiendan que el agente reductor tenga una concentración cinco veces mayor en comparación al precursor para reducir el tamaño de las nanopartículas de cobre.

Los agentes estabilizantes y/o surfactantes son responsables de evitar el crecimiento desmedido, prevenir la agregación de partículas, controlar la tasa de crecimiento y la forma de la nanopartícula (Vemula, 2015). En ocasiones, el agente estabilizante puede ser el mismo agente reductor, por ejemplo, Xiong et al. (Xiong et al., 2019) utilizaron ácido ascórbico como agente reductor y como agente estabilizante para nanopartículas de cobre altamente estables. De acuerdo a los resultados expuestos en el estudio, obtuvieron nanopartículas de 1,34 nm a 1,87 nm, empleando el ácido ascórbico. Las dispersiones mostraron estabilidad incluso después de dos meses de almacenamiento.

- c. *Efecto de la temperatura:* en los métodos de síntesis química la temperatura empleada suele ser menor a 350°C, sin embargo, en los métodos de síntesis verde generalmente se requieren menos de 100°C o incluso se realizan a temperatura ambiente (Ji et al., 2007; Patra & Baek, 2014). De acuerdo a distintos autores, el proceso de formación y crecimiento de las nanopartículas se ve influenciado por la temperatura, dado que las altas temperaturas aumentan la tasa de nucleación aumentando el crecimiento de los nanoclusters (Madras & McCoy, 2004; Qu et al., 2006). Aunque el tamaño se ve influenciado por un conjunto de factores, cada protocolo es único y las condiciones de preparación varían según el caso. Por ejemplo, algunos agentes reductores tienen la capacidad de reducir los iones inmediatamente, a diferencia de otros que son débiles que requieren altas temperaturas para realizar la reducción de los iones metálicos (Han & Kim, 2009).
- d. *Efecto del pH:* el pH es un parámetro crucial en las reacciones de síntesis de nanopartículas. En el caso de las nanopartículas de cobre el pH no debe ser mayor a 5, pues un aumento podría ser la diferencia entre obtener nanopartículas de cobre o de óxidos de cobre. Al incrementar el pH se produce hidróxido de cobre sin formación de nanopartículas (Soomro et al., 2014). Sin embargo, Lenders et al. han reportado

obtención de nanopartículas de cobre entre valores de pH 9 y 11, y nanopartículas de óxidos de cobre en valores de pH de 7 a 9 (Lenders et al., 2016).

C. METODOLOGÍA

En la primera fase de este proyecto se evaluaron 5 métodos para la síntesis de nanopartículas de cobre, algunos de síntesis química y otros de síntesis verde. Con el objeto de determinar el método que mejor se ajustaba a las necesidades del proyecto y a los recursos disponibles, se realizaron modificaciones a los protocolos originales. Además, cada ensayo se realizó por triplicado para asegurar la confiabilidad de los resultados. A continuación, se describen dichos protocolos:

1. Síntesis

- a. *Método #1:* este método planteado por Pariona et al. (Pariona et al., 2019) consiste en preparar una solución con 2.5 g de citrato de sodio tribásico dihidratado disuelto en 100 ml de agua destilada, posterior, se adiciona 5 g de sulfato de cobre pentahidratado. Luego, se agrega bajo agitación una solución de 50 ml al 0,2M de ácido ascórbico y una solución de 30 ml al 1M de hidróxido de sodio. Finalmente, la mezcla se calienta a 95°C durante 90 minutos. Cuando se forme un precipitado de color rojo, la solución se lleva a centrifugación y el polvo obtenido se almacena en nevera.

- b. *Método #2:* denominado como síntesis biológica propuesto por Kothai & R. (Kothai & R, 2018), utiliza sulfato de cobre pentahidratado como sal precursora y extracto de hojas de albahaca morada (*Ocimum sanctum*) como agente reductor. Para el extracto se utilizan hojas frescas de albahaca morada, estas se lavan una vez con agua corriente y después con agua destilada para eliminar tierra e impurezas. Posteriormente, se cortan en pequeños pedazos, de los cuales 100g son agregados a 100 ml de agua destilada. Esto se calienta a 60°C durante 15 minutos, y, finalmente, se enfría a temperatura ambiente.

Para la síntesis de nanopartículas, se gotean 50 ml de extracto de albahaca en una solución de 50 ml de sulfato de cobre al 0,05M. La mezcla se deja reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente. Al terminar la reacción, la solución se centrifuga a 15000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se recupera el precipitado y se almacena en nevera.

- c. *Método #3*: la sal precursora es cloruro de cobre dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). En 50 ml de agua desionizada se agregan 0,1712 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y se deja en agitación hasta formar una solución homogénea de color azul. Después, se gotea lentamente 10 ml de ácido ascórbico al 0,1M dentro de la solución de cloruro de cobre. Terminado este procedimiento el pH se ajusta en 5 utilizando hidróxido de sodio. Después de garantizar el pH, se agregan lentamente 10 ml de CTAB al 0,025M. La mezcla se mantiene en 80°C hasta adquirir una solución de color rojo-marrón que indica la formación de nanopartículas. Al terminar el proceso llegar a temperatura ambiente, el precipitado conserva el color. Este método fue diseñado por Viet et al. (Viet et al., 2016).
- d. *Método #4*: el siguiente proceso de síntesis fue planteado por Dinda et al. (Dinda et al., 2015). Se disuelven 2,5 g de almidón en 15 ml de agua destilada, posterior, se lleva agitación para obtener una mezcla homogénea. Luego, la solución de almidón se gotea a 10 ml de sulfato de cobre pentahidratado al 0,04M Finalmente, se agrega directamente 1g de ácido ascórbico a la mezcla y se mantiene en agitación durante 3 horas a 60°C. La solución se centrifuga durante 5 minutos a 15000 rpm, y, el recuperado se refrigera.
- e. *Método #5*: elaborado por Xiong et al. (Xiong et al., 2019). Al igual que el método 3, se utiliza cloruro de cobre dihidratado (10 mmol) en 50 ml de agua destilada. La solución de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se calienta 80°C en baño maría y se mantiene en agitación magnética, posteriormente, se gotea 50 ml de ácido ascórbico (0,4M) manteniendo las mismas condiciones. La reacción tarda aproximadamente 16 horas en adquirir un color café oscuro que indica la presencia de nanopartículas de cobre y finalmente se centrifuga a 5000 rpm durante 20 minutos.

A continuación, en la TABLA I se presenta un cuadro comparativo en el que se especifica la sal precursora, el agente reductor, el estabilizante, y otras condiciones empleadas para la síntesis de nanopartículas de cobre u óxidos de cobre con los métodos anteriormente mencionados.

TABLA I
CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES DE LOS PROTOCOLOS REALIZADOS.

	M1	M2	M3	M4	M5
Sal precursora	Sulfato de cobre pentahidratado	Sulfato de cobre pentahidratado	Cloruro de cobre dihidratado	Sulfato de cobre pentahidratado	Cloruro de cobre dihidratado
Agente reductor	Ácido ascórbico	Extracto de hojas de albahaca	Ácido ascórbico	Ácido ascórbico	Ácido ascórbico
Estabilizante	Citrato de sodio	-	CTAB	Almidón	-
Velocidad de centrifugación [rpm]	5000	15000	5000	15000	5000
Temperatura	95°C	30°C	80°C	60°C	80°C

2. Caracterización

Para determinar el método de síntesis más adecuado conforme al tipo de aplicación que se busca dar a las nanopartículas, se realizaron diferentes técnicas de caracterización. El ensayo de UV-Vis se realizó por triplicado a las muestras de todos los métodos. Por otro lado, los ensayos de FTIR, DRX y TEM, se realizaron únicamente a las muestras de los métodos 2 y 4, por último, el ensayo de EDS se realizó en una muestra del método 4.

- a. *Espectrofotometría UV-Vis*: inicialmente, se analizó la existencia de nanopartículas de cobre en cada solución obtenida realizando una espectrofotometría UV-Vis con un equipo UV-Vis MAPADA 3200 PC. De acuerdo a Pestryakov et al. (Pestryakov et al., 2004), la banda de absorción depende de la naturaleza de las nanopartículas de cobre,

por lo que el pico de absorción máximo puede estar situado entre 250 nm y 850 nm; por tal razón, para cada ensayo se hizo un barrido de 200 nm a 800 nm

- b. *Dispersión dinámica de luz (DLS)*: posterior a los ensayos de UV-Vis se realizó DLS por triplicado a las soluciones obtenidas con los métodos de síntesis 2, 4 y 5, para determinar el intervalo de tamaño de las nanopartículas. Como variables de interés se estableció el tamaño medio de la población predominante y el índice de polidispersidad que indica la uniformidad promedio de las nanopartículas en una solución, valores cercanos a uno significa que hay mayor distribución de tamaños en una muestra. Se utilizó un equipo Zetasizer Lab con un índice de refracción de 1.54 correspondiente al cobre, cada medida se realizó por triplicado, y el resultado es el promedio de dichas medidas.
- c. *Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)*: Se realizó FTIR para identificar los grupos funcionales en las muestras y poder hacer una comparación. Para realizar este análisis se prepararon pastillas de 5 mg de cada muestra mezcladas con KBr (bromuro de potasio) utilizando un espectrómetro Alpha (Bruker®) tomando 32 escaneos con una resolución de 4 cm⁻¹ barriendo el espectro entre 500 hasta 4000 cm⁻¹.
- d. *Difracción de rayos (DRX)*: por medio de esta técnica se estudió la composición química de las muestras del método 2 y el método 4, y así determinar la presencia o no de nanopartículas de cobre. Los ensayos se realizaron en el difractor de rayos X Malvern-Panalytical modelo Empyrean 2012, con detector Pixel 3D fuente de Cu ($\lambda=1.5418774$) a 45 kV y 40 mA; goniómetro: Omega/2 theta y configuración de la plataforma: reflexión transmisión *spinner* con giro de 4 s.
- e. *Microscopía electrónica de transmisión (TEM)*: se realizó TEM para conocer el tamaño y la forma de las partículas. Se usó el equipo Tecnai F20 Super Twin de FEI. Las

muestras fueron sometidas a sonicación antes de realizar el ensayo para dispersar las partículas.

- f. *Espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDS)*: para realizar una caracterización de los compuestos químicos presentes y su concentración se realizó un ensayo de EDS en el microscopio electrónico de barrido marca JEOL-JSM 6490 LV, el cual opera con una aceleración de 20 V.

D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Espectrofotometría UV-Vis

En la Fig. 4 se presentan los espectros UV-Vis de las nanopartículas sintetizadas. El espectro corresponde a un valor medio, ya que el análisis se realizó por triplicado.

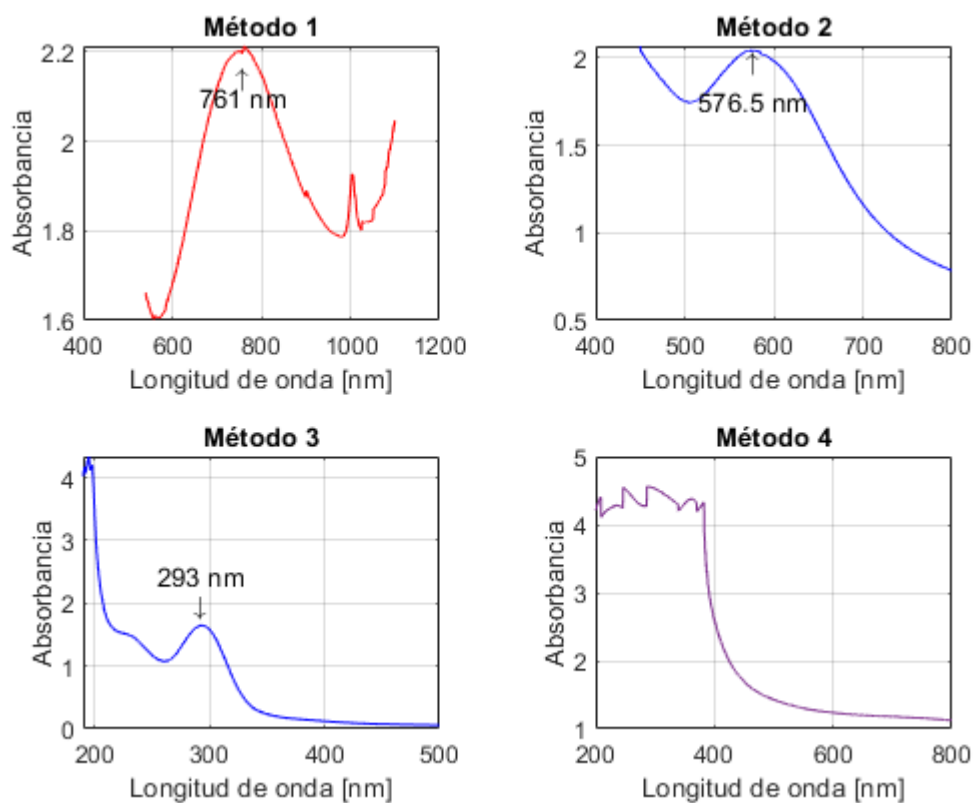


Fig. 4. Espectros UV-Vis de las nanopartículas obtenidas con los diferentes métodos de síntesis evaluados

Con el método 1, el espectro presenta un pico de absorción en $761\pm 0,3$ nm, infiriéndose entonces, acorde a lo reportado por Cuevas et al. (Cuevas et al., 2015) que la solución puede contener nanopartículas de óxidos de cobre (I). Sin embargo, los investigadores Pariona et al. (Pariona et al., 2019) no realizaron ensayo de UV-Vis, por lo que no es posible hacer una comparación.

Por otro lado, en el método 2, que corresponde a síntesis biológica con extracto de hojas de albahaca, se observa un pico en $576\pm 0,76$ nm, con lo que se infiere que probablemente hay nanopartículas de cobre metálico. Kothai & R (Kothai & R, 2018), quienes desarrollaron el método, obtuvieron el pico de máxima absorción en 659 nm. Es posible que la albahaca morada proveniente de India tenga componentes ligeramente diferentes que causaron las disimilitudes entre las nanopartículas obtenidas por los autores y las obtenidas en este trabajo. Los corrimientos de las bandas de absorción también son generados por cambios en el pH, la presencia de moléculas polares en el solvente y las características físicas de las nanopartículas (*Nature of Factors Impacting UV-Vis Spectroscopy*, s/f).

La banda de máxima absorción empleando el método 3, que también corresponde a una síntesis verde, se obtuvo en 293 nm. Dicho resultado dista del reportado por quienes desarrollaron el método Viet et al. (Viet et al., 2016), los cuales indican un pico de absorción máxima en 560 nm. Como se mencionó anteriormente, la interacción entre átomos depende de múltiples factores, entre ellos: el tamaño y la forma de las nanopartículas, el pH y la composición del medio, esto genera corrimientos en las bandas de absorción de acuerdo al método de síntesis, y podría ser la explicación de las diferencias en los espectros.

En la síntesis con el método 4 no se observó un pico de absorción, y a pesar de realizar las debidas diluciones de la muestra para lograr una adecuada lectura, el espectro siempre fue el mismo, entonces los picos obtenidos representan únicamente el ruido del equipo. Al comparar el espectro obtenido por Dinda et al. (Dinda et al., 2015) se observó que el pico de máxima absorción en 590 nm es sutil, por lo que podría inferirse que, en este estudio, la ausencia de un pico de absorción puede deberse a que parte del almidón que se utiliza como estabilizante reacciona con las nanopartículas de cobre y modifica la resonancia del plasmón de superficie. Este fenómeno es reportado por Guo et al. (Guo et al., 1999), en su investigación, al hacer ensayo de UV-Vis en

nanopartículas de cobre inmersas en tolueno no obtuvieron un pico máximo de absorbancia, lo cual atribuyeron a la interacción entre el grupo funcional del surfactante y las nanopartículas de cobre. Hasanin et *al.* (Hasanin et al., 2011) prepararon un nanocompuesto con almidón basado en nanopartículas de cobre micosintetizadas, allí, observaron que la banda de absorción era ancha y con poca intensidad, esto fue atribuido a la interacción del almidón con el plasmón de superficie de los átomos de cobre.

Con la implementación del método 5 Xiong et *al.* se reportan espectros de UV-vis con diferentes picos de máxima absorción que varían de acuerdo a la concentración del ácido ascórbico y al tiempo de reacción empleado en la síntesis (Xiong et al., 2019). Para la concentración evaluada en este trabajo (0,4 M) se reporta un pico máximo de absorción a 500 nm, aproximadamente, pero de manera similar al resultado obtenido con el método 4, el espectro obtenido no presentó una banda de absorción y los picos pueden ser debidos al ruido del equipo, por lo que no se presenta dicho espectro.

En la TABLA II se presenta un resumen de los resultados obtenidos y discutidos anteriormente.

TABLA II
RESUMEN DE LOS RESULTADOS UV-Vis DE LAS NANOPARTÍCULAS DE Cu PARA LOS DIFERENTES MÉTODOS EVALUADOS

	Valor promedio de máximos de absorbancia [nm]	Desviación estándar	Estado de cobre encontrado
Método 1	761	0,30	óxidos de cobre (I)
Método 2	576,5	0,76	cobre metálico sin oxidación
Método 3	293	-	óxidos de cobre (II)
Método 4 y 5	No se obtuvo pico máximo de absorción	-	-

2. Características superficiales macroscópicas

En la Fig. 5 (A) se puede observar una fotomicrografía de la solución final obtenida con el método de síntesis 1, en la que se distingue múltiples partículas rojizas de cobre a escala micrométrica, lo cual difiere de los resultados reportados por Pariona et al. (Pariona et al., 2019), quienes con el mismo método de síntesis obtuvieron nanopartículas de 200 nm a 500 nm.

Se ha reportado que las nanopartículas inferiores a 50 nm podrían tener un mayor efecto antifúngico en el hongo *Fusarium sp.* (Pham et al., 2019), por lo que con el método 1 no es posible obtener un tamaño de nanopartículas adecuado para el posterior uso que espera hacerse de estas en el área de control biológico; en consecuencia, dicho método fue descartado. Algunos estudios han demostrado que el tamaño de partícula tiene influencia directa con la citotoxicidad, las partículas más pequeñas tienen mayor relación superficie de área/masa, lo que aumenta la reactividad superficial y facilita el transporte intracelular (Ameh & Sayes, 2019).

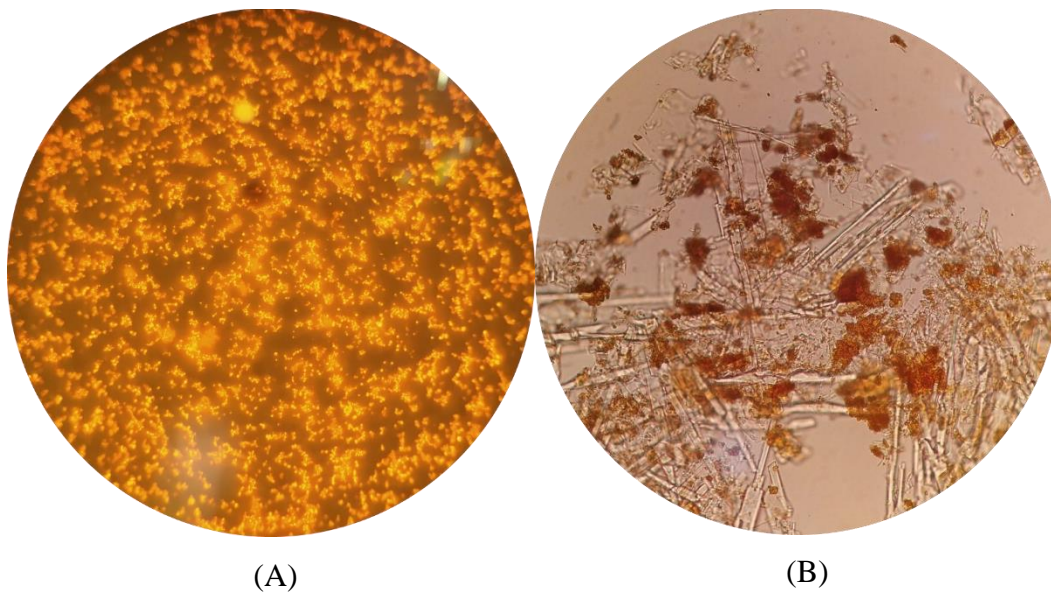


Fig. 5. Imágenes del microscopio óptico utilizando objetivo de 40x. (A) partículas obtenidas por el método 1 y (B) partículas obtenidas por método 3

Como se puede observar en la Fig. 5 (B), en la solución obtenida del método 3 se formaron partículas o cúmulos de partículas a escala micrométrica que no son interés de este proyecto. También, se pueden observar lo que parecen cristales en forma de hilos o barras.

Acorde a los resultados de caracterización por espectrofotometría UV-Vis y la Fig. 5 el método 1 y 3 fueron descartados, debido a que las nanopartículas obtenidas no presentaron las características reportadas por Viet et al. (Viet et al., 2016) Pariona et al. (Pariona et al., 2019); no lográndose obtener reproducibilidad en los métodos.

3. Morfología y tamaño

a. Dispersión dinámica de luz (DLS)

En la TABLA III se presentan los resultados obtenidos en el análisis de DLS. El ensayo se realizó por triplicado y los valores corresponden al promedio de ellos.

TABLA III
RESULTADOS DE DLS PARA EL SOBRENADANTE Y PRECIPITADO OBTENIDOS CON DIFERENTES MÉTODOS DE SÍNTESIS.

	Método 2		Método 4		Método 5	
	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado
Tamaño medio [nm]	1556	5716	491	1037	3420	2199
Índice de polidispersidad	0,94	0,48	0,79	0,82	0,63	0,40

Con el método 2, Kothai et al. (Kothai & R, 2018) reportó un tamaño promedio de 29 nm, mientras que en el presente estudio se obtuvo 1556 nm; este valor está por fuera de la escala definida para un nanomaterial. La diferencia en resultados podría ser debido a que al centrifugar a 15000 rpm las nanopartículas se hubieran aglomerado resultando en cúmulos de gran tamaño; sin embargo, dado que fue el único método en el que la banda de absorción del UV-Vis indicó la posible presencia de cobre metálico, se realizaron posteriores análisis para las muestras obtenidas con el método. Por otro lado, el índice de polidispersidad del sobrenadante es casi 1, lo que significa

que efectivamente la muestra tiene muchas partículas aglomeradas de diversos tamaños. Por el contrario, el índice de polidispersidad del precipitado es relativamente bajo e indica que el tamaño de partículas tiende a ser homogéneo.

Con el método 4 se obtuvieron valores de tamaños de partículas inferiores a 1 micra y aunque no se obtuvo un espectro UV-vis adecuado, sí se obtuvieron las características finales en la solución tal y como lo reportan Dinda et *al.* (Dinda et al., 2015). Por consiguiente, también para la muestra obtenida con el método 4 se realizaron posteriores análisis. Por otro lado, el índice de polidispersidad es cercano a 1 tanto en el sobrenadante como en el precipitado, lo que indica que la distribución de tamaño de las partículas es heterogénea.

Teniendo en cuenta que no se obtuvo un espectro UV-Vis para la muestra sintetizada con el método 5 y los tamaños de partícula son muy grandes, y además difieren mucho de los resultados reportados por Xiong et *al.* (Xiong et al., 2019), quienes obtuvieron un tamaño de partículas de menos de 2 nm, este método se descartó.

b. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Después de realizar los ensayos de DLS, se determinó que era necesario realizar TEM para verificar el tamaño y forma de las partículas. La Fig. 6 deja en evidencia que las partículas inmersas en la solución obtenidas por el método 2 tienen un tamaño de aproximadamente 5,03 nm y son de forma casi esféricas. En la Fig. 7 se encuentran las nanopartículas sintetizadas con el método 4, en las que el tamaño se aproxima a 4,5 nm y también tienden a ser esféricas.

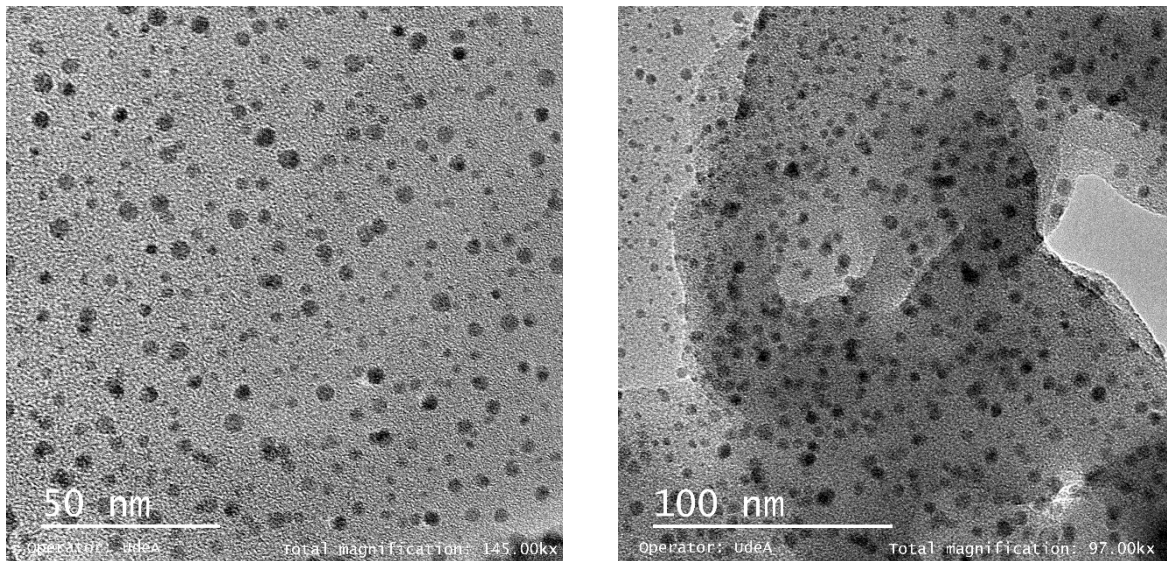


Fig. 6. Imágenes TEM de nanopartículas de cobre sintetizadas con el método 2

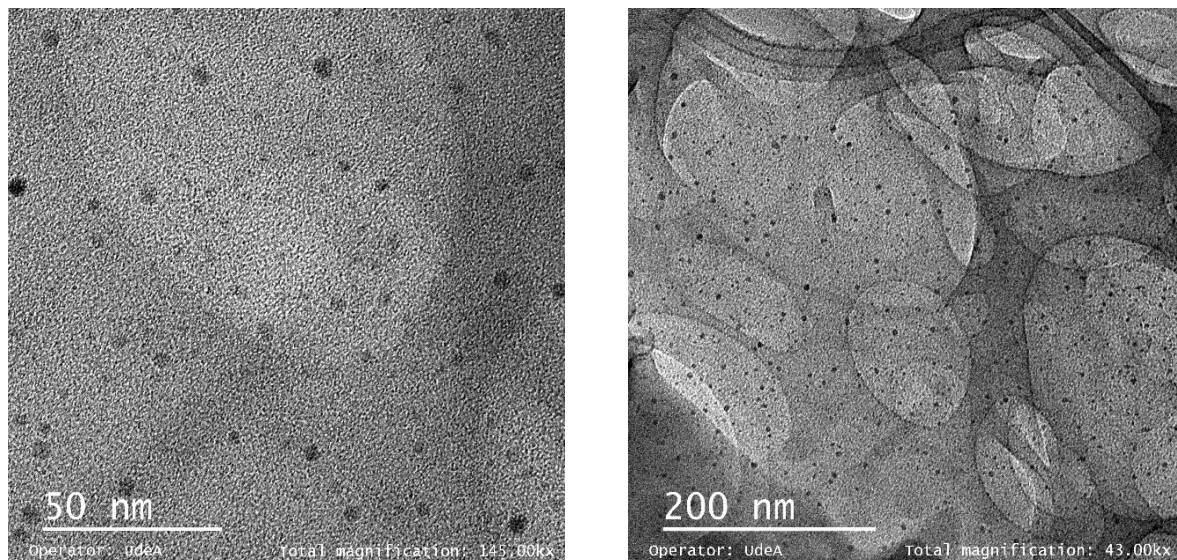


Fig. 7. Imágenes TEM de nanopartículas de cobre u óxido de cobre sintetizadas con el método 4

El cobre es uno de los elementos esenciales requeridos por las plantas, es un micronutriente con un rol importante en la síntesis de clorofila y otros pigmentos de las plantas, también es responsable del metabolismo de proteínas y carbohidratos. La deficiencia de cobre puede conducir a diversos trastornos como el retraso del crecimiento, decoloración y distorsión de las hojas, entre otros (Rai et al., 2018). Por otro lado, se ha demostrado que las nanopartículas de cobre tienen actividad antifúngica, por lo que pueden ser utilizadas como fungicidas. Sin embargo, hay una creciente preocupación por la acumulación, biomagnificación y biotransformación de nanopartículas en cultivos alimentarios, dado que la acumulación de estas en el suelo dará como resultado una mayor

absorción a través de las raíces de las plantas generando efectos nocivos. Wang et al. (P. Wang et al., 2016) estudiaron la captación y traslocación de nanopartículas diseñadas, encontrando que aquellas que tienen un rango de tamaño específico pueden ingresar a ciertas células. En la ruta del transporte apoplástico, el transporte de nanopartículas está regulado por los límites de exclusión de tamaño de las paredes celulares, lo que permite la entrada de nanopartículas de 5 a 20 nm. Esto significa que aquellas nanopartículas de cobre que estén dentro de este rango pueden entrar a las células vegetales, acumulándose en raíces, hojas, semillas y demás. Adicionalmente, la alta acumulación de nanopartículas de cobre puede ocasionar eventos adversos en la planta, por ejemplo, la concentración de CuNPs en el rango de 200 a 1000 mg/L ejerce efectos tóxicos en las semillas *Triticum aestivum*, *Cucurbita pepo* y *Phaseolus radiatus* (Lee et al., 2008). Por consiguiente, si se utiliza una alta concentración de nanopartículas de cobre, y sumado a esto, son de tamaños inferiores a 20 nm puede haber efectos nocivos en la planta.

A pesar que los tamaños encontrados con los métodos 2 y 4 son cercanos a 5 nm, se espera que la cantidad que se utilice para obtener un efecto antimicrobiano, ensayos que están por fuera del alcance de este proyecto, sea tal que no cause efectos tóxicos sobre las células de las plantas.

4. Composición

Se realizó también un ensayo de FTIR a las muestras obtenidas con los métodos 2 y 4 con el fin de identificar los grupos funcionales orgánicos presentes en cada muestra.

En la Fig. 8 se presenta el infrarrojo de la muestra sintetizada con el método 2. La primera banda ubicada en 3389 cm^{-1} corresponde al estiramiento de enlaces -OH de alcoholes y fenoles, seguido a esto se encuentran las bandas 2965 y 2926 cm^{-1} correspondientes a deformaciones simétricas de metilos (CH_3) y metilenos CH_2 , respectivamente. En 2371 cm^{-1} hay dos pequeños picos que evidencian la presencia de armónicos provenientes de grupos aromáticos. En 1605 cm^{-1} hay una banda fuerte de un grupo carbonilo perteneciente a una cetona, en 1512 cm^{-1} hay una banda desplazada de un grupo ($\text{C}=\text{C}$) debido a la presencia de grupos electro atrayentes. Las bandas en 1441 y 1384 cm^{-1} corresponden a deformaciones por fuera del plano de grupos metilo (CH_3) y metileno (CH_2), en 1339 cm^{-1} hay una mezcla de grupos -COOH y -OH de un éster. Las últimas dos bandas en 829 y 621 cm^{-1} muestran grupos aromáticos presentes. Estos grupos funcionales

coinciden con la presencia de compuestos en el extracto de albahaca, tales como: eugenol, ácido ascórbico, polifenoles, flavonoides, saponinas, entre otros (Jacob et al., 2019). El sulfonato aparece a 1339 cm^{-1} por el sulfato de cobre pentahidratado.

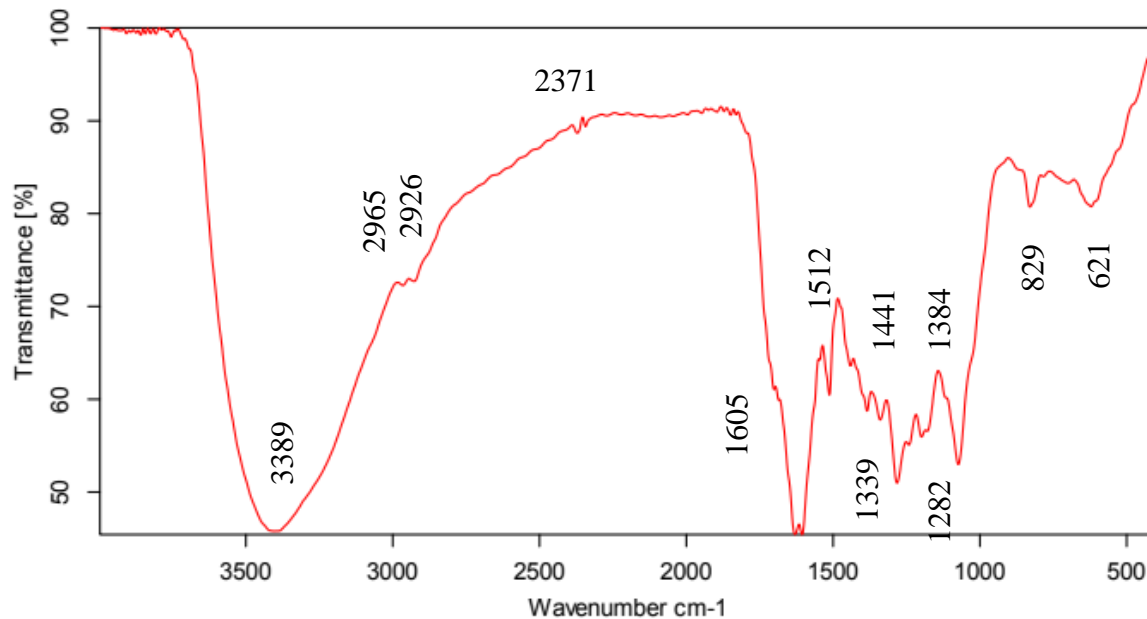


Fig. 8. Espectro FTIR de la solución del método 2

Este espectro coincide en la mayoría de los grupos funcionales reportados Kothai & R. (Kothai & R, 2018), quienes reportan enlaces O-H correspondientes a alcoholes y fenoles, estiramiento de enlaces carbonilo de amidas, enlaces C-H, aminas primarias N-H de flexión, estiramiento de alcoholes y éteres, demostrando la presencia de flavonoides, alcaloides y polifenoles en el extracto de *Ocimum Sanctum* que actúan como agente reductor y protector de las nanopartículas de cobre.

La Fig. 9 representa el espectro obtenido del método 4. Las vibraciones por enlaces OH- es evidente en la banda 3386 cm^{-1} pertenecientes a los hidroxilos del almidón y del ácido ascórbico. Seguida está la banda 2931 cm^{-1} de los grupos CH_2 , luego, 2149 y 2067 cm^{-1} por la vibración del grupo alquino ($\text{C}\equiv\text{C}$) y 1761 cm^{-1} por la vibración de un grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) perteneciente a un éster. En la banda 1690 cm^{-1} se encuentra $\text{C}=\text{C}$, puede pertenecer al ácido ascórbico y puede estar desplazado porque el carbonilo y el oxígeno al tener mayor densidad de carga desplaza la banda otras longitudes de onda. Luego, está las bandas en 1411 y 1367 cm^{-1} correspondientes a

deformaciones fuera del plano de metilos y metilenos, respectivamente. Las bandas en 1204 y 1238 son grupos C-O de esteres. En 1023 cm^{-1} se encuentra un grupo -COOH, en 1153 cm^{-1} el movimiento vibracional de C-O de un éter. Las últimas bandas por debajo de 900 cm^{-1} pueden ser carbonos sustituidos con cobre y grupos CH sueltos.

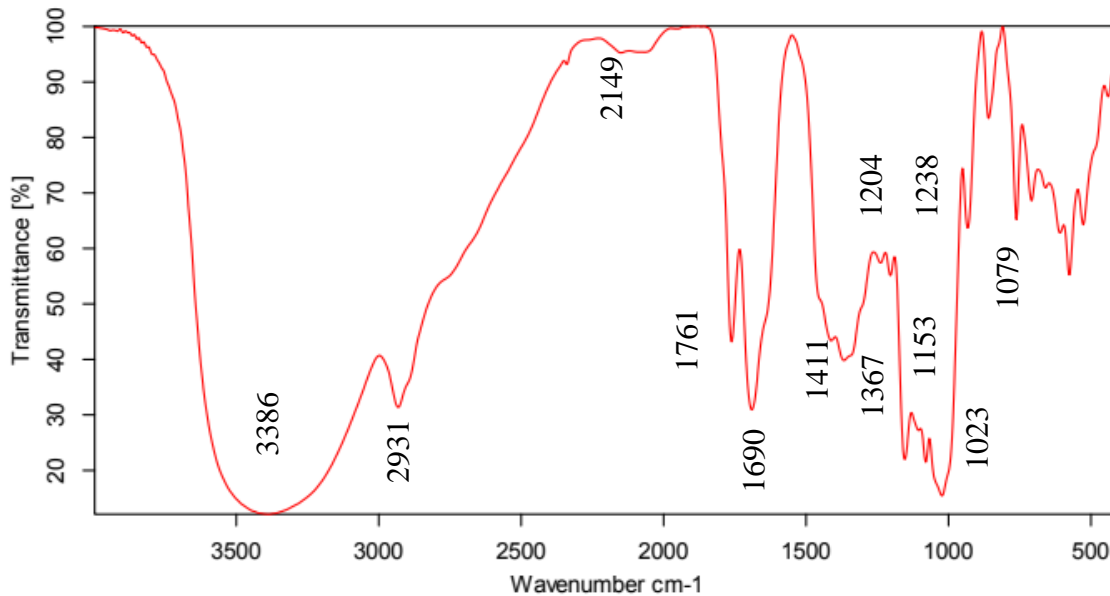


Fig. 9. Espectro FTIR de la solución del método 4

5. Difracción de rayos X (DRX)

En la Fig. 10 se presenta el difractograma de la muestra obtenida por el método 2, se puede observar un pico ancho en 26° , este no corresponde a lo reportado en la literatura para las nanopartículas de cobre. Es posible que algunas macromoléculas, presentes en el extracto, hayan enmascarado la superficie de las nanopartículas de cobre impidiendo la identificación de estas en el DRX. S & A explicaron del mismo modo los picos amplios obtenidos en el DRX de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de las flores de *Erythrina indica* (S & A, 2018). Kurd et al. (Kurd et al., 2017) implementaron un método para producir nanofibras de mucílago de semillas de albahaca con PVA. Al realizar DRX obtuvieron picos amplios en las muestras de semilla de albahaca, PVA y las nanofibras, los investigadores explicaron que esto se debía a la estructura cristalina dependiente de las características del polímero (peso molecular), los parámetros utilizados en el proceso de síntesis y fabricación y el medio. Como resultado, este

método también se descartó, ya que aunque es probable que la síntesis de nanopartículas de cobre haya sucedido, no es posible asegurarlo.

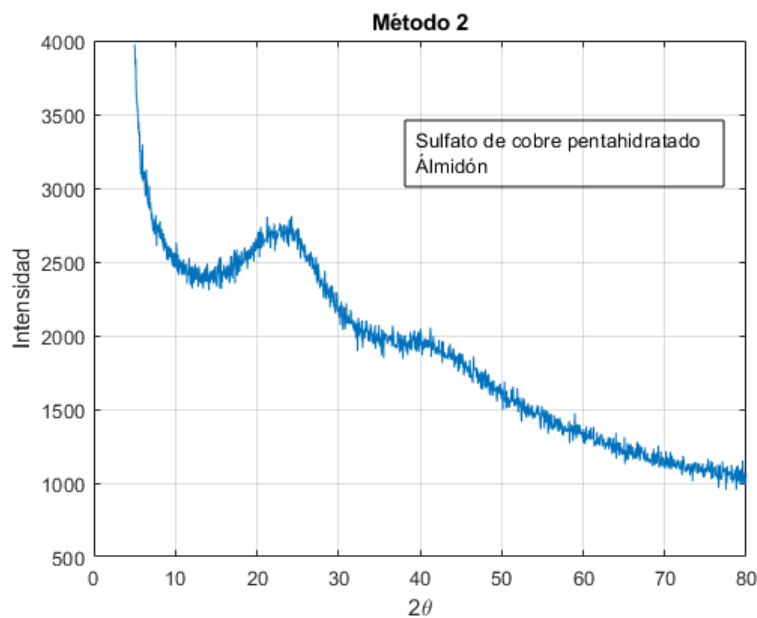


Fig. 10. DRX de las nanopartículas de cobre por método 2

En el difractograma de la Fig. 11 se exhibe el patrón obtenido para la muestra del método 4. Se puede apreciar tres picos de valores 2θ : $43,31^\circ$, $50,45^\circ$ y $74,19^\circ$ con valores de intensidad: 2938, 1985 y 1146, respectivamente, que corresponden a los planos (111), (200) y (220) de la estructura cúbica del cobre metálico. Lo cual concuerda con lo reportado por los autores y por la literatura (Mohamed, 2020; Raspolli Galletti et al., 2013). Se concluye que por este método se obtuvo cobre metálico.

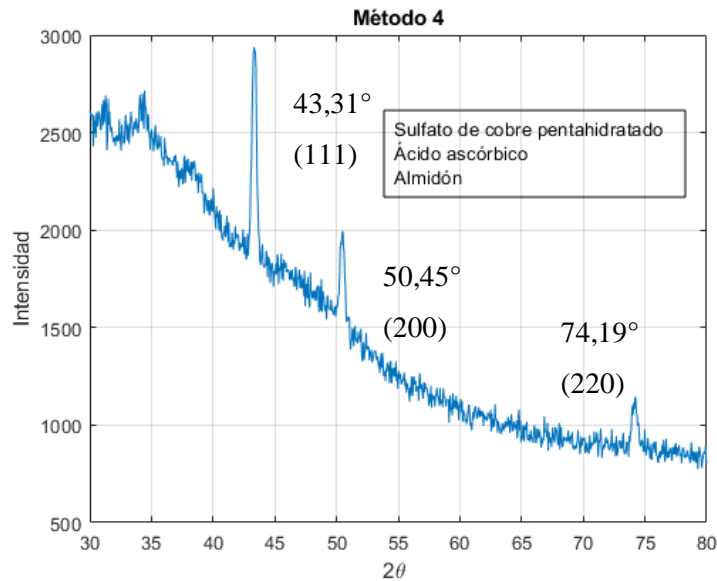


Fig. 11. DRX de las nanopartículas de cobre por método 4

6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con el fin de reafirmar la formación de nanopartículas de cobre con el método 4, se realizó un SEM para conocer el tamaño y forma de las nanopartículas y un análisis de EDS para identificar los elementos presentes en la muestra. A diferencia del TEM, esta vez no se sonicó la muestra antes del ensayo, por eso en la Fig. 12 (A) se observan cúmulos de 2 μm . En la Fig. 12 (B), el análisis de EDS indica la presencia de cobre, carbono y oxígeno, estos dos son atribuidos a los compuestos utilizados en la síntesis. También se observa algo de cloro presente, el cual puede ser resultado de utilizar cloro en la limpieza de la cristalería y/o los viales utilizados para almacenar las muestras.

Finalmente, después de haber evaluado diferentes métodos de síntesis verde y síntesis química, se concluye que el método más apropiado para la síntesis de las nanopartículas de cobre metálico es el método 4, puesto que se obtienen nanopartículas con características química y físicas para la aplicación en el control biológico de hongos en plantas.

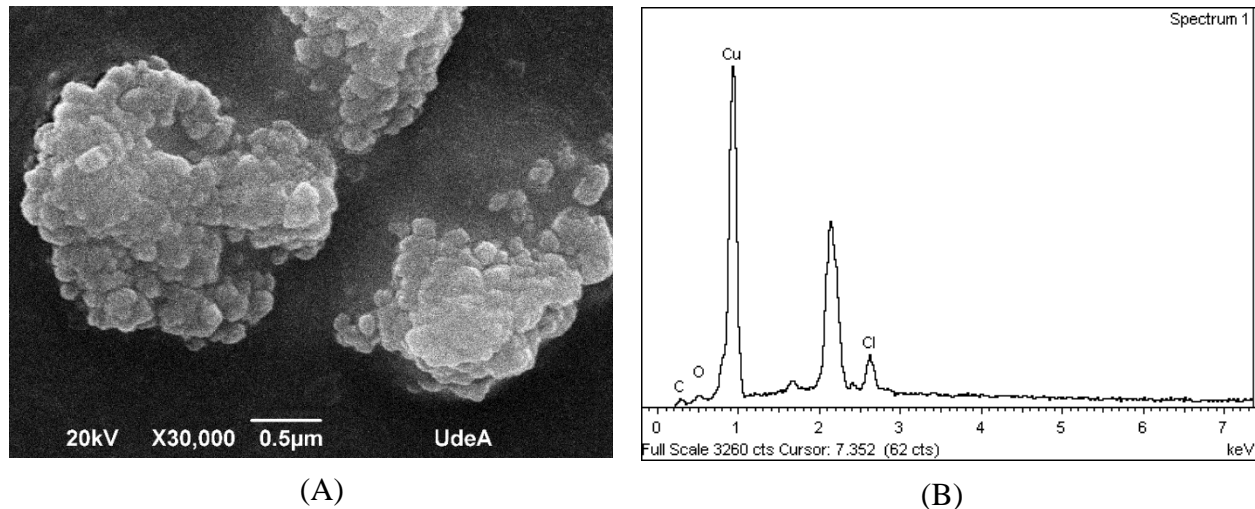


Fig. 12. (A) Imagen SEM y (B) EDS de nanopartículas de cobre metálico sintetizadas con el método 4

D. Conclusiones

1. De los 5 métodos evaluados el método 4 es el único con el que se obtuvieron resultados contundentes sobre la síntesis de nanopartículas de cobre. En el TEM se observaron nanopartículas esféricas de 4,05 nm, aproximadamente, con el difractograma se confirmó la presencia de cobre metálico, el SEM demostró que la muestra contenía agregados de 2 μm, el EDS mostró un porcentaje de cobre, y en el FTIR se identificaron grupos funcionales correspondientes a los compuestos usados en la reacción de síntesis.
2. Pese a que los resultados obtenidos en el espectro UV-Vis parecían confirmar cobre metálico en la muestra, el método 2 se descartó dado que en el difractograma se obtuvieron dos picos anchos que pueden corresponder a un material amorfo, y no hay indicios de las nanopartículas de cobre u óxidos de cobre.
3. La espectroscopía UV-Vis no es una técnica adecuada para el método 4, dado que el almidón puede estar interactuando con las nanopartículas de cobre afectando la resonancia del plasmón de superficie de estas, lo cual impide obtener un pico máximo de absorción. Otros factores como el tipo del solvente, el pH y las moléculas polares también podrían estar afectando el ensayo.

4. En concordancia con el primer objetivo se evaluaron diferentes métodos de síntesis química y síntesis verde, de los cuales el método 4 se implementó para el desarrollo posterior del proyecto con la fabricación de los hidrogeles de fibroína.

E. REFERENCIAS

- [1] [1] Ameh, T., & Sayes, C. M. (2019). The potential exposure and hazards of copper nanoparticles : A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 71(June), 103220. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103220>
- [2] Camacho, Á., Duarte, Á., Dubay, D., Forero, E., González, E., Jaramillo, F., Maldonado, C., Montoya, J., Obregon, N., Osmá, J., Sierra, C., & Urquijo, W. (2016). Definición de nanomateriales para Colombia. *Revista Colombiana de Química*, 45(1), 15–20. <https://doi.org/10/hbxw>
- [3] Chandra, S., Kumar, A., & Tomar, P. K. (2014). Synthesis and characterization of copper nanoparticles by reducing agent. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(2), 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.06.009>
- [4] Cuevas, R., Durán, N., Diez, M. C., Tortella, G. R., & Rubilar, O. (2015). Extracellular biosynthesis of copper and copper oxide nanoparticles by *Stereum hirsutum*, a native white-rot fungus from Chilean forests. *Journal of Nanomaterials*, 2015. <https://doi.org/10/gb5ntj>
- [5] Dhas, N. A., Raj, C. P., & Gedanken, A. (1998). Synthesis, Characterization, and Properties of Metallic Copper Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 10(5), 1446–1452. <https://doi.org/10.1021/CM9708269>
- [6] Din, M. I., & Rehan, R. (2017). Synthesis, Characterization, and Applications of Copper Nanoparticles. *Analytical Letters*, 50(1), 50–62. <https://doi.org/10/hbxx>
- [7] Dinda, G., Halder, D., Vazquez-Vazquez, C., Lopez-Quintela, M. A., & Mitra, A. (2015). Green Synthesis of Copper Nanoparticles and Their Use in Biomedical Applications. *Journal of Surface Science and Technology*, 31(SEPTEMBER), 1–3.
- [7] Dolez, P. I. (2015). Nanomaterials Definitions, Classifications, and Applications. En *Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues* (pp. 3–40). Elsevier. <https://doi.org/10/hbxz>
- [8] Ealias, A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263(3), 032019. <https://doi.org/10/gk9zsc>
- [9] Ferrando, R. (2016). Synthesis and experimental characterization of nanoalloy structures. En *Frontiers of Nanoscience* (Vol. 10, pp. 47–74). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10/hbx4>
- [10] Garratt-Reed, A. J., & Bell, D. C. D. C. (2003). *Energy-dispersive X-ray analysis in the*

- electron microscope* (Garland Science (Ed.); Vol. 49). BIOS. https://books.google.com/books/about/Energy_Dispersive_X_ray_Analysis_in_the.html?hl=es&id=bn09A8GLrngC
- [11] Gómez Garzón, M. (2018). Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27(2), 75–80. <https://doi.org/10/hbx5>
- [12] Gómez Villarraga, F. (2016). *NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y SUS APLICACIONES*. <https://bit.ly/32Ku25s>
- [13] Guo, L., Wu, Z. H., Ibrahim, K., Liu, T., Tao, Y., & Ju, X. (1999). Research of nonlinear optical properties of copper nanoparticles. *European Physical Journal D*, 9(1–4), 591–594. <https://doi.org/10.1007/S100530050506>
- [14] Han, K. N., & Kim, N. S. (2009). Challenges and opportunities in direct write technology using nano-metal particles. *KONA Powder Part Journal*, 27, 73–83. <https://doi.org/10/hbx6>
- [15] Harish, K. K., Nagasamy, V., Himangshu, B., & Anuttam, K. (2018). Metallic Nanoparticle: A Review. *Biomed J Sci & Tech Res*, 4(2). <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2018.04.001011>
- [16] Hasanin, M., Al Abboud, M. A., Alawlaqi, M. M., Tarek, ., Abdelghany, M., Amr, ., & Hashem, H. (2011). Ecofriendly Synthesis of Biosynthesized Copper Nanoparticles with Starch-Based Nanocomposite: Antimicrobial, Antioxidant, and Anticancer Activities. *Biological Trace Element Research*. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02812-0>
- [17] Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). (2015). *Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales*. <http://www.insht.es/catalogopublicaciones/>
- [18] Jacob, J. M., John, M. S., Jacob, A., Abitha, P., Kumar, S. S., Rajan, R., Natarajan, S., & Pugazhendhi, A. (2019). Bactericidal coating of paper towels via sustainable biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* leaf extract. *Materials Research Express*, 6(4), 45401. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aafaed>
- [19] Jana, J., Ganguly, M., & Pal, T. (2016). Enlightening surface plasmon resonance effect of metal nanoparticles for practical spectroscopic application. *RSC Advances*, 6(89), 86174–86211. <https://doi.org/10/hbx7>
- [20] Ji, X., Song, X., Li, J., Bai, Y., Yang, W., & Peng, X. (2007). Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: The third role of citrate. *Journal of the American Chemical Society*, 129(45), 13939–13948. <https://doi.org/10/frzmfm>
- [21] Kamiya, H., Otani, Y., Fuji, M., & Miyahara, M. (2018). Characteristics and Behavior of

- Nanoparticles and Its Dispersion Systems. *Nanoparticle Technology Handbook*, 109–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64110-6.00003-2>
- [22] Kanhed, P., Birla, S., Gaikwad, S., Gade, A., Seabra, A. B., Rubilar, O., Duran, N., & Rai, M. (2014). In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. *Materials Letters*, 115, 13–17. <https://doi.org/10/f5ns8x>
- [23] Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. En *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 12, Número 7, pp. 908–931). Elsevier B.V. <https://doi.org/10/gf3vkp>
- [24] Khodashenas, B., & Ghorbani, H. R. (2014). Synthesis of copper nanoparticles: An overview of the various methods. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31(7), 1105–1109. <https://doi.org/10/hbx8>
- [25] Kothai, S., & R, U. (2018). Green Synthesis, Characterization of Copper Nanoparticles Derived from Ocimum Sanctum Leaf Extract and their Antimicrobial Activities. *Journal of Chemistry and Chemical Sciences*, 8(7), 984–992. <https://doi.org/10/hbx9>
- [26] Kumar K, H., Venkatesh, N., Bhowmik, H., & Kuila, A. (2018). Metallic Nanoparticle: A Review. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 4(2), 3765–3775. <https://doi.org/10.26717/bjstr.2018.04.0001011>
- [27] Kurd, F., Fathi, M., & Shekarchizadeh, H. (2017). Basil seed mucilage as a new source for electrospinning: Production and physicochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 689–695. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.116>
- [28] Lee, W.-M., An, Y.-J., Yoon, H., & Kweon, H.-S. (2008). Nanomaterials in the Environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1915–1921. <http://www.epa>.
- [29] Lenders, J. J. M., Mirabello, G., & Sommerdijk, N. A. J. M. (2016). Bioinspired magnetite synthesis via solid precursor phases. En *Chemical Science* (Vol. 7, Número 9, pp. 5624–5634). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10/hbx9>
- [30] Madras, G., & McCoy, B. J. (2004). Temperature effects on the transition from nucleation and growth to Ostwald ripening. *Chemical Engineering Science*, 59(13), 2753–2765. <https://doi.org/10.1016/J.CES.2004.03.022>
- [31] Malvern Instruments Ltd. (s/f). *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*. Recuperado el 3 de enero de 2022, de <https://bit.ly/3pUd9xO%7D>
- [32] Mohamed, E. A. (2020). Green synthesis of copper & copper oxide nanoparticles using the

- extract of seedless dates. *Heliyon*, 6(1), e03123.
<https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2019.E03123>
- [33] *Nature of Factors Impacting UV-Vis Spectroscopy*. (s/f). Recuperado el 27 de enero de 2022, de <https://www.smacgigworld.com/blog/factors-affecting-uv-vis-spectroscopy.php>
- [34] Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., & Manavalan, R. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(06), 228–234.
- [35] Pariona, N., Mtz-Enriquez, A. I., Sánchez-Rangle, D., Carrión, G., Paraguay-Delgado, F., & Rosas-saito, G. (2019). Green-synthesized copper nanoparticles as a potential antifungal against plant pathogens Nicolaza. *Royal Society of Chemistry*, 9, 18835–18843.
<https://doi.org/10/ggqv9f>
- [36] Parveen, F., Sannakki, B., Mandke, M. V., & Pathan, H. M. (2016). Copper nanoparticles: Synthesis methods and its light harvesting performance. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 144, 371–382. <https://doi.org/10.1016/J.SOLMAT.2015.08.033>
- [37] Patra, J. K., & Baek, K. H. (2014). Green Nanobiotechnology: Factors Affecting Synthesis and Characterization Techniques. *Journal of Nanomaterials*, 2014. <https://doi.org/10/gb6w65>
- [38] Pestryakov, A. N., Petranovskii, V. P., Kryazhov, A., Ozhereliev, O., Pfeiffer, N., & Knop-Gericke, A. (2004). Study of copper nanoparticles formation on supports of different nature by UV-Vis diffuse reflectance spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 3885, 173–174.
<https://doi.org/10/fkjhqp>
- [39] Pham, N. D., Duong, M. M., Le, M. V., Hoang, H. A., & Pham, L. K. O. (2019). Preparation and characterization of antifungal colloidal copper nanoparticles and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici*. *Comptes Rendus Chimie*, 22(11–12), 786–793. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2019.10.007>
- [40] Qu, Y., Yang, H., Yang, N., Fan, Y., Zhu, H., & Zou, G. (2006). The effect of reaction temperature on the particle size, structure and magnetic properties of coprecipitated CoFe₂O₄ nanoparticles. *Materials Letters*, 60(29–30), 3548–3552.
<https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2006.03.055>
- [41] Rafique, M., Shaikh, A. J., Rasheed, R., Tahir, M. B., Gillani, S. S. A., Usman, A., Imran, M., Zakir, A., Khan, Z. U. H., & Rabbani, F. (2018). Aquatic Biodegradation of Methylene Blue by Copper Oxide Nanoparticles Synthesized from *Azadirachta indica* Leaves Extract. *Journal*

- of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 28(6), 2455–2462.
<https://doi.org/10/hbzb>
- [41] Rai, M., Ingle, A. P., Pandit, R., Paralikar, P., Shende, S., Gupta, I., Biswas, J. K., & Da Silva, S. S. (2018). Copper and copper nanoparticles: Role in management of insect-pests and pathogenic microbes. *Nanotechnology Reviews*, 7(4), 303–315.
https://doi.org/10.1515/NTREV-2018-0031/ASSET/GRAPHIC/J_NTREV-2018-0031_FIG_006.JPG
- [42] Raja, P. M. V., & Barron, A. R. (2021, marzo 21). 4.4: UV-Visible Spectroscopy - Chemistry LibreTexts. <https://bit.ly/3JKcOWg>
- [43] Rajpant, N. (2015). METHODS OF PREPARATION OF NANOPARTICLES – A REVIEW. *International Journal of Advances in Engineering & Technology*, 7(4), 1806–1811.
- [44] Ramyadevi, J., Jeyasubramanian, K., Marikani, A., Rajakumar, G., & Rahuman, A. A. (2012). Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters*, 71, 114–116.
<https://doi.org/10/fmsjrtj>
- [45] Raspolli Galletti, A. M., Antonetti, C., Marracci, M., Piccinelli, F., & Tellini, B. (2013). Novel microwave-synthesis of Cu nanoparticles in the absence of any stabilizing agent and their antibacterial and antistatic applications. *Applied Surface Science*, 280, 610–618.
<https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2013.05.035>
- [46] Román, L. E., Castro, F., Maúrtua, D., Condori, C., Vivas, D., Bianclii, A. E., Paraguay-Delgado, F., Solis, J. L., & Gómez, M. M. (2017). Nanopartículas de CuO y sus propiedades antimicrobianas frente a cepas intrahospitalares. *Revista Colombiana de Química*, 46(3), 28–36. <https://doi.org/10/hbzc>
- [48] S, V., & A, A. (2018). X-ray Diffraction (XRD) and Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) Analysis of Silver Nanoparticles Synthesized from Erythrina Indica Flowers. *Nanoscience & Technology: Open Access*, 5(1), 1–5. <https://doi.org/10.15226/2374-8141/5/1/00152>
- [49] Shankar, S., & Rhim, J. W. (2014). Effect of copper salts and reducing agents on characteristics and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters*, 132, 307–311. <https://doi.org/10/f6dbpc>
- [50] Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (Seventh). John Wiley & Sons, Ltd.
- [51] Singh, J., Dutta, T., Kim, K. H., Rawat, M., Samddar, P., & Kumar, P. (2018). ‘Green’

- synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 84. <https://doi.org/10.1186/S12951-018-0408-4>
- [52] Singh, J., Kumar, V., Kim, K. H., & Rawat, M. (2019). Biogenic synthesis of copper oxide nanoparticles using plant extract and its prodigious potential for photocatalytic degradation of dyes. *Environmental Research*, 177, 108569. <https://doi.org/10/gh5gwp>
- [53] Soomro, R. A., Hussain Sherazi, S. T., Sirajuddin, Memon, N., Shah, M. R., Kalwar, N. H., Hallam, K. R., & Shah, A. (2014). Synthesis of air stable copper nanoparticles and their use in catalysis. *Advanced Materials Letters*, 5(4), 191–198. <https://doi.org/10/hbzd>
- [54] Umer, A., Shahid, N., Naveed, R., & Rafique, M. S. (2012). Selection of a suitable method for the synthesis of copper nanoparticles. *NANO: Brief Reports and reviews*, 7(5). <https://doi.org/10/gbb7j6>
- [55] Vemula, M. K. (2015). *Re: What is the function of reducing agent in the preparation of nanoparticles?* <https://bit.ly/3t2QW2u>
- [56] Verma, N., & Kumar, N. (2019). Synthesis and Biomedical Applications of Copper Oxide Nanoparticles: An Expanding Horizon [Review-article]. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5(3), 1170–1188. <https://doi.org/10/hbzg>
- [57] Viet, P. Van, Nguyen, H. T., Cao, T. M., & Hieu, L. Van. (2016). Fusarium Antifungal Activities of Copper Nanoparticles Synthesized by a Chemical Reduction Method. *Journal of Nanomaterials*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1957612> Research
- [58] Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. (2016). Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends in plant science*, 21(8), 699–712. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2016.04.005>
- [59] Wei, Y., Chen, S., Kowalczyk, B., Huda, S., Gray, T. P., & Grzybowski, B. A. (2010). Synthesis of stable, low-dispersity copper nanoparticles and nanorods and their antifungal and catalytic properties. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(37), 15612–15616. <https://doi.org/10/hbzg>
- [60] Xiong, J., Wang, Y., Xue, Q., & Wu, X. (2019). *Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid Green Chemistry Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L -ascorbic acid*. 13(2011), 900–904. <https://doi.org/10/chqghg>
- [61] Yadav, S. K. (2016). Nanoscale materials in targeted drug delivery, theragnosis and tissue

regeneration. En *Nanoscale Materials in Targeted Drug Delivery, Theragnosis and Tissue Regeneration* (1a ed., pp. 41–71). Springer, Singapore. <https://doi.org/10/hbzh>

CAPÍTULO III

A. MARCO TEÓRICO

1. Hidrogeles

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales entrecruzadas producidas por una reacción simple de uno o más monómeros. Estos tienen la capacidad de absorber y retener una cantidad significativa de agua en su interior sin disolverse por esta. La cantidad de agua que puede albergar depende de las propiedades de los polímeros utilizados en el proceso de fabricación, así como la naturaleza y la densidad de las uniones de la red. Los hidrogeles tienen en su estructura grupos funcionales hidrofílicos (hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), amida (-CONH₂) y sulfónico (SO₃H)) unidos al esqueleto polimérico que les permite absorber agua, además, tienen enlaces entrecruzados en las cadenas de la red que evitan la disolución (Ahmed, 2015; Soto & Oliva, 2012).

Aunque en estado de hinchamiento la fracción de masa de agua puede alcanzar el 99% de la masa total, los geles pueden comportarse como un sólido ya que tienen la capacidad de almacenar la fuerza empleada en su deformación, y recuperar su forma original debido a la elasticidad. Durante la fase de hinchamiento, las cadenas poliméricas se estiran y las moléculas de agua toman lugar en los espacios de la red. De manera simultánea, aparece una fuerza retráctil ejercida por la red sobre el disolvente (agua) en oposición al hinchamiento. Este proceso llega a su valor máximo cuando se alcanza un estado de equilibrio entre ambas fuerzas. Por otro lado, cuando un gel pasa de un estado de hinchamiento máximo a un estado colapsado, es decir, pierde la fracción líquida por algún proceso de secado, recibe el nombre de xerogel (Rodríguez-Delgado, 2010; Soto & Oliva, 2012).

2. Clasificación

Los hidrogeles pueden clasificarse en distintas categorías según las características que se tomen en cuenta (Varghese et al., 2020).

- a. **De acuerdo al origen:** los hidrogeles se pueden dividir en aquellos de origen natural y los de origen sintético.
- b. **De acuerdo a la composición polimérica:** según el método de preparación, se forman distintas clases de hidrogeles:
 - Hidrogeles homopoliméricos: se refiere a las redes poliméricas derivadas de especies únicas de monómeros. Los homopolímeros tienen una estructura esquelética reticulada dependiendo de la naturaleza del monómero y de la técnica de polimerización
 - Hidrogeles copolímeros: son compuestos de dos o más especies de monómeros diferentes con al menos un componente hidrofílico, con configuraciones aleatorias, de bloques o alternas en las cadenas poliméricas.
 - Redes de polímeros interpenetrados (IPN): compuesto por dos componentes, sintéticos y/o naturales, reticulados independientes y contenidos en una red.
 - Semi-IPN: a diferencia de los IPN, en este hay un único componente que es polímero entrecruzado y otro componente que es polímero no entrecruzado.
- c. **De acuerdo a la configuración cristalina:** pueden ser amorfos, semi-cristalinos y cristalinos.
- d. **De acuerdo a la apariencia física:** su apariencia varía según el método de preparación y la aplicación; pueden ser películas, microesferas o matrices.
- e. **De acuerdo al tipo de entrecruzamiento:** los hidrogeles pueden tener dos tipos de enlaces cruzados, químicos o físicos. Los químicos son redes entrecruzadas permanentes, a diferencia de los físicos que tienen enlaces transitorios que surgen entrelazamientos de cadenas de polímeros o interacciones físicas como interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. De acuerdo a la carga: pueden tener carga neutral, aniónica, catiónica, anfótera y zwitteriónica.

3. Fibroína

Este polímero natural es de interés, ya que es una alternativa a los polímeros comúnmente usados procedentes del petróleo como el polietileno (PET) y el polipropileno (PP) (Ríos et al., 2017). La fibroína de seda se usa como biomaterial para la producción de películas (Kundu et al., 2008) andamios tridimensionales (Li et al., 2008), hidrogeles (Zheng & Zuo, 2021), fibras electrohiladas (Min et al., 2004) y microesferas (Suzuki et al., 2017).

El gusano de seda (*Bombyx mori*) bajo determinadas condiciones de temperatura y humedad realiza un proceso de metamorfosis en el que construye un capullo de seda, el cual está compuesto por sericina y fibroína, esta última representa entre el 70% y 80% de la fibra de seda y es una proteína en forma de doble filamento, los cuales están unidos por enlaces disulfuro y envueltos por capas de sericina (Ríos et al., 2017).

La fibroína está formada por dos cadenas de proteínas, una pesada (cadena H) de 350 kDa y una ligera (cadena L) de 25 kDa, y una tercera cadena de glicoproteínas llamada p25 de 30 kDa. La cadena H tiene regiones cristalinas hidrófobas constituidas por residuos de Gly-X (X puede ser alanina, serina, treonina o valina), la cuales se repiten numerosas veces. En cambio, la cadena L tiene naturaleza hidrófila y es relativamente elástica. La p25 (fibrohexamerina) se asocia con las cadenas H y L por interacciones hidrófobas y es de gran importancia, ya que se encarga de mantener la integridad del complejo (Gaviria Arias & Caballero Mendez, 2015). La estructura de la fibroína se puede observar en la Fig. 13.

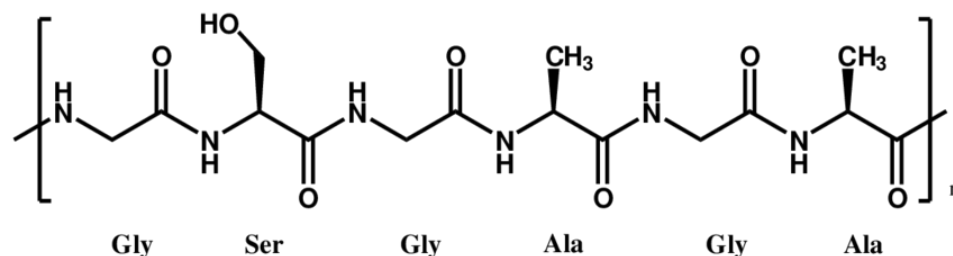


Fig. 13. Estructura de la fibroína de seda (Meng et al., 2012)

a. Propiedades de la fibroína

La fibroína presenta las siguientes propiedades:

1. **Resistencia mecánica:** la fibroína de seda tiene una alta resistencia a la tracción de 300 a 740 MPa, su módulo de Young está en un rango de 10 – 17 GPa. Tiene gran capacidad de deformarse (4-26%) y una alta tenacidad (70-78 MJ/m³) que supera a la de las fibras sintéticas como el Kevlar. Las propiedades mecánicas están relacionadas con sus estructuras jerárquicas, por ejemplo: cristalitos de láminas β y matrices semi-amorfas con estructuras menos ordenadas incluyendo hélices y giros (Koh et al., 2015).
2. **Biocompatibilidad** este polímero de naturaleza proteica es altamente biocompatible. Debido a esto, la fibroína es un material con múltiples aplicaciones en medicina, especialmente en el campo de la ingeniería de tejidos, en el que se ha estudiado su uso en injertos, soportes 3D, mallas quirúrgicas, regeneración de tejidos, etc (Gaviria Arias & Caballero Mendez, 2015). Sin embargo, al ser un material no autólogo puede causar respuesta del organismo a un cuerpo extraño, especialmente debido a su origen no mamífero (Nguyen et al., 2019).
3. **Biodegradabilidad:** la degradación de la seda se estudia con base en la pérdida de masa, el cambio en la morfología, y análisis de degradación *in vitro* (Gaviria Arias & Caballero Mendez, 2015). Asimismo, se han realizado pruebas en animales para evaluar el comportamiento y propiedades mecánicas después de la implantación durante cierto periodo de tiempo; además de exámenes histológicos, que incluyen la observación de la estructura, el desarrollo y funciones en los tejidos y células donde ocurrió la implantación; tinción fluorescente para la obtención de imágenes de células vivas; y ensayos bioquímicos. Se ha observado que los biomateriales de seda no solamente son biodegradables sino también bio-reabsorbibles en procesos mediados por macrófagos (Y. Wang et al., 2008). La desintegración de la seda está ligada a la estructura secundaria de la seda obtenida durante la preparación.
4. **Manipulación de las características estructurales:** la estructura de la seda puede ser manipulada durante el hilado o regeneración para obtener diferentes estructuras secundarias y modificar sus propiedades. La tenacidad de la fibra puede ser modificada

mediante variaciones en los niveles de pH y las concentraciones de las sales en los procesos de extrusión de la proteína. Por ejemplo, Ha *et al.* (Ha *et al.*, 2005) eliminaron los disolventes ácidos lo que dio paso a que las moléculas de fibroína se ensamblaran espontáneamente en una estructura ordenada mejorando las propiedades físicas.

B. ANTECEDENTES

1. Estudios de fabricación de hidrogeles de fibroína

Los hidrogeles se pueden obtener mediante dos enfoques, entrecruzamiento físico o químico de cadenas poliméricas. Las propiedades más importantes de los hidrogeles, como la porosidad, el hinchamiento, el tamaño, la forma, las propiedades mecánicas y reológicas, la biocompatibilidad y la degradación, están relacionadas con las condiciones de fabricación (Soto & Oliva, 2012).

La fibroína de seda se puede gelificar en estructuras tridimensionales como hidrogeles, a partir de diferentes procesos como sonicación (X. Wang *et al.*, 2008), agitación con vórtex (Yucel *et al.*, 2009), calentamiento (Keene *et al.*, 2010), tratamiento con disolvente (Ribeiro *et al.*, 2015), foto-reticulación (Kundu *et al.*, 2012) y electrogelación (Lu *et al.*, 2011). La velocidad del proceso de gelificación se controla mediante la temperatura, el pH, la concentración de fibroína y la adición de otros compuestos. Cabe resaltar que la gelificación más rápida de fibroína de seda se produce con concentraciones altas, niveles bajos de pH, temperaturas altas y adición de Ca^{2+} . La ultrasonicación es un método novedoso que causa incrementos en la temperatura, fuerzas mecánicas y cortante, y un incremento de las interfases líquido-aire, lo cual acelera el proceso de gelación y da lugar a hidrogeles de fibroína con estructuras de láminas β (X. Wang *et al.*, 2008).

Fang *et al.* (Fang *et al.*, 2006) evaluaron la viabilidad de emplear los hidrogeles de fibroína de seda como vehículos de liberación controlada. Para la preparación de los hidrogeles disminuyeron los niveles de pH hasta 4, ya que tenían la hipótesis de que en este punto disminuiría la repulsión entre las moléculas de fibroína de seda y se promovería la desorción de agua de las proteínas, y, en consecuencia, los tiempos de gelificación serían más cortos. Además, compararon la tasa de liberación de buprenorfina en hidrogeles de quitosano e hidrogeles de fibroína de seda. El estudio

concluyó finalmente que la tasa de liberación del medicamento en los hidrogeles de fibroína de seda era inferior a la de los hidrogeles de quitosano.

2. Estudios de fabricación de hidrogeles suplementados con nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas (Au, Al, Fe, Si, Ag, Cu) son tóxicas para los seres vivos, por consiguiente, sintetizarlas y utilizarlas en polvo es peligroso; además, la recuperación de nanopartículas de metales preciosos después de la catálisis o de tenerlas en solución es un proceso complejo. Por tal razón, se utilizan diferentes alternativas que sirvan como medio de transporte (Mitra & De, 2016).

En este sentido, se ha venido estudiando la incorporación de las nanopartículas en hidrogeles. Algunos autores se han enfocado en investigar cuál es la mejor manera de incorporarlas, de tal manera, que sean estables y cumplan con las características necesarias. Thoniyot et al. (Thoniyot et al., 2015) realizaron una reseña reuniendo y clasificando diferentes enfoques utilizados para realizar compuestos hidrogel-nanopartículas. Existen 5 enfoques principales que permiten obtener una distribución uniforme de las nanopartículas, estos son: 1. Formación del hidrogel en una suspensión de nanopartículas, 2. Embeber físicamente las nanopartículas dentro de la matriz del hidrogel después de la gelación, 3. Formación de nanopartículas reactivas dentro de un gel preformado, 4. Entrecruzamiento usando nanopartículas para formar hidrogeles, y 5. Formación de geles usando nanopartículas, polímeros y distintas moléculas gelificadoras.

Como se mencionó antes, los hidrogeles tienen ventajas sobre otros sistemas debido a la compatibilidad con tejidos vivos, y, utilizando métodos como el 3, una síntesis de nanopartículas *in situ*, el tamaño y la morfología pueden controlarse variando la densidad de entrecruzamiento de las redes y haciendo modificaciones a los hidrogeles. Mohan et al. (Mohan et al., 2006) desarrollaron un método para fabricar hidrogeles con nanopartículas de plata dispersas. Utilizaron N-isopropilacrilamida (NIPAM) y acrilato de sodio (SA) como precursores para el hidrogel, estos a su vez funcionaron como soporte para la reacción de reducción de las nanopartículas. Una vez tenían la mezcla de dichos reactivos, se adicionó sal de nitrato de plata y borohidruro de sodio para la reducción *in situ*. Los autores explican que la estabilidad de las nanopartículas se da gracias a la

unión de estas a las largas cadenas poliméricas protectoras o las macromoléculas las encapsulan o cubren.

C. METODOLOGÍA

1. Fabricación de hidrogeles con nanopartículas incorporadas

La fabricación de los hidrogeles con las nanopartículas incorporadas se realizó en dos etapas que se describen a continuación:

a. Extracción y solubilización de fibroína: el protocolo utilizado fue planteado Echeverri et al. en el grupo de investigación en Biomateriales (Biomat) (Echeverri et al., 2020). El primer paso para la extracción de fibroína consistió en cortar una cantidad determinada de capullos de seda en pedazos pequeños para facilitar la posterior solubilización de la fibroína. Después, se utilizó una solución de carbonato de sodio en relación 1:10 (seda:Na₂CO₃) agregando agua destilada en relación 1:100 (seda:agua), con el fin de romper los enlaces que unen a la fibroína con la sericina. Luego, a esta solución se le agregaron los trozos de capullos cortados, se dejó en agitación constante a 80°C durante 3 horas aproximadamente. Al terminar el proceso se observó una madeja, lo cual indica que la reacción finalizó. Finalmente, la madeja se lavó varias veces con agua destilada para eliminar los residuos de sericina., y se secó en horno a 40°C durante 24 horas.

El segundo paso consistió en la solubilización de la fibroína, para lo cual se preparó una solución con relación molar 1:2:8 de CaCl₂:etanol:agua destilada y se agregó la madeja por pedazos. La solución se mantuvo a 65°C por 3 h bajo agitación magnética.

El último paso de este procedimiento fue dializar la fibroína solubilizada para eliminar los residuos de sales resultantes. La solución se empacó en membranas porosas de celulosa de 35 a 40 cm de largo, de grado alimenticio; posteriormente, estas se dejaron sumergidas en un recipiente con agua y se almacenaron en la nevera. El agua del recipiente se cambió tres veces al día durante tres días, hasta que la solución en las membranas adquirió un color blanco. Por

último, se midió la concentración de la fibroína obtenida de la siguiente manera, se tomaron tres vidrios reloj y se secaron en horno durante 1 h a 105°C para eliminar la humedad; luego, se registró el peso de cada uno de ellos y se agregó 1 ml de fibroína. Después, los vidrios reloj se llevaron nuevamente al horno a 105°C durante 24 h; y al terminar el proceso de secado, se retiraron del horno y se dejaron en disecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente, se registró nuevamente el peso de los vidrios reloj con la fibroína, y se restó el peso inicial al peso final. Se tomó un promedio de las tres mediciones y se calculó el porcentaje peso/volumen (p/v).

b. *Fabricación de hidrogeles e incorporación de nanopartículas:* el siguiente método fue desarrollado y estandarizado por el grupo de investigación en Biomateriales (Biomat), adaptado del seguido por Zhao et al. (Zhao et al., 2017). Para cada hidrogel se agregó 15 ml de fibroína al 2,1 % (p/v), se añadieron 12 gotas de glicerol, y para la adición de las nanopartículas de cobre se evaluaron 2 porcentajes de 1% y 0,1% (v/v). La mezcla se dejó en agitación suave durante 10 minutos y luego se llevó al agitador orbital durante 5 minutos. Finalmente, se vertió la mezcla en moldes de silicona y se dejó en el horno a 50°C durante 26 h aproximadamente.

c. *Diseño del montaje para la evaluación del hinchamiento de los hidrogeles*

Se realizó un montaje en el que se recrearon algunas condiciones a las que el hidrogel puede estar sometido al emplearse como vehículo en la liberación de nanopartículas para control biológico. Para esto, se investigaron algunas características climáticas de Apartadó, Antioquia, perteneciente a la zona de Urabá, ya que es uno de los mayores productores de banano y plátano en Colombia. De acuerdo a la información reportada en la organización *Climate-data* (*Clima Apartadó: Temperatura, Climograma y Tabla climática para Apartadó - Climate-Data.org, s/f*), los datos históricos meteorológicos de Apartadó, en el 2021, son los registrados en la Fig. 14:

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Temperatura media (°C)	25.2	25.5	25.5	25.4	25.1	25.1	25	25	24.9	24.7	24.8	24.9
Temperatura min. (°C)	22.9	23.2	23.3	23.2	23.2	23	22.9	22.9	22.8	22.7	22.8	22.7
Temperatura máx. (°C)	28.5	29.1	29.2	28.8	28.4	28.3	28.4	28.5	28.4	28.1	27.8	28.1
Precipitación (mm)	134	118	179	275	368	306	318	330	314	300	253	188
Humedad(%)	87%	85%	86%	89%	90%	90%	89%	89%	89%	89%	89%	89%
Días lluviosos (días)	20	18	19	21	22	21	21	22	21	21	20	20
Horas de sol (horas)	5.7	5.7	5.3	5.5	6.6	6.8	6.9	6.8	6.9	7.0	6.4	5.9

Fig. 14. Datos históricos del tiempo en Apartadó (*Clima Apartadó: Temperatura, Climograma y Tabla climática para Apartadó - Climate-Data.org, s/f*)

Seguido a esto, se implementó el siguiente montaje (Fig. 15 (A)): se colocaron dos frascos de 500 ml uno encima del otro, de tal manera que las tapas quedaran juntas e hicieran las veces de soporte. El frasco superior contenía 20 g de tierra y el frasco inferior contenía 30 g, aproximadamente; la tierra era proveniente de Apartadó. En ambos se colocó papel filtro en la base para evitar que la tierra se filtrara cuando se hiciera el riego, y en el frasco inferior se colocó una malla en la parte superior que pudiera sostener el hidrogel dentro del frasco. Por último, se realizaron pequeños orificios en la parte superior del frasco de arriba para realizar un riego. Se realizaron 16 pruebas, 8 de ellas con hidrogeles conteniendo nanopartículas de cobre al 1%, y 8 con hidrogeles conteniendo nanopartículas al 0,1%.

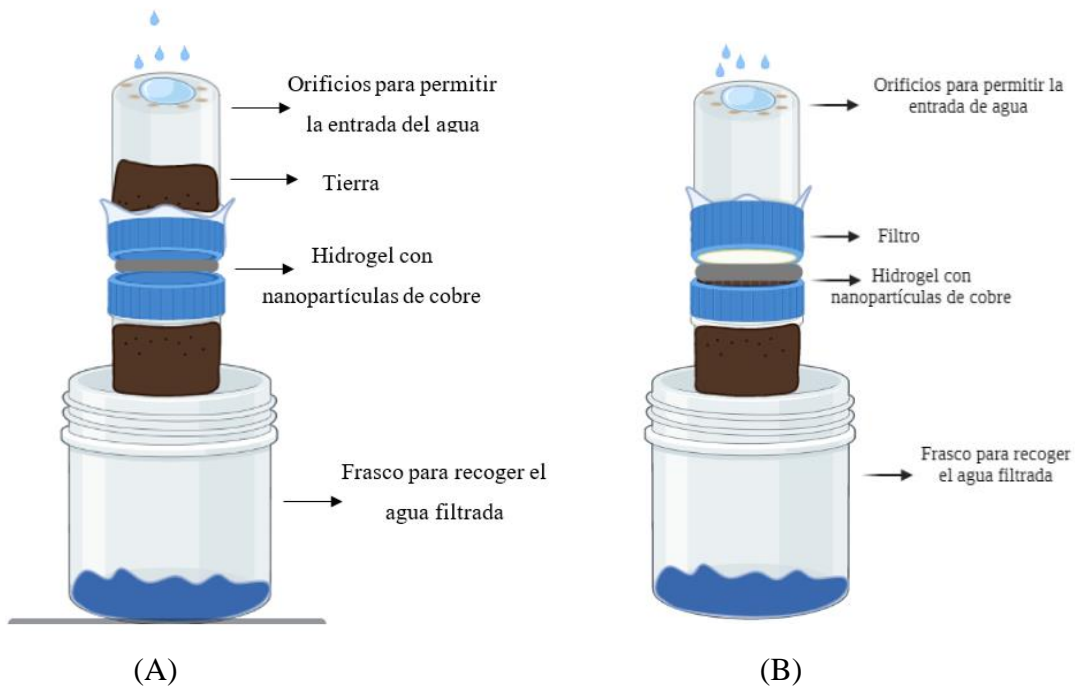


Fig. 15. Esquema del montaje para el ensayo de retención de agua (A) día 1 a 4 y (B) 5 a 11

Desde el día 5 se hizo necesario retirar la tierra contenida en el frasco superior Fig. 15 (B), ya que este era un suelo limoso que formaba una capa de barro reteniendo el agua que se aplicaba por rociado.

Para estimar el volumen de agua a adicionar se tomó como referencia la precipitación promedio del mes octubre, uno de los meses con mayor precipitación en el año en Apartadó. De acuerdo a la Fig. 14, en octubre se tiene una precipitación de 300 mm y un total de 21 días de precipitación, lo que equivale a 14,29 mm/día.

En meteorología, la precipitación pluvial se mide en mm, y 1 mm de lluvia equivale a 1 L/m² (Auguste, 2018). Para estimar el volumen equivalente de agua que caería en la tierra contenida en el frasco, se calculó el área de este y sabiendo que el diámetro de cada frasco es de 4,3 cm, se realizaron los siguientes cálculos:

$$A = \pi r^2 = \pi \times \left(\frac{4,3\text{cm}}{2}\right)^2 = 14,52 \text{ cm}^2$$

$$14,29 \frac{L}{m^2} \times \frac{1 m^2}{10000 cm^2} \times \frac{1000 ml}{1 L} = 1,429 \frac{ml}{cm^2}$$

$$1,429 \frac{ml}{cm^2} \times 14,52 cm^2 = 20,7 ml$$

Entonces, el volumen de agua a emplear diariamente para el riego se aproximó a 20,5 ml. En consecuencia, al finalizar el ensayo cada hidrogel recibiría aproximadamente 226 ml de agua destilada, estimados al considerar 11 días de riego.

2. Caracterización de los hidrogeles cargados con nanopartículas

Como se explicó anteriormente, se fabricaron 16 hidrogeles, de los cuales, la mitad tenían nanopartículas de cobre al 1% y los restantes contenían nanopartículas de cobre al 0,1% . El ensayo consistió en realizar un riego permitiendo que los hidrogeles absorbieran y liberaran agua para evaluar la capacidad de retención (hinchamiento). Cada día, durante 11 días, se registró el peso de cada hidrogel antes de realizar el riego, para determinar el porcentaje de hinchamiento por medio de la Ec. 1, donde W_h corresponde al peso húmedo del hidrogel y W_s al peso seco; y la degradación (pérdida de peso) se midió después de secar los hidrogeles a 28°C hasta obtener un peso constante, con la Ec. 2, donde W_f es el peso del hidrogel seco después del proceso de secado, W_i es el peso inicial del hidrogel, y, W_F es el valor obtenido.

$$\% \text{ de hinchamiento} = \frac{W_h - W_s}{W_s} \times 100$$

Ec. 1. Cálculo del porcentaje de hinchamiento del hidrogel

$$W_F = \frac{W_f \times 100}{W_i}$$

Ec. 2. Cálculo de pérdida de peso

A. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto al proceso de extracción de fibroína, generalmente, la concentración de la fibroína al terminar el procedimiento estuvo por debajo de la concentración requerida (2,1 % p/v), por lo que fue necesario aumentar la concentración dejándola en horno a 60°C hasta alcanzar el volumen deseado.

En la Fig. 16 se presenta el montaje real implementado para llevar a cabo el ensayo de retención de agua en los hidrogeles. |

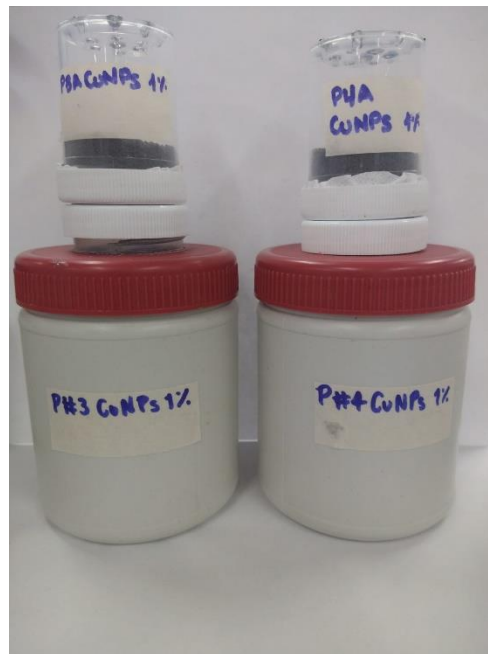


Fig. 16. Montaje real implementado para el ensayo de retención de agua

Los hidrogeles con concentración de nanopartículas al 1% fueron denominados tipo A y aquellos con concentración de nanopartículas al 0,1% tipo B, además se han enumerado de 1 a 8 las muestras para poder distinguirlos.

La Fig. 17 ilustra el comportamiento en la liberación y retención de agua en los hidrogeles con nanopartículas de cobre al 1%. El día en el que hubo el máximo hinchamiento está indicado con un círculo rojo, y se observa que, para la mayoría de las 8 pruebas, el máximo hinchamiento se alcanzó en el día 10.

Como se puede observar en la TABLA IV, el hidrogel 1 fue el que alcanzó el mayor porcentaje de hinchamiento (19,71 %), y el hidrogel 5 fue el de menor hinchamiento (5,30 %).

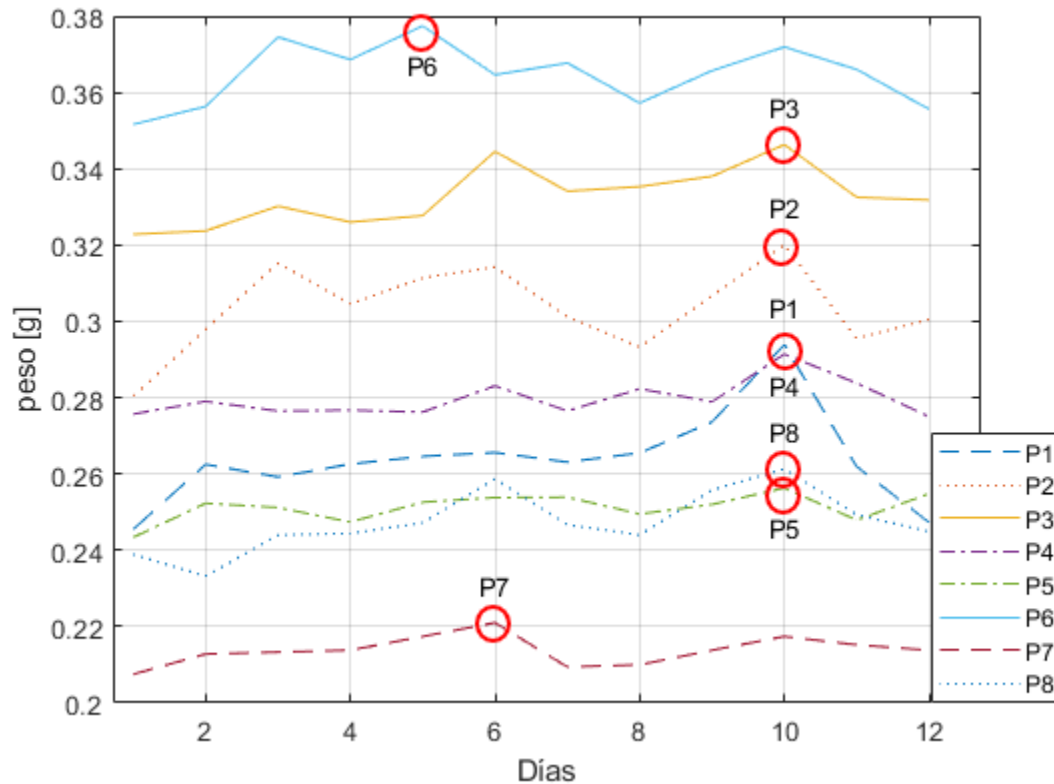


Fig. 17. Variaciones en el peso de los hidrogeles tipo A (con nanopartículas al 1)

TABLA IV
VALORES DE MÁXIMO HINCHAMIENTO PARA HIDROGELES TIPO A

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Hinchamiento %	19,71	14,16	7,28	5,69	5,30	7,34	6,51	9,38

También en los montajes de los hidrogeles con nanopartículas al 0,1% se tuvieron algunos problemas en la filtración del agua. En la Fig. 18 se puede observar que 5 de los hidrogeles adquirieron el mayor hinchamiento en el día 10, dos en el día 6 y uno en el día 5. Además, como se evidencia en la TABLA V los porcentajes de hinchamiento son mayores a los de los hidrogeles conteniendo 1% de nanopartículas de cobre, siendo 26,65% el mayor valor y 8,16% el menor. Lo que quiere decir que, aunque hubo problemas de filtración, probablemente estos

podieron estar en contacto con el agua por mucho más tiempo y por eso retuvieron mayor cantidad

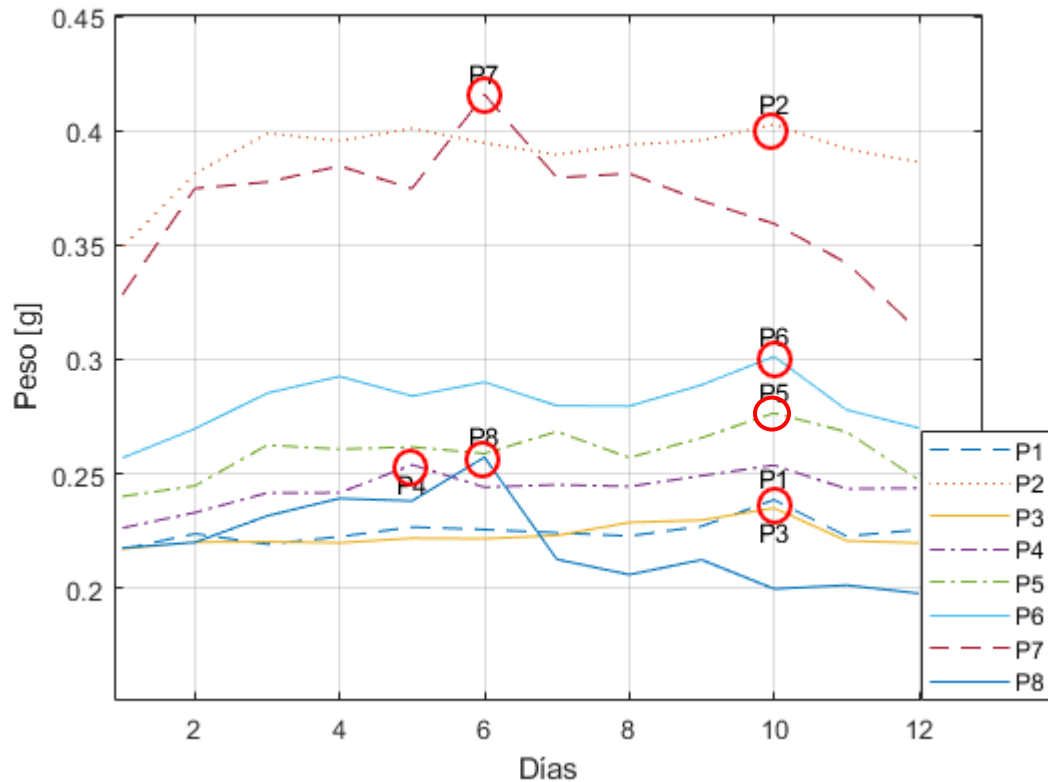


Fig. 18. Variaciones en el peso de los hidrogeles tipo B (con nanopartículas al 0,1%)

TABLA V
VALORES DE MÁXIMO HINCHAMIENTO PARA HIDROGELES TIPO B

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Hinchamiento %	9,95	15,35	8,19	12,19	15,15	17,24	26,65	18,19

Las diferencias en el hinchamiento tanto para las 8 pruebas con hidrogeles conteniendo 1% de nanopartículas, como en las 8 pruebas conteniendo 0,01% de nanopartículas, se podría atribuir a los problemas presentados a partir del quinto día de riego; como se indicó antes, la tierra del compartimento superior se tornó en una capa de barro reteniendo el agua y no permitiendo la filtración hacia los hidrogeles. De tal manera que, el agua entró en contacto con los hidrogeles más rápido que en los días anteriores cuando la muestra de tierra estaba en la parte superior, esto sucedió con la mayoría de los montajes. Como resultado, aquellos montajes que tenían problemas con

filtraciones, estuvieron en contacto por menor tiempo con el agua, esto puede ser una explicación a los bajos porcentajes de hinchamiento de los hidrogeles.

Los porcentajes de máximo hinchamiento obtenidos (19,71 % para pruebas con 1% de nanopartículas y 26,65 % para pruebas con 0,01% de nanopartículas) son congruentes con los resultados reportados por Kim & Park (Kim & Park, 2016), quienes estudiaron el comportamiento de hidrogeles de fibroína fabricados con dos técnicas diferentes: sol-gel e irradiación de rayos gamma. Acorde a sus resultados el porcentaje máximo de hinchamiento de los hidrogeles en agua destilada fue de 40%, pero reportan también valores encontraban inferiores al 20%, un valor cercano al obtenido en el presente trabajo. Lo anterior, permite inferir que la composición y entrecruzamiento del hidrogel está dificultando la absorción de agua, por lo que podría ser conveniente variar la composición inicial agregando o incrementando la proporción de un polímero hidrófilo como la gelatina, que favorezca la interacción del hidrogel con las soluciones acuosas.

En las Fig. 19 y Fig. 20 se puede observar que, una vez realizado el proceso de secado de los hidrogeles, algunos de ellos están visiblemente deteriorados y perdieron material; además, se encogieron y se volvieron frágiles.

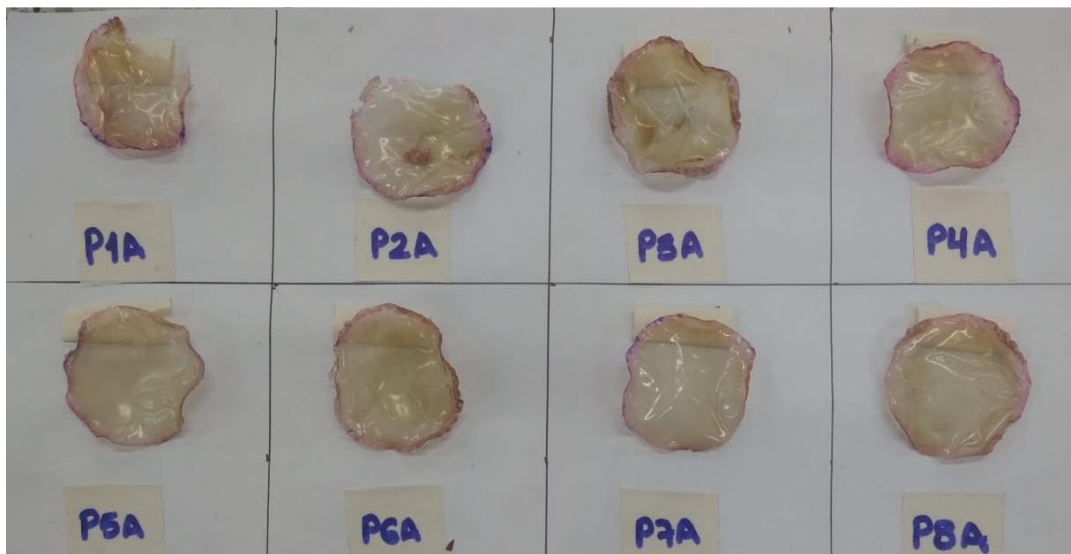


Fig. 19. Hidrogeles secos tipo A

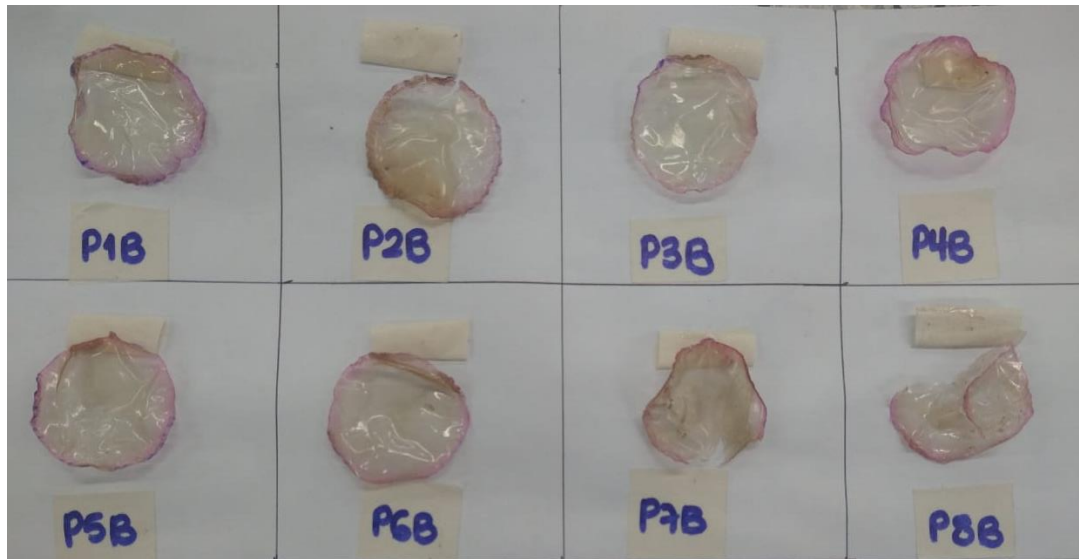


Fig. 20. Hidrogeles secos tipo B

Con el último peso registrado se calculó el porcentaje de pérdida de peso en cada hidrogel, los datos están consignados en la TABLA VI y TABLA VI. En promedio la pérdida de peso de los hidrogeles tipo A después del ensayo fue de $53,06 \pm 2,39\%$.

TABLA VI
PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO DE LOS HIDROGELES TIPO A

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Pérdida de peso %	49,74	51,12	51,43	51,43	54,48	54,72	55,52	56,05

En promedio la pérdida de peso de los hidrogeles tipo A después del ensayo fue de $53,06 \pm 2,39\%$.

TABLA VII
PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO DE LOS HIDROGELES TIPO B

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Pérdida de peso %	55,87	55,34	55,68	57,60	55,70	55,56	47,00	47,45

En cuanto los hidrogeles tipo B el promedio de pérdida de peso fue de $53,78 \pm 4,10\%$.

De acuerdo a los resultados anteriores se puede inferir que la concentración de las nanopartículas utilizada en la fabricación de los hidrogeles no tiene efecto directo en la capacidad de retención y en la pérdida de peso, el comportamiento de estos es independiente. Los compuestos utilizados en

la fabricación podrían tener mayor impacto en estos dos parámetros, las moléculas hidrófilas promueven la interacción del hidrogel en soluciones acuosas permitiendo que se retenga mayor cantidad de agua. Además, no es posible asegurar que los capullos de gusano de seda utilizados pertenezcan al mismo lote, por lo que la fibroína extraída puede tener diferencias en su composición que afectan el comportamiento de los hidrogeles.

E. CONCLUSIONES

1. La concentración de nanopartículas utilizada en la fabricación de los hidrogeles no demostró tener impacto en el hinchamiento y la pérdida de peso de estos. Los hidrogeles tipo A en promedio retuvieron menos agua que los hidrogeles tipo B; este comportamiento se repitió en la prueba de pérdida de peso, en la que los hidrogeles tipo A perdieron menor peso que de los tipo B.
2. El montaje para la evaluación del hinchamiento y la pérdida de peso tuvo diversas limitaciones que pudieron haber afectado los resultados, ya que las filtraciones impidieron que el hidrogel estuviera en contacto con el volumen total de agua por mayor tiempo .

F. REFERENCIAS

- [1] Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121. <https://doi.org/gcv62x>
- [2] Auguste, G. (2018). How Do We Measure Rainfall? *Frontiers for Young Minds*, 6. <https://doi.org/10.3389/FRYM.2018.00038>
- [3] *Clima Apartadó: Temperatura, Climograma y Tabla climática para Apartadó - Climate-Data.org*. (s/f). Recuperado el 26 de enero de 2022, de <https://bit.ly/3KJC9Ah>
- [4] Echeverri Correa, E., Grajales Lopera, D. O., Gutiérrez Restrepo, S., & Orozco Ossa, C. P. (2020). Effective sericin-fibroin separation from *Bombyx mori* silkworms fibers and low-cost salt removal from fibroin solution. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 94, 97–101. <https://doi.org/10.17533/udea.redin.20190731>
- [5] Fang, J. Y., Chen, J. P., Leu, Y. L., & Wang, H. Y. (2006). Characterization and evaluation of silk protein hydrogels for drug delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(2), 156–162. <https://doi.org/b4x7ns>
- [6] Gaviria Arias, D., & Caballero Mendez, L. C. (2015). Uso de biomateriales a partir de la fibroína de la seda de gusano de seda (*Bombyx mori* L.) Para procesos de medicina regenerativa basada en ingeniería de tejidos. *Revista Médica de Risaralda*, 21(1), 38–47. <https://bit.ly/330d4jx>
- [7] Ha, S. W., Tonelli, A. E., & Hudson, S. M. (2005). Structural studies of *Bombyx mori* silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning. *Biomacromolecules*, 6(3), 1722–1731. <https://doi.org/c9sb4k>
- [8] Keene, E. C., Evans, J. S., & Estroff, L. A. (2010). Silk fibroin hydrogels coupled with the n16N- β -chitin complex: An in vitro organic matrix for controlling calcium carbonate mineralization. *Crystal Growth and Design*, 10(12), 5169–5175. <https://doi.org/cndbkd>
- [9] Kim, M. H., & Park, W. H. (2016). Chemically cross-linked silk fibroin hydrogel with enhanced elastic properties, Biodegradability, and biocompatibility. *International Journal of Nanomedicine*, 11(June), 2967–2978. <https://doi.org/10.2147/IJN.S106467>
- [10] Koh, L. D., Cheng, Y., Teng, C. P., Khin, Y. W., Loh, X. J., Tee, S. Y., Low, M., Ye, E., Yu, H. D., Zhang, Y. W., & Han, M. Y. (2015). Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. En *Progress in Polymer Science* (Vol. 46, pp. 86–110). Elsevier Ltd.

- <https://doi.org/f7gc42>
- [11] Kundu, J., Dewan, M., Ghoshal, S., & Kundu, S. C. (2008). Mulberry non-engineered silk gland protein vis-à-vis silk cocoon protein engineered by silkworms as biomaterial matrices. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(7), 2679–2689. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3398-1>
- [12] Kundu, J., Poole-Warren, L. A., Martens, P., & Kundu, S. C. (2012). Silk fibroin/poly(vinyl alcohol) photocrosslinked hydrogels for delivery of macromolecular drugs. *Acta Biomaterialia*, 8(5), 1720–1729. <https://doi.org/fzj2w6>
- [13] Li, M., Tao, W., Lu, S., & Zhao, C. (2008). Porous 3-D scaffolds from regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin. *Polymers for Advanced Technologies*, 19(3), 207–212. <https://doi.org/bd9hn5>
- [14] Lu, Q., Huang, Y., Li, M., Zuo, B., Lu, S., Wang, J., Zhu, H., & Kaplan, D. L. (2011). Silk fibroin electrogelation mechanisms. *Acta Biomaterialia*, 7(6), 2394–2400. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.02.032>.
- [15] Meng, Z., Zheng, X., Tang, K., Liu, J., & Qin, S. (2012). Dissolution of natural polymers in ionic liquids: A review. *E-Polymers*. <https://doi.org/10.1515/EPOLY.2012.12.1.317>
- [16] Min, B. M., Lee, G., Kim, S. H., Nam, Y. S., Lee, T. S., & Park, W. H. (2004). Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 25(7–8), 1289–1297. <https://doi.org/c2c6x4>
- [17] Mitra, A., & De, G. (2016). Sol-Gel Synthesis of Metal Nanoparticle Incorporated Oxide Films on Glass. *Glass Nanocomposites: Synthesis, Properties and Applications*, 145–163. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39309-6.00006-7>
- [18] Mohan, Y. M., Premkumar, T., Lee, K., & Geckeler, K. E. (2006). Fabrication of silver nanoparticles in hydrogel networks. *Macromolecular Rapid Communications*, 27(16), 1346–1354. <https://doi.org/10/c5t7g6>
- [19] Nguyen, T. P., Nguyen, Q. V., Nguyen, V. H., Le, T. H., Huynh, V. Q. N., Vo, D. V. N., Trinh, Q. T., Kim, S. Y., & Van Le, Q. (2019). Silk fibroin-based biomaterials for biomedical applications: A review. En *Polymers* (Vol. 11, Número 12). MDPI AG. <https://doi.org/gmnoxks>
- [20] Ribeiro, M., De Moraes, M. A., Beppu, M. M., Garcia, M. P., Fernandes, M. H., Monteiro, F.

- J., & Ferraz, M. P. (2015). Development of silk fibroin/nanohydroxyapatite composite hydrogels for bone tissue engineering. *European Polymer Journal*, 67, 66–77. <https://doi.org/f7jv7g>
- [21] Ríos, Á. D., López, C. Á., Javier, L., Riaño, C., & Osorio, A. R. (2017). Revisión : fibroína de seda y sus potenciales aplicaciones en empaques biodegradables para alimentos Review : silk fibroin and their potential applications on biodegradable food packaging. *Prospectiva*, 15(1). <https://doi.org/hb8k>
- [22] Rodríguez-Delgado, M. G. (2010). *Estudio de la incorporación y dispersión de nanopartículas de plata en recubrimientos poliméricos a base de hidrogeles y su efecto en las propiedades antimicrobianas* [Centro de Investigación en Química Aplicada]. <https://bit.ly/31F4gyW>
- [23] Soto, D., & Oliva, H. (2012). Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: Una revisión. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 32(2), 154–175. <https://bit.ly/3tbMbDQ>
- [24] Suzuki, D., Horigome, K., Kureha, T., Matsui, S., & Watanabe, T. (2017). Polymeric hydrogel microspheres: Design, synthesis, characterization, assembly and applications. En *Polymer Journal* (Vol. 49, Número 10, pp. 695–702). Nature Publishing Group. <https://doi.org/gb4scv>
- [25] Thoniyot, P., Jin Tan, M., Abdul Karim, A., James Young, D., Jun Loh, X., Thoniyot, P., Tan, M. J., Karim, A. A., Young, D. J., & Loh, X. J. (2015). Nanoparticle–Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising, Multi-Functional Materials. *Advanced Science*, 2(1–2). <https://doi.org/f3j3mf>
- [26] Varghese, S. A., Rangappa, S. M., Siengchin, S., & Parameswaranpillai, J. (2020). Natural polymers and the hydrogels prepared from them. En Y. Chen (Ed.), *Hydrogels Based on Natural Polymers* (Elsevier, pp. 17–47). Elsevier. <https://doi.org/gjbv7>
- [27] Wang, X., Kluge, J. A., Leisk, G. G., & Kaplan, D. L. (2008). Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation. *Biomaterials*, 29(8), 1054–1064. <https://doi.org/dhcphb>
- [28] Wang, Y., Rudym, D. D., Walsh, A., Abrahamsen, L., Kim, H. J., Kim, H. S., Kirker-Head, C., & Kaplan, D. L. (2008). In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials*, 29(24–25), 3415–3428. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.05.002>
- [29] Yucel, T., Cebe, P., & Kaplan, D. L. (2009). Vortex-induced injectable silk fibroin hydrogels.

Biophys J, 97(7), 2044–2050. <https://doi.org/b232ww>

- [30] Zhao, J., Zheng, K., Nan, J., Tang, C., Chen, Y., & Hu, Y. (2017). Synthesis and characterization of lignosulfonate-graft-poly (acrylic acid)/hydroxyethyl cellulose semi-interpenetrating hydrogels. *Reactive and Functional Polymers*, 115, 28–35. <https://doi.org/10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2017.03.019>
- [31] Zheng, H., & Zuo, B. (2021). *Functional silk fibroin hydrogels: preparation, properties and applications*. 9, 1238–1258. <https://doi.org/hb8m>

CAPÍTULO IV

A. MARCO TEÓRICO

1. Nanotecnología en la agricultura

La nanotecnología es un área de la ciencia que se ha dedicado a investigar y desarrollar nuevos materiales nanométricos con características y propiedades únicas que no tienen los materiales en escalas mayores, con el objetivo de ser utilizados en medicina, en la industria alimenticia, en la industria farmacéutica, en desarrollos electrónicos, en el medio ambiente, en la agricultura, entre otros (Lyddy, 2009).

En la agricultura, la nanotecnología se ha enfocado en el desarrollo de herramientas que ayuden a fortalecer el sector agrícola desde distintos puntos. Actualmente, este sector se enfrenta a múltiples desafíos como control de plagas, la absorción de nutrientes en los suelos, mejoramiento genético de plantas, detección temprana de patógenos, manejo de recursos naturales, contaminantes en productos alimenticios, y demás. Aunque el manejo de todas estas problemáticas se ha hecho empleando distintas herramientas, algunas son muy costosas y otras siguen siendo inútiles o poco efectivas (Lira Saldivar et al., 2018).

Las nanopartículas han sido utilizadas para múltiples aplicaciones como fungicidas y bactericidas, tratamientos para semillas, nanopesticidas, herbicidas de detección y para promover el crecimiento de las plantas. Las nanopartículas de plata y cobre son a menudo utilizadas como fungicidas, sin embargo, los procesos de síntesis de nanopartículas de plata suelen ser más costosos que los del cobre. Además, el cobre posee propiedades antimicrobianas que han sido evaluadas en diferentes estudios, frente a hongos comunes en cultivos como el *Fusarium* (Baker et al., 2017).

B. ANTECEDENTES

1. Estudios de aplicación de hidrogeles suplementados con cobre

Las nanopartículas de cobre han demostrado múltiples aplicaciones debido a sus propiedades eléctricas, ópticas, químicas y biológicas, volviéndolas una alternativa a las soluciones convencionales de distintos problemas, sin embargo, tienden a ser inestables, por lo que se oxidan fácilmente en la atmósfera. Como consecuencia, se han implementado diferentes mecanismos para evitar que la oxidación ocurra y mantener las nanopartículas estables hasta que sean utilizadas. Uno de estos mecanismos es incorporar las nanopartículas en un medio que permita su posterior liberación garantizando la estabilidad y conservación de las mismas. Pourbeyram y Mohammadi (Pourbeyram & Mohammadi, 2014) utilizaron hidrogeles como nanoreactores para la síntesis in situ de nanopartículas de cobre; en el proceso se sumergió un hidrogel hinchado en soluciones de 20 ml con diferentes concentraciones de iones cobre, luego, el hidrogel cargado con iones cobre, se removió, lavó e inmergió en una solución de 20 ml de hidracina con diferentes cantidades de NaOH durante 6 h a 60°C para reducir los iones cobre dentro del gel hinchado. Posteriormente, se removió el exceso de hidracina del hidrogel dejándolo inmerso en agua destilada durante 1 hora. Los ensayos de UV-Vis y DRX confirmaron la presencia de nanopartículas de cobre en el hidrogel; además, demostraron ser estables contra la oxidación. Este resultado fue atribuido a la presencia de la red de protección del hidrogel. Por otro lado, los ensayos de DLS y SEM mostraron que las nanopartículas eran casi homogéneas, con un tamaño de partícula promedio de 20 nm. Además, se pudo observar que las nanopartículas estaban distribuidas en la red porosa del hidrogel y estas eran tres veces más estables que las nanopartículas presentes en una solución coloidal. Finalmente, se evaluó la actividad antimicrobiana con cepas de *S. aureus* y *E. coli*. Los resultados demostraron que las nanopartículas de cobre son efectivas para inhibir el crecimiento de las dos cepas, al liberar iones cobre se generan radicales hidroxilos que causan daños permanentes en el material genético, en las proteínas y en la membrana.

En medicina, los apósitos son productos sanitarios que pretenden cubrir y proteger una heridas con el propósito de aliviar el dolor, evitar infecciones y absorber el exudado producido por la misma herida, y así permitir la cicatrización (Benedí & Romero, 2006). Como se mencionó anteriormente,

los hidrogeles han sido ampliamente utilizados para liberación de fármacos, ingeniería de tejidos, sensores y terapia antibacteriana. Sin embargo, los geles por sí solos no tienen efectos antimicrobianos, sino que deben tener incluido un componente que tenga dichas propiedades; las nanopartículas de cobre han demostrado inhibir el crecimiento de hongos y bacterias. Tao et al. (Tao et al., 2019) diseñaron un método con hidrogeles de metacrilato de gelatina combinados con nanopartículas de cobre y N, N-bis (acriloil) cistamina (BACA) para combatir las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y a su vez, promover la cicatrización de las heridas a través de la neovascularización. Las nanopartículas se sintetizaron a partir de sulfato de cobre pentahidratado (sal de cobre), citrato de sodio (agente reductor) y BACA para mejorar la estabilidad de las partículas, dado que así se forman enlaces Cu-S en la superficie de las nanopartículas. El hidrogel mostró efectividad al inhibir el crecimiento de las bacterias y la formación de una película bacteriana. El tamaño de las nanopartículas era aproximadamente de 110 nm y un ensayo de DRX confirmó la presencia de cobre metálico, demostrando que la cistamina evitó la oxidación de cobre.

Al -Enizi et al. (Al-Enizi et al., 2018) buscaban una alternativa a los agentes antimicrobianos comúnmente usados en medicina para combatir las bacterias, específicamente las bacterias que causan las infecciones del tracto urinario, dado que estos agentes suelen ser inestables a altas temperaturas y presiones, y generan irritaciones e intoxicaciones en los pacientes. Anteriormente, habían trabajado con nanopartículas de plata; sin embargo, estas son muy costosas y no sería rentable para las necesidades que ellos buscaban solventar. Por tal razón, fueron reemplazadas por las nanopartículas de cobre, las cuales tienen propiedades antimicrobianas y los procesos de síntesis son más económicos. El hidrogel fue preparado con carboximetilcelulosa (CMC), polivinilacrilato (PVA) y diglicidiléter de etilenglicol (EDGE). La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo añadiendo una solución de nitrato de cobre a la matriz homogénea del hidrogel, y la reacción redox se realizó utilizando hidracina. Mediante TEM pudieron observar que las nanopartículas eran esféricas y tenían un tamaño promedio de 7 nm. El DRX mostró tres picos principales en 43°, 50° y 73°, que según diversos autores (Ramyadevi et al., 2012; Viet et al., 2016) corresponden al cobre. Respecto a la medición de la actividad antibacteriana, se utilizaron los patógenos *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *P. vulgaris* y *P. mirabili* y los resultados fueron comparados con el efecto que tiene una dosis de 30 µg de Kenamicina en las mismas cepas. De acuerdo con los

resultados finales, los iones cobre tienen un efecto superior al de la Kenamicina; además, se demostró que a mayor dosis de nanopartículas mayor era el efecto antibacteriano.

Gómez et al. (González Gómez et al., 2017) evaluaron los efectos de hidrogeles de quitosano-polivinilalcohol con nanopartículas de cobre (Cs-PVA-CuNPs) sobre la morfología de la hoja y el crecimiento de la planta cuando se aplica a plantas injertadas del cultivo de sandía “Jubilee”. También se evaluó la densidad estomática (SD), el índice estomático (SI), la longitud (SL) y el ancho (SW) de la estoma. Los resultados demostraron que el injerto induce modificaciones en la micromorfología de la hoja que afectan favorablemente el crecimiento de la planta, mostrando las plantas injertadas un menor crecimiento vegetativo. Además, se encontró que la aplicación de estos hidrogeles aumentó el ancho de la estoma, la longitud del tallo primario y la longitud de raíz en un 7%, 8% y 14%, respectivamente.

C. METODOLOGÍA

1. Ensayo de liberación

Para medir la cantidad de cobre liberado por cada hidrogel se empleó simultáneamente el mismo montaje experimental descrito en el capítulo 3 para evaluar el hinchamiento de los hidrogeles (Fig. 15), tomando en este caso, antes de realizar nuevamente el riego, una muestra de la tierra ubicada en el frasco inferior de dos de los ocho frascos durante los días: 3, 6, 9 y 11, las cuales se llevaron a espectroscopía de absorción atómica con llama para obtener la concentración de cobre. Después, se tomaron 4 valores, cada uno corresponde al valor promedio de la cantidad de cobre presente en los dos frascos, y se restó el valor del blanco para obtener una curva de liberación.

Para estimar la cantidad de cobre presente en la tierra proveniente de Apartadó (blanco), y teniendo en consideración que parte del cobre contenido en la tierra del compartimiento superior podía ser arrastrado hacia el inferior durante el riego (Fig. 15 (A)), lo cual afectaría la medición de cobre liberada desde el hidrogel, se implementó el montaje presentado en la Fig. 21, en el que no se colocó hidrogel en medio de los dos frascos que contienen las muestras de tierra. En este ensayo,

diariamente se realizó el riego con 20,5 ml de agua durante 5 días, y posteriormente se hizo la cuantificación de cobre a la tierra del frasco inferior; el valor obtenido corresponde a la cantidad de cobre del *blanco 1*, y fue utilizado para estimar la cantidad de cobre en los suelos evaluados el día 3. Adicionalmente, se realizó una cuantificación de cobre en la tierra original proveniente de Apartadó, el valor obtenido corresponde al valor del *blanco 2*, y fue utilizado para medir la cantidad de cobre de los suelos en los días 6, 9 y 11.



Fig. 21. Esquema del montaje para cuantificación de cobre de la tierra proveniente de Apartadó

2. Cuantificación de cobre

Para cuantificar el cobre en cada muestra de suelo se utilizó espectroscopía de absorción atómica con llama. Este es un método analítico que permite determinar las concentraciones de diferentes metales. En esta técnica una muestra líquida es convertida a polvo en un nebulizador y aspirada por la llama donde la muestra es finalmente atomizada (Ott, 2013). Si la muestra es sólida, lo usual es transformarla a estado líquido, aunque se puede analizar de forma sólida no es el enfoque preferido porque hay mayor probabilidad de contaminar la muestra por la cantidad de pasos requeridos, como: muestreo, sub-muestreo, molienda, y disolución (Ramadan Bader, 2011).

La concentración de cobre liberado de los hidrogeles, se estimó a partir de la Ec. 3:

$$C = C_{ts} - C_B$$

Ec. 3. Estimación de la cantidad de cobre en suelo

Donde:

C: cantidad de cobre liberado por el hidrogel, por kg de muestra de tierra.

C_{ts} : cantidad de cobre medido en la muestra de tierra para cada día de riego, por kg de muestra de tierra

C_{B1} : cantidad de cobre medido en la muestra de suelo proveniente de Apartadó (blanco 1) y filtrado, por kg de muestra de tierra. Blanco para la muestra del día 3

C_{B2} : cantidad de cobre medido en la muestra de suelo proveniente de Apartadó (blanco 2), por kg de muestra de tierra. Blanco para las muestras del día 6, 9 y 11.

D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La curva obtenida de liberación de cobre se presenta en la Fig. 22

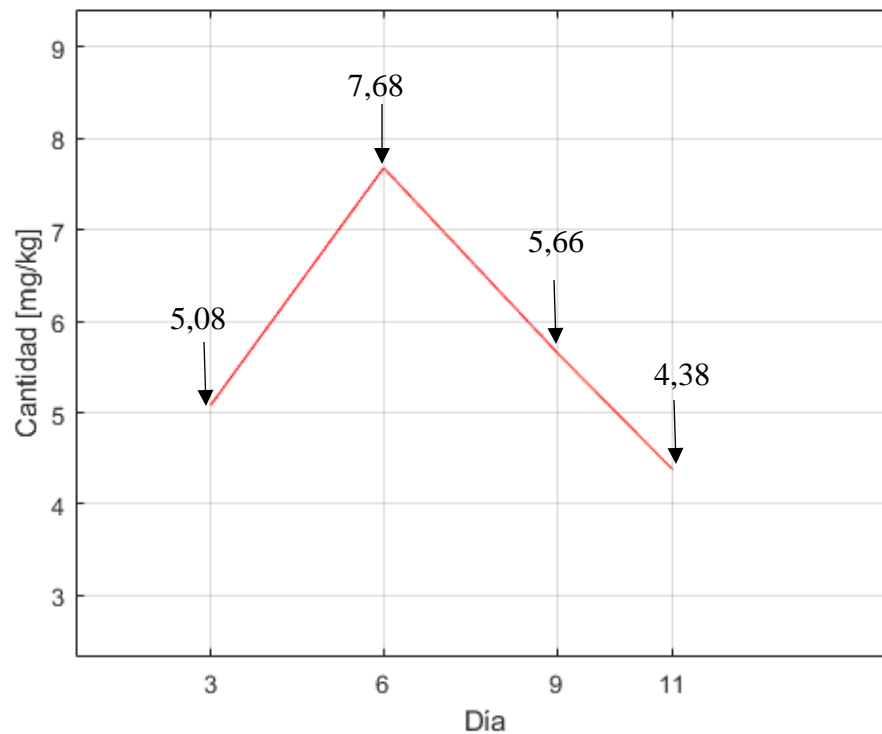


Fig. 22. Curva de liberación de cobre en hidrogel tipo A (concentración de nanopartículas de 1%)

Con la gráfica se puede inferir que la liberación de las nanopartículas se produjo en los primeros días, alcanzando un máximo de 7,68 mg/kg en el día 6. A partir del día 6, la cantidad de cobre presente en la tierra disminuyó paulatinamente, lo cual pudo suceder por diferentes razones: 1. El cobre se degradó, o 2. El cobre presente en la tierra fue arrastrado por el agua del riego sacándolo por los orificios del frasco.

Este comportamiento se puede asemejar a la liberación retardada en los fármacos, ya que la liberación no ocurre inmediatamente, sino, que se libera completamente una vez transcurrido cierto tiempo (Wheless & Phelps, 2018). La liberación retardada puede ser sensible al tiempo o depender del medio ambiente. En este caso, las nanopartículas dependían del hidrogel como transporte y del agua del riego que se hacía cada día para poder liberarse.

El ensayo demuestra que el hidrogel es capaz de almacenar y liberar las nanopartículas, sin embargo, la liberación no es gradual sino retardada. Esto puede indicar que, dependiendo del tratamiento necesario para atacar el hongo *Fusarium*, podría ser conveniente utilizar más de un

hidrogel o mejorar el diseño del mismo, de forma que se pueda tener mayor control en la liberación de las nanopartículas.

En la TABLA VIII se reportan los valores promedio de cobre, por kg de muestra de tierra, obtenidos al evaluar los hidrogeles tipo B (concentración de nanopartículas de 0,1%); sin embargo, estos son inferiores al valor del *blanco 2* (34,98 mg/kg), por lo que no se puede asegurar si hubo o no liberación.

TABLA VIII
CANTIDAD DE COBRE MEDIDA EN ENSAYO DE LIBERACIÓN EN LOS HIDROGELES TIPO B

Día	Cobre mg/kg
3	35,38
6	34,02
9	40,21
11	34,33

Ahora bien, la cantidad de cobre en el hidrogel pudo ser insuficiente como para visualizar un cambio en la cantidad presente en la muestra de tierra; en consecuencia, se podría decir que una concentración tan baja de nanopartículas no es apropiada para realizar un ensayo de liberación, y, es necesario replantear el diseño del montaje y las concentraciones a utilizar en los hidrogeles.

E. CONCLUSIONES

1. Los hidrogeles tipo A (concentración de nanopartículas al 1%) lograron liberar de forma exitosa las nanopartículas de cobre, liberando la cantidad máxima de cobre al sexto día. Lo que sugiere que los hidrogeles podrían ser utilizados como vehículo de las nanopartículas para ser liberadas en un hongo como el *Fusarium*.
2. Los resultados obtenidos para los hidrogeles tipo B (concentración de nanopartículas al 0,1%) no son concluyentes, y sería necesario realizar más ensayos o redefinir el montaje experimental en trabajos futuros para verificar si la concentración de nanopartículas utilizada fue insuficiente para evidenciar un cambio en la cantidad de cobre en el suelo.

3. Como se ha mencionado antes, el diseño del montaje para la evaluación de la liberación de cobre tuvo múltiples dificultades que pudieron haber entorpecido el desarrollo normal del experimento, por lo que, el re-diseño del montaje y sus condiciones pueden ser materia de estudio en trabajos futuros.

F. REFERENCIAS

- [1] Al-Enizi, A. M., Ahamad, T., Al-hajji, A. B., Ahmed, J., Chaudhary, A. A., & Alshehri, S. M. (2018). Cellulose gum and copper nanoparticles based hydrogel as antimicrobial agents against urinary tract infection (UTI) pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 803–809. <https://doi.org/gdbrh4>
- [2] Baker, S., Volova, T., Prudnikova, Svetlana V. Satish, S., & Prasad M.N., N. (2017). *Nanoagroparticles emerging trends and future prospect in modern agriculture system*. 53(53), 10–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.04.012>
- [3] Benedí, J., & Romero, C. (2006). Apósitos. *Farmacia Profesional*, 20(6), 52–56. <https://bit.ly/3zADeoR>
- [4] González Gómez, H., Ramírez Godina, F., Ortega Ortiz, H., Benavides Mendoza, A., Robledo Torres, V., & Cabrera De la Fuente, M. (2017). Use of Chitosan-PVA Hydrogels with Copper Nanoparticles to Improve the Growth of Grafted Watermelon. *Molecules* 2017, Vol. 22, Page 1031, 22(7), 1031. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22071031>
- [5] Lira Saldivar, R. H., Méndez Argüello, B., Santos Villarreal, G. D. los, Vera Reyes, I., Lira Saldivar, R. H., Méndez Argüello, B., Santos Villarreal, G. D. los, & Vera Reyes, I. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta universitaria*, 28(2), 9–24. <https://doi.org/10.15174/AU.2018.1575>
- [6] Lyddy, R. (2009). Nanotechnology. *Information Resources in Toxicology*, 321–328. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373593-5.00036-7>
- [7] Ott, I. (2013). Biodistribution of Metals and Metalloids. *Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition): From Elements to Applications*, 3, 933–949. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097774-4.00337-5>
- [8] Pourbeyram, S., & Mohammadi, S. (2014). Synthesis and characterization of highly stable and water dispersible hydrogel–copper nanocomposite. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 402, 58–63. <https://doi.org/f6g6hc>
- [9] Ramadan Bader, N. (2011). *SAMPLE PREPARATION FOR FAAS SAMPLE PREPARATION FOR FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY: AN OVERVIEW*. 4(1), 49–55. <http://www.rasayanjournal.com>
- [10] Ramyadevi, J., Jeyasubramanian, K., Marikani, A., Rajakumar, G., & Rahuman, A. A. (2012).

- Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters*, 71, 114–116.
<https://doi.org/10/fmsjrj>
- [11] Tao, B., Lin, C., Deng, Y., Yuan, Z., Shen, X., Chen, M., He, Y., Peng, Z., Hu, Y., & Cai, K. (2019). Copper-nanoparticle-embedded hydrogel for killing bacteria and promoting wound healing with photothermal therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(15), 2534–2548.
<https://doi.org/gh5dj4>
- [12] Viet, P. Van, Nguyen, H. T., Cao, T. M., & Hieu, L. Van. (2016). Fusarium Antifungal Activities of Copper Nanoparticles Synthesized by a Chemical Reduction Method. *Journal of Nanomaterials*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1957612> Research
- [13] Wheless, J. W., & Phelps, S. J. (2018). A Clinician's Guide to Oral Extended-Release Drug Delivery Systems in Epilepsy. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics : JPPT*, 23(4), 277. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-23.4.277>