

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

Facultad de Ciencias

**Posgrado en Ciencias Aplicadas**

Nanociencia, Nanotecnología y Energías Alternas

***Evaluación de la viabilidad celular y la actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre***

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias  
Aplicadas

Presenta:

**I.N.E.R. Ana Ketzaly Calvillo Anguiano**

Director de Tesis: Doctor Facundo Ruiz

San Luis Potosí, S.L.P, febrero de 2019



# TESIS DE MAESTRÍA

## NOMBRE DE LA TESIS

Evaluación de la viabilidad celular y la actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre

## NOMBRE DEL ALUMNO

Ana Ketzaly Calvillo Anguiano

## COMITÉ QUE ACEPTA LA TESIS

Asesor

Dr. Facundo Ruiz

\_\_\_\_\_

Sinodal

Dr. J. Elpidio Morales Sánchez

\_\_\_\_\_

Sinodal

Dra. Nereyda Niño Martínez

\_\_\_\_\_

Sinodal

Dra. Martha Eugenia Compeán Jasso

\_\_\_\_\_

## Créditos Institucionales

El presente trabajo de tesis registrado ante CONACyT con número de registro de CVU: 778606 y número de beca: 441466, el cual, se llevó a cabo en los laboratorios de Síntesis química, Caracterización de materiales y Microbiología de la Facultad de Ciencias en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección del Dr. Facundo Ruiz.

Se presenta a consideración para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Aplicadas:

---

Dr. Facundo Ruiz

Director de tesis

---

Dr. J. Elpidio Morales Sánchez

Sinodal

---

Dra. Nereyda Niño Martínez

Sinodal

---

Dra. Martha Eugenia Compeán Jasso

Sinodal

# CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
1.1 JUSTIFICACIÓN .....	10
1.2 HIPÓTESIS .....	10
1.3 OBJETIVOS.....	11
1.3.1 OBJETIVO GENERAL .....	11
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>12</b>
2.1 NANOTECNOLOGÍA .....	12
2.2 MATERIALES NANOESTRUCTURADOS.....	13
2.3 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y SUS MÉTODOS DE SÍNTESIS.....	15
2.4 SÍNTESIS POR REDUCCIÓN QUÍMICA.....	16
2.5 SÍNTESIS POR REDUCCIÓN ELECTROQUÍMICA.....	17
2.6 PROPIEDADES DEL COBRE .....	18
2.7 COBRE EN ESTADÍSTICAS.....	19
2.8 NANOPARTÍCULAS DE COBRE .....	20
2.9 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE: ESTADO DEL ARTE .....	21
2.10 COBRE COMO AGENTE ANTIMICROBIANO .....	24
2.11 CITOTOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE COBRE.....	27
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	<b>30</b>
3.1 MATERIALES .....	30

3.2	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN .....	31
3.2.1	DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ Y POTENCIAL Z.....	31
3.2.2	ESPECTROSCOPIA UV-VIS .....	32
3.2.3	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN .....	32
3.2.4	DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX).....	33
3.3	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE .....	34
3.3.1	SÍNTESIS POR REDUCCIÓN QUÍMICA.....	34
3.3.2	SÍNTESIS POR EL MÉTODO ELECTROQUÍMICO .....	35
3.4	COMPROBACIÓN DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN.....	36
3.5	ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCIÓN DE SALES DE TETRAZOLIO MTT .....	37
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
4.1	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE .....	40
4.2	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE .....	40
4.2.1	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE POR DLS Y POTENCIAL Z.....	40
4.2.2	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.....	42
4.2.3	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN...	42
4.2.4	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX) .....	44
4.3	COMPROBACIÓN DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN.....	47
4.4	ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	48
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS DOCUMENTALES.....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de nanomateriales según sus dimensiones. ....	14
<b>Figura 2.</b> Mecanismos en la síntesis de nanomateriales. ....	15
<b>Figura 3.</b> Esquema que representa la síntesis por reducción química. ....	17
<b>Figura 4.</b> Esquema que representa la síntesis electroquímica. ....	17
<b>Figura 5.</b> Consumo mundial de cobre por sección, 2016. ....	20
<b>Figura 6.</b> Mecanismos de toxicidad de las nanopartículas contra bacterias. ....	26
<b>Figura 7.</b> Equipo Malvern modelo Zetasizer Nano ZS. ....	31
<b>Figura 8.</b> Equipo OceanOptics modelo S2000-UV-vis. ....	32
<b>Figura 9.</b> Microscopio Electrónico de Transmisión. ....	33
<b>Figura 10.</b> Difractómetro de rayos X. ....	33
<b>Figura 11.</b> Esquema de la síntesis por reducción química. ....	34
<b>Figura 12.</b> a) Quelato de Cobre, b) Solución después de agregar NaBH <sub>4</sub> . ....	35
<b>Figura 13.</b> a) Síntesis de CuNPs por método electroquímico, b) Proceso de secado. ....	35
<b>Figura 14.</b> a) Distribución de la placa de 96 pozos para prueba CMI, b) placa de agar con crecimiento bactericida en pruebas CMB. ....	36
<b>Figura 15.</b> Distribución de la placa de 96 pozos en el ensayo MTT. ....	37
<b>Figura 16.</b> Procedimiento para llevar a cabo el ensayo MTT. ....	38
<b>Figura 17.</b> Histograma del diámetro promedio de las CuNPs (reducción química) ....	41
<b>Figura 18.</b> Histograma del diámetro promedio de las CuNPs (electroquímico). ....	41
<b>Figura 19.</b> a) Espectro UV-vis de CuNPs sintetizadas por reducción química y b) espectro de CuNPs sintetizadas por el método electroquímico. ....	42
<b>Figura 20.</b> Imágenes TEM obtenidas para la síntesis por reducción química ....	43
<b>Figura 21.</b> Distribución de tamaño (síntesis por reducción química). ....	43
<b>Figura 22.</b> Imágenes TEM obtenidas para la síntesis por el método electroquímico. ....	44
<b>Figura 23.</b> Distribución de tamaño (síntesis electroquímica). ....	44
<b>Figura 24.</b> Difractograma de las CuNPs obtenidas por reducción química. ....	45
<b>Figura 25.</b> Difractograma de las CuNPs obtenidas por el método electroquímico. ....	46
<b>Figura 26.</b> a) Muestras evaluadas para conocer CMI y b) CMB para la muestra de CuNPs (electroquímico) vs <i>E. faecalis</i> . ....	47
<b>Figura 27.</b> a) Placa mientras se aplicaba SDS, b) Placa incubada 24h después de agregar SDS. ....	48
<b>Figura 28.</b> Análisis de la viabilidad celular para células PBCM (2h incubación). ....	49
<b>Figura 29.</b> Análisis de la viabilidad celular para células PBCM (24h incubación). ....	49
<b>Figura 30.</b> Análisis de la viabilidad celular para células PBCM (48h incubación). ....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades del cobre.....	19
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de síntesis de CuNPs por reducción química reportados .....	22
<b>Tabla 3.</b> Parámetros de síntesis de CuNPs por el método electroquímico reportados. ....	23
<b>Tabla 4.</b> Mecanismos bactericidas reportados para nanopartículas de cobre.....	25
<b>Tabla 5.</b> Resultados del refinamiento de Rietveld para las CuNPs obtenidas por reducción química.....	45
<b>Tabla 6.</b> Resultados del refinamiento de Rietveld para las CuNPs obtenidas por el método electroquímico.....	46
<b>Tabla 7.</b> Resultados Concentración Mínima Inhibitoria y Mínima Bactericida. ....	47

## ABREVIATURAS

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

**CMB:** Concentración Mínima Bactericida

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

**TEM:** Microscopio Electrónico de Transmisión

**DLS:** Dispersión Dinámica de Luz

**DRX:** Difracción de Rayos X

**UV-vis:** Ultravioleta-visible

**Nm:** Nanometro

**ICSG:** Grupo Internacional de Estudio sobre el cobre

**PVP:** Polivinilpirrolidona

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**PVA:** Acetato de Polivinilo

**ROS:** Especies Reactivos de Oxígeno

***CuNPs***: Nanopartículas de Cobre

***PBS***: Buffer Salino de Fosfatos

***PBCM***: Células Mononucleares Periféricas Humanas

***FBS***: Suero Bovino Fetal



## AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el doctor Facundo Ruiz, por la confianza y el apoyo en la realización de este proyecto, y por el gran número de puertas que pude abrir gracias a él.

A mis sinodales, la doctora Nereyda Niño Martínez, el doctor Elpidio Morales y la doctora Martha Compeán Jasso por la gran disposición que siempre tuvieron a pesar de lo apresurado de mis requerimientos.

Al Cuerpo Académico de Materiales de la Facultad de Ciencias de la U.A.S.L.P., por toda la ayuda, día a día, en cada medición y experimento. En especial un agradecimiento para el doctor Jesús María Guajardo por enseñarme sus métodos y siempre tener una respuesta a mis preguntas.

De igual forma doy gracias a la doctora Idania De Alba y a la maestra Mayela Loredó porque la ayuda, tiempo y esfuerzo que me brindaron, fueron cruciales en la realización de mis experimentos. Agradezco además la amistad que me regalaron y las risas que nunca faltaron a su lado.

Al doctor Miguel Ángel Vidal de la CIACyT por permitirme realizar mediciones en uno de los equipos a su cargo y por siempre ofrecerme su apoyo. A la doctora Diana Portales del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina de la U.A.S.L.P., porque gracias a su ayuda pude concluir la realización de mis ensayos.

A mis amigos José, Alondra, Dinora, Salvador y Mar por siempre estar al pendiente y por ser un apoyo aún a la distancia. Y también, sin distancia de por medio, hombro a hombro, en mis alegrías y tristezas, agradezco a mi mejor amiga Ale, que se convirtió en un soporte hasta en los días más estresantes.

A mi familia, abuelos, tíos, padrinos, primos y sobrinos, que, aunque aún no saben qué estuve haciendo estos dos años, se enorgullecían y me ofrecían siempre su amor y comprensión.

Y, por último, agradezco al mejor equipo en mi vida. Papá, mamá y Kamy, sin ustedes tal vez hubiera desistido, pero tan grande es nuestro lazo que cuando las fuerzas me faltaron, estaban ahí las suyas para impulsarme. Infinitas gracias.

# CAPÍTULO UNO

## 1. INTRODUCCIÓN

La química de materiales ha prestado un considerable interés en explorar las posibilidades de utilizar nanopartículas de cobre en diversas aplicaciones gracias a las propiedades útiles de este metal, tales como la buena conductividad térmica y eléctrica a un bajo costo en comparación con metales como la plata y el oro. En la actualidad, el cobre se utiliza como agente purificador de agua, fungicida, antibacteriano, antiincrustante y debido a su inminente progreso en áreas como la nanomedicina, se han buscado métodos de síntesis controlados que nos ayuden a obtener un material estable y biocompatible.

Las nanopartículas de cobre han sido sintetizadas por diversos métodos que permiten prepararlas con tamaño y forma controlados. Por ejemplo, el método por descomposición térmica [1], técnicas de microemulsión [2], reducción electroquímica [3], [4] y por reducción química [5], [6]. La reducción química de sales de cobre es el método de síntesis más fácil, simple y comúnmente utilizado para obtener nanopartículas de cobre. Con este método se pueden producir partículas de tamaño nanométrico con un buen control en la morfología y tamaño. En el método de síntesis electroquímica para la producción de nanopartículas de cobre, se hace pasar corriente entre dos electrodos en presencia de un electrolito, usualmente una solución electrolítica de sal de cobre y ácido sulfúrico. Las principales ventajas de esta técnica incluyen prescindir de los sistemas de vacío utilizados en las

técnicas físicas, bajos costos, operación simple y fácil disponibilidad de equipos e instrumentos, y además menos contaminación durante y después del proceso [7].

Uno de los aspectos más desafiantes en la síntesis de nanopartículas de cobre es su alta tendencia a la oxidación porque, a diferencia del oro y la plata, el cobre es extremadamente sensible al aire debido a que las fases de óxido son termodinámicamente más estables [8].

Se efectuó en este proyecto un estudio comparativo de dos métodos diferentes para la síntesis de nanopartículas de cobre: síntesis por reducción química y síntesis electroquímica. Se evaluó la actividad bactericida empleando los parámetros obtenidos al analizar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de las muestras utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos. Dicha prueba se hizo contra cepas *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 y *E. faecalis* ATCC 29212. Con el fin de analizar el posible efecto tóxico de las partículas se empleó una prueba de tamizaje realizando un ensayo de viabilidad celular por reducción de sales de tetrazolio MTT en Células Mononucleares Periféricas Humanas. Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas para conocer sus propiedades a través de técnicas como la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Dispersión Dinámica de Luz (DLS), Potencial Z, Espectroscopia UV-vis y Difracción de rayos X (DRX).

## 1.1 Justificación

En el presente trabajo se busca realizar una comparación entre el método electroquímico y un método vía húmeda de reducción química y encontrar las condiciones de síntesis óptimas para obtener un material estable, en el orden nanométrico y evaluar la relación de la actividad bactericida y el efecto citotóxico de las partículas con el método de síntesis.

## 1.2 Hipótesis

La capacidad antibacteriana y la viabilidad celular (citotoxicidad) que presentan las nanopartículas de cobre, depende del método de síntesis empleado.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo General

Realizar un estudio comparativo de la actividad antimicrobiana y la viabilidad celular que presentan nanopartículas de cobre sintetizadas por diferentes métodos.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

Sintetizar nanopartículas de cobre por un método de reducción química y el método electroquímico.

Caracterizar estructuralmente las nanopartículas de cobre con espectroscopia UV-vis, Dispersión Dinámica de Luz, Potencial Z, Difracción de rayos X y Microscopia Electrónica de Transmisión.

Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida contra *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 y *E. faecalis* ATCC 29212.

Evaluar el posible efecto citotóxico de las partículas mediante un ensayo de viabilidad celular en Células Mononucleares Periféricas Humanas.

# CAPÍTULO DOS

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Nanotecnología

Las referencias iniciales a la nanotecnología fueron presentadas en 1959 por el físico norteamericano Richard Feynmann en una conferencia titulada: *There's Plenty of Room at the Bottom*, en la cual vislumbró la posibilidad de manipular materiales a escala atómica y molecular. Años después, en 1974, por primera vez fue usado el término “nanotecnología” por Norio Taniguchi, un investigador de la Universidad de Tokio, quien señalaba así la capacidad de manejar materiales a nivel nanométrico [9].

En la actualidad, la nanotecnología ha sido un foco de atención debido a las diversas aplicaciones que se han encontrado gracias a las propiedades físico-químicas adquiridas al redimensionar un material al orden de los nanómetros.

Esta ciencia emergente ha sido definida de muchas formas, siendo el enfoque más utilizado, aquel donde el tamaño del material obtenido es el eje central. La Royal Society además de puntualizar que la nanotecnología es el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y el tamaño en la escala nanométrica, establece que

(...) El rango de tamaño de interés es típicamente desde 100 nm hasta el nivel atómico (aproximadamente 0.2nm), porque es en este rango donde los materiales pueden tener propiedades diferentes o mejoradas en comparación con los mismos materiales a gran escala [10].

Si bien, ésta es una ciencia relativamente nueva, muchas disciplinas han estado trabajando en el orden nanométrico desde hace años. Dichas ramas, actualmente trabajan en conjunto para atribuirle un carácter multidisciplinario a la nanociencia.

De manera general, se podría definir nanotecnología como la fabricación de materiales, estructuras, dispositivos y sistemas funcionales a través del control y ensamblado de la materia a la escala del nanómetro (de 0.1 a 100 nanómetros, del átomo hasta por debajo de la célula), así como la aplicación de nuevos conceptos y propiedades (físicas, químicas, biológicas, mecánicas, eléctricas...) que surgen como consecuencia de esa escala tan reducida [11], por lo que la investigación y desarrollo de la nanotecnología, se orienta a la comprensión y creación de materiales mejorados y dispositivos que aprovechen estas nuevas propiedades.

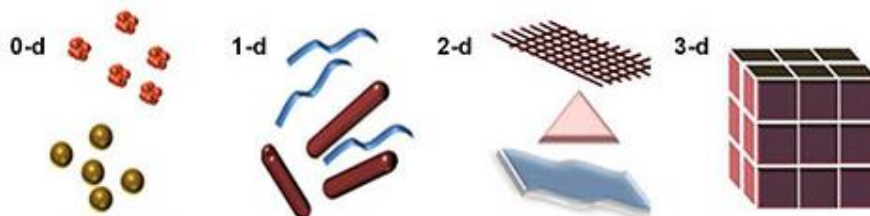
## 2.2 Materiales nanoestructurados

Un factor clave en el desarrollo de materiales nuevos y mejorados, desde los aceros del siglo XIX hasta los materiales avanzados de la actualidad, ha sido la capacidad de controlar su estructura a escalas cada vez más pequeñas.

Las propiedades generales de los materiales están determinadas por su estructura en la nano y microescala. A medida que mejore nuestra comprensión de los materiales a nanoescala y nuestra capacidad para controlar su estructura, habrá un gran potencial para crear una gama de materiales con características, funciones y aplicaciones novedosas.

Aunque tienen una definición amplia, establecemos que los nanomateriales son aquellos que tienen componentes estructurados con al menos una dimensión de menos de 100 nm (figura 1). Los materiales que tienen una dimensión en la nanoescala (y se extienden en las otras dos dimensiones) son capas, como películas delgadas o revestimientos superficiales. Los materiales que son nanoescalares en dos dimensiones (y se extienden en una

dimensión) incluyen nanohilos y nanotubos. Los materiales que son a escala nanométrica en tres dimensiones son partículas, por ejemplo, precipitados, coloides y puntos cuánticos (partículas diminutas de materiales semiconductores), así como materiales nanocristalinos, formados por granos de tamaño nanométrico [10].



**Figura 1.** Clasificación de nanomateriales según el número de dimensiones que se encuentran en el rango nanométrico. Nanopartículas (0-D), Nanoalambres (1-D), Nanopelículas (2-D), Policristales (3-D) [12].

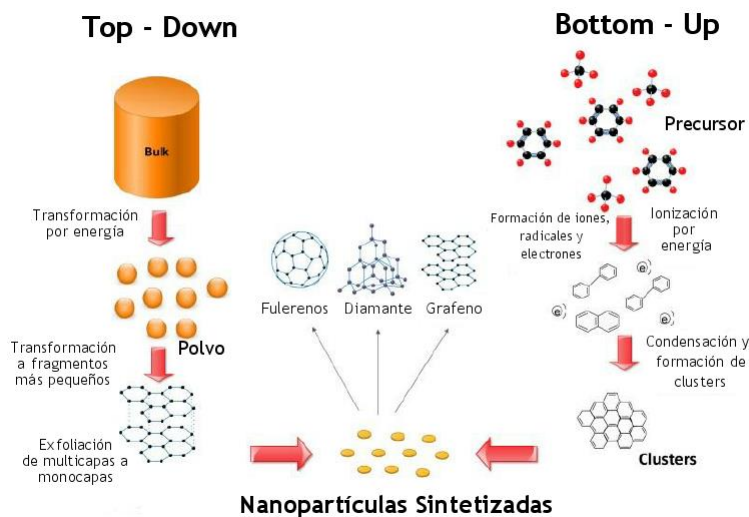
Los nanomateriales son de interés porque a esta escala, emergen propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas, entre otras. Las dos razones principales por las que los materiales en la escala nanométrica pueden tener diferentes propiedades son el aumento del área de superficie relativa (relación superficie/ volumen) que conduce a una mayor reactividad química, y los nuevos efectos cuánticos que pueden llegar a ser muy importantes para determinar las propiedades y características de los materiales [12].

En este sentido, las nanopartículas han sido categorizadas según su morfología, tamaño y propiedades químicas. En función de las características físicas y químicas, algunas de las clases conocidas de nanopartículas son, por ejemplo, las que están basadas en carbono, como los fullerenos y nanotubos de carbono; las nanoestructuras cerámicas que son sólidos inorgánicos no metálicos, sintetizados por calor y enfriamiento sucesivo, y que pueden encontrarse en formas amorfas, policristalinas, densas, porosas o huecas [13]; los materiales semiconductores que poseen propiedades entre metales y no metales, además de que poseen amplios bandgaps, resultan ser muy importantes en fotocatalisis y dispositivos electrónicos [14]; las nanopartículas poliméricas que en su mayoría son nanoesferas o nanocapsulares [15]; las nanopartículas basadas en lípidos que poseen un núcleo sólido hecho de lípidos y una matriz que contiene moléculas lipófilas solubles, suelen usarse con eficacia en muchas aplicaciones biomédicas.

También podemos encontrar en esta clasificación, a las nanopartículas metálicas que son producidas exclusivamente a partir de precursores de metales. Debido a las conocidas características de resonancia de plasmón de superficie localizada, estas poseen propiedades optoelectrónicas únicas. Las nanopartículas de los metales alcalinos y nobles, es decir, cobre (Cu), plata (Ag) y oro (Au), tienen una amplia banda de absorción en la zona visible del espectro electromagnético [16].

### 2.3 Nanopartículas metálicas y sus métodos de síntesis

En los últimos años, ha ido en incremento el interés sobre las nanopartículas metálicas debido a sus posibles aplicaciones en diversos campos, incluidos la catálisis, los medios de grabación magnética o la microelectrónica. Comúnmente los enfoques principales en la síntesis de nanomateriales son: de abajo hacia arriba (bottom-up) o de arriba hacia abajo (top-down), los mecanismos se ejemplifican en la figura 2.



**Figura 2.** Mecanismos en la síntesis de nanomateriales [17].

En el top-down se inicia con una pieza grande de material y a través de grabado o molienda se obtiene de ella una nanoestructura mediante la remoción del material; esto puede hacerse mediante técnicas de alta precisión como las litográficas que se han desarrollado durante los últimos treinta años para producir circuitos en microprocesadores y que se intenta mejorar para conseguir cada vez mayor precisión. Las técnicas top-down ofrecen



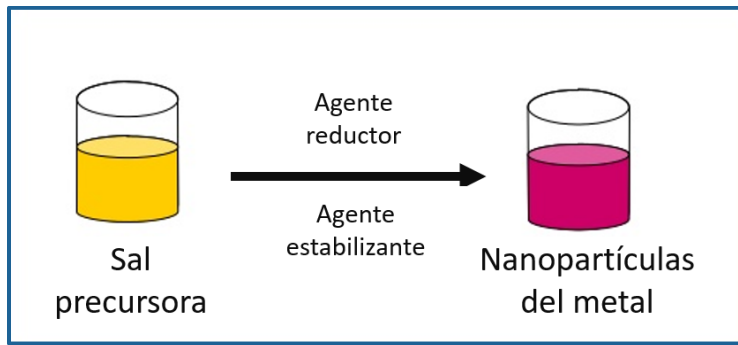
confiabilidad y con ellas se obtienen dispositivos bastante complejos, sin embargo, tienen la desventaja de requerir mucha energía y generar desperdicios, aun así, con ellas se pueden fabricar chips para computadora, láseres, espejos de alta calidad óptica, etc.

Las técnicas bottom-up se refieren a la construcción de estructuras átomo por átomo o molécula por molécula, mismas que, para una mejor revisión podemos separar en tres partes:

- a) *Síntesis química*. Método para producir materias primas como moléculas o partículas, que se puedan utilizar directamente como productos o bien, para fabricar materiales más avanzados o complejos.
- b) *Autoensamble*. Técnica en la que los átomos o moléculas se ordenan a sí mismas dentro de nanoestructuras mediante interacciones físicas y/o químicas entre las unidades básicas
- c) *Ensamble posicional*. Los átomos, moléculas o sus agregados son manipulados deliberadamente y posicionados uno por uno. Este método es extremadamente laborioso y no es conveniente como proceso industrial [9].

## 2.4 Síntesis por reducción química

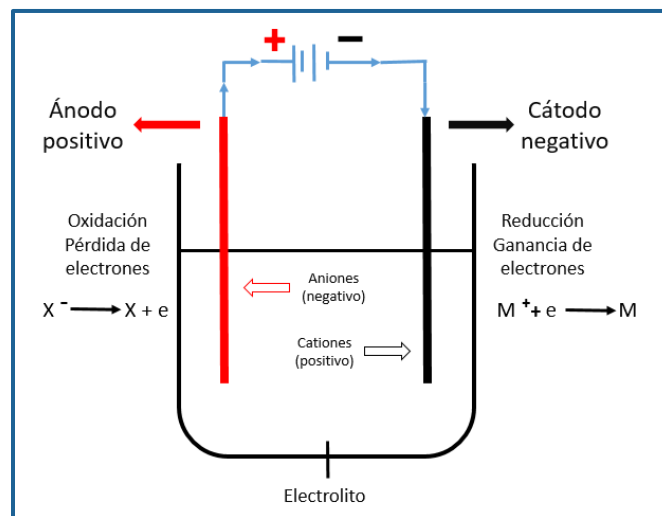
Entre los métodos de síntesis desarrollados para producir nanopartículas, generalmente se prefiere la reducción química porque este método es fácil, rentable y eficiente, y puede mejorar el control en la distribución de tamaño optimizando los factores experimentales, por ejemplo, la relación molar del estabilizador con la sal precursora y la fracción de agente reductor con la sal precursora [6]. La velocidad de crecimiento de las nanopartículas depende además de diversas variables, incluida la concentración de iones metálicos, el tipo de reductor, el pH y la temperatura [18]. El tiempo también es un parámetro clave en la síntesis de nanopartículas. La disponibilidad de una enorme cantidad de núcleos en un momento dado, da como resultado la disminución en el tamaño de las nanopartículas, debido a que los núcleos metálicos más pequeños crecen y usan iones metálicos al mismo tiempo [6].



**Figura 3.** Esquema que representa la síntesis por reducción química.

## 2.5 Síntesis por reducción electroquímica

Reetz y colaboradores son pioneros en la síntesis electroquímica de nanocristales de metal. Su método representa un refinamiento del proceso de electrorrefinado clásico y consta de seis pasos elementales: la disolución oxidativa del ánodo, la migración de iones metálicos al cátodo, la reducción de los iones a un estado de valencia cero, la formación de partículas por nucleación y crecimiento, la detención de crecimiento por agentes estabilizantes y la precipitación de partículas (figura 4).



**Figura 4.** Esquema que representa la síntesis electroquímica [19].

El tamaño de los nanocristales puede ajustarse alterando la densidad de corriente, la distancia entre los electrodos, el tiempo de reacción, la temperatura y la polaridad del disolvente.

Este método ha sido usado en la obtención de nanopartículas de níquel (Ni), cobalto (Co), hierro (Fe), titanio (Ti), plata (Ag), oro (Au) y cobre (Cu). Coloides bimetálicos como hierro/níquel (Fe-Ni), hierro/cobalto (Fe-Co), y paladio/níquel (Pd-Ni) han sido preparados usando dos ánodos de cualquiera de estos metales. Partículas mono y bimetálicas consisten en la reducción de sales de platino (Pt), rodio (Rh), rutenio (Ru) y molibdeno (Mo), disueltas en un electrolito [20].

## 2.6 Propiedades del cobre

El cobre es un metal noble, no se degrada, no contamina y es reciclable indefinidamente. Es denominado comúnmente "metal rojo" por su color rojo intenso y atractivo y su utilización puede ser de forma pura o en aleación con otros metales (las más importantes conocidas desde la antigüedad son el bronce – combinación cobre/estaño - y el latón - combinación cobre/zinc). Entre las principales propiedades del cobre se pueden destacar las siguientes: alta conductividad eléctrica, alto grado de conductividad térmica, excelente metal para procesos de maquinado (fácil de moldear y cortar), gran resistencia a la corrosión, alta capacidad de aleación metálica, muy buena capacidad de deformación en caliente y en frío, mantiene sus propiedades indefinidamente en el reciclaje (detalles en la tabla 1) y tiene propiedades bactericidas [21]. Además, posee una estructura cristalina cúbica centrada en la cara. Es más suave que el zinc y puede pulirse hasta obtener un acabado brillante. Se encuentra en el grupo Ib de la tabla periódica, junto con la plata y el oro. El cobre tiene baja reactividad química. Bajo condiciones de humedad, forma una película de superficie verdosa llamada pátina; este revestimiento protege al metal de un ataque adicional.

**Tabla 1.** Propiedades del cobre [22].

Información		Propiedades Físicas	
<b>Nombre, símbolo, número</b>	Cobre, Cu, 29	<b>Estado</b>	Sólido (diamagnético)
<b>Familia</b>	Metales de Transición	<b>Densidad</b>	8960 kg/m <sup>3</sup>
<b>Grupo, periodo, bloque</b>	11, 4, d	<b>Punto de fusión</b>	1357.77 K (1084.62 °C)
<b>Masa atómica</b>	63.536 u	<b>Punto de ebullición</b>	2835 K (2562 °C)
<b>Configuración electrónica</b>	[Ar] 3d <sup>10</sup> 4s <sup>1</sup>	<b>Entalpía de vaporización</b>	300 kJ/mol
<b>Dureza Mohs</b>	3.0	<b>Entalpía de fusión</b>	13.1 kJ/mol
<b>Electrones por nivel</b>	2, 8, 18, 1	<b>Conductividad eléctrica</b>	58.108 x 10 <sup>6</sup> S/m
		<b>Conductividad térmica</b>	400 W/ (K·m)

## 2.7 Cobre en estadísticas

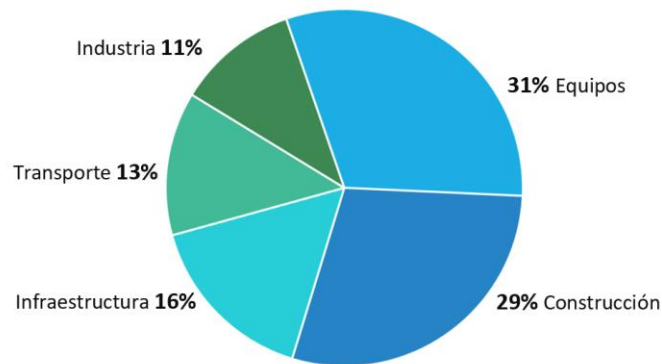
La importancia del sector minero, en particular la minería del cobre, en el desarrollo económico de los países productores ha sido y seguirá siendo de vital importancia para mejorar las condiciones de vida y el bienestar de las personas. A través del tiempo los países exportadores de este metal han demostrado que es posible crecer a partir de la explotación de sus riquezas mineras [21].

En la actualidad el consumo de cobre a nivel mundial, reportado para el mes de febrero de 2018, fue de 1.78 millones de toneladas de acuerdo al boletín presentado en mayo por el Grupo Internacional de Estudio sobre el Cobre (ICSG, por sus siglas en inglés) [23].

Según el informe Anual 2018 de la Cámara Minera de México, nuestro país ocupa el séptimo lugar como productor de cobre a nivel mundial, produciendo el 3.83% de este metal industrial no ferroso [24] y en particular, el estado de San Luis Potosí extrajo 2,213 toneladas de cobre durante el mes de febrero, concediéndole el tercer lugar como entidad federativa productora de cobre en la República Mexicana [25].

Son numerosas las aplicaciones del cobre, siendo su uso en alambres para cables conductores de energía eléctrica e información, y en tuberías, la más común. Está presente también en artefactos, tecnologías, monedas y en la industria automotriz.

La construcción es uno de los sectores que más demanda cobre, dado que está presente en el cableado de edificaciones, tuberías de agua y de gas, sistemas térmicos, terminaciones, y como componente estructural (figura 3).



**Figura 5.** Consumo mundial de cobre por sección, 2016 [23].

## 2.8 Nanopartículas de Cobre

Las nanopartículas metálicas, como las sintetizadas a partir de plata, platino, oro, etc., han sido estudiadas para encontrar posibles aplicaciones en diversas áreas tecnológicas. Dicho estudio, nos ha ido proporcionando las propiedades (entre ellas electrónicas, catalíticas y ópticas) que las convierten en prometedores e innovadores materiales.

En este contexto, nanopartículas de plata y cobre captaron importancia en una gran cantidad de investigaciones que reportaban su síntesis y posibles usos. Pero la plata al ser un metal caro, aumentaba los costos para la síntesis de partículas de este material. Por el contrario, el cobre, al ser más barato en comparación con la plata y al tener un fácil acceso a él, prometía hacer más rentable la síntesis de nanopartículas de cobre [26].

## 2.9 Síntesis de nanopartículas de cobre: estado del arte

Métodos físicos, químicos y biológicos han sido propuestos para la síntesis de nanopartículas de cobre y se sabe que las propiedades del material obtenido, depende mucho del método elegido. Conforme se han ido estudiando estos métodos, apoyados de técnicas de caracterización y después la búsqueda de aplicaciones del nanomaterial, ha surgido un punto de discusión para elegir el método más adecuado al producir nanopartículas de este metal.

Debido a la sensibilidad que presentan las nanopartículas de cobre en medio acuoso, su producción suele ser más complicada en comparación con la síntesis de otros metales. Además, al exponerlas al aire, suelen agregarse debido a la oxidación en su superficie.

El método más empleado para la obtención de nanopartículas de cobre es la reducción química. La técnica consiste, generalmente, en usar como precursor una solución de alguna sal de cobre, un agente reductor y un estabilizante. La sal más empleada suele ser el sulfato de cobre [3], [27]–[29] y el agente reductor, borohidruro de sodio [29]–[31].

La formación de nanopartículas metálicas de tamaño uniforme se logra, en la mayoría de los casos, mediante la combinación de una baja concentración de sal precursora y una monocapa polimérica adherida a las superficies de crecimiento. Estas condiciones dificultan la difusión del crecimiento de los núcleos iniciales. Entre los estabilizantes más utilizados, se encuentra la polivinilpirrolidona (PVP) [3], [29], [30], [32], dodecilsulfato sódico (SDS) [27], [33], [34] y el alcohol de polivinilo (PVA) [35]. La Tabla 2 presenta algunos métodos publicados para sintetizar nanopartículas de cobre por reducción química.

Si bien, los enfoques químicos son los más empleados para la producción de nanopartículas de cobre, en su mayoría, podemos ver reportados métodos que hacen uso de químicos tóxicos. Muchas de las aplicaciones comerciales de las nanopartículas metálicas se encuentran en áreas donde el ser humano tiene contacto directo, debido a esto, existen muchas líneas de investigación que se dedican a buscar y desarrollar métodos de síntesis que sean amigables con el medio ambiente.

La reducción y estabilización con extracto de plantas [36] o empleando microorganismos [37], ha llegado a ser una ruta viable para la obtención de nanopartículas de cobre con propiedades idóneas para algunas aplicaciones.

**Tabla 2.** Parámetros de síntesis de nanopartículas de cobre por reducción química reportados

	<b>Precursor</b>	<b>Reductor</b>	<b>Estabilizante</b>	<b>Tamaño de partícula</b>	<b>Ref.</b>
<b>1</b>	Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	NaBH <sub>4</sub>	PVP	5nm (rods)	[30]
<b>2</b>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	Chitosán	53nm	[28]
<b>3</b>	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Ácido ascórbico	-	12 nm	[38]
<b>4</b>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	NaBH <sub>4</sub>	PVP	30nm	[3]
<b>5</b>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	SDS	50nm	[34]
<b>6</b>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	KBH <sub>4</sub>	PVP	100nm	[39]
<b>7</b>	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Ácido ascórbico	Ácido ascórbico	2nm	[40]
<b>8</b>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	Extracto de <i>Magnolia kobus</i>	Extracto de <i>Magnolia kobus</i>	37-110nm	[36]
<b>9</b>	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	NaBH <sub>4</sub>	PVA	3nm	[35]
<b>10</b>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	NaBH <sub>4</sub>	PVP	6nm	[41]
<b>11</b>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	NaBH <sub>4</sub>	-	50nm	[42]
<b>12</b>	Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	Ácido ascórbico	Ácido ascórbico	5-10nm	[43]
<b>13</b>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	NaBH <sub>4</sub>	Polietilenglicol 6000	14-50nm	[6]
<b>14</b>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	NaBH <sub>4</sub>	Poliacrilato de sodio	18nm (cubos)	[31]
<b>15</b>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	NaBH <sub>4</sub>	-	150nm	[44]

PVP = polivinilpirrolidona; SDS = dodecilsulfato sódico; PVA = alcohol de polivinilo

Se han empleado extractos, cuyos compuestos generaban cambios en las propiedades del ión metálico empleado en el proceso de síntesis. Factores como el color, reactividad o solubilidad varían cuando un ligando reemplaza las moléculas de agua que comúnmente rodean a los iones metálicos en solución.

Han sido reportadas la síntesis de nanomateriales metálicos empleando agentes quelantes. Por ejemplo, la síntesis de nanopartículas de cobre utilizando extracto de soya que, debido a su alto contenido proteico, actuaban como agente quelante para el ion Cu<sup>2+</sup> y le proporcionaba mayor solubilidad en agua. Posteriormente, al efectuarse la reducción, el producto resultante tenía buena estabilidad [45], [46].

Como en cualquier proceso, nos encontramos con limitantes que nos incitan a buscar nuevas rutas para obtener nanopartículas metálicas. Equipos específicos y caros, además de la complejidad existente en algunos métodos, complican la síntesis de nanomateriales.

Al usar métodos de reducción por vía húmeda, nos encontramos con que los reactivos utilizados son tóxicos en algunas ocasiones, y en el caso de los métodos biológicos, su principal desventaja es la dificultad que se tiene para retirar del producto obtenido los posibles residuos o impurezas existentes en los precursores.

Por otro lado, tenemos el método por vía electroquímica, donde una de las principales ventajas es la casi nula contaminación con subproductos que suelen tener presente los agentes empleados en la reducción química. Además de que el nanomaterial obtenido se aísla fácilmente del precipitado y es un método fácil de replicar donde el tamaño de partículas suele ser muy definido. Comúnmente se emplea una solución electrolítica cuyo componente principal es una sal del metal a reducir y algún ácido para promover la circulación de corriente; dos electrodos, en algunas ocasiones de sacrificio y sin emplear sal precursora, y agentes estabilizantes.

En la tabla 3 se presentan algunos métodos publicados para sintetizar nanopartículas de cobre por la vía electroquímica.

**Tabla 3.** Parámetros de síntesis de nanopartículas de cobre por el método electroquímico reportados.

	<b>Solución electrolítica</b>	<b>Voltaje</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Cátodo</b>	<b>Ánodo</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Ref.</b>
<b>1</b>	H <sub>2</sub> O + CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	32cd	2hrs.	Cu (cilindro)	Cu (hoja)	10 – 50nm	[47]
<b>2</b>	H <sub>2</sub> O + CuSO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3V 7A	20 min.	Grafito	Cu	10nm	[3]
<b>3</b>	H <sub>2</sub> O + ACN + THF+ TBAB	6mA/cm <sup>2</sup>	2hrs.	Pt (hoja)	Cu (hoja)	5 – 10nm (CuO)	[48]
<b>4</b>	H <sub>2</sub> O + ACN+ NaOH	50 – 100 V 100mA	2hrs.	Pt	Cu	20nm (CuO)	[49]
<b>5</b>	H <sub>2</sub> O + CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	15V 6A	-	Cu	Cu	24nm	[4]
<b>6</b>	H <sub>2</sub> O(ultrapura) + CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O + sacarosa	4V 5A	30 min.	Cu (placa)	Cu (placa)	60nm	[50]
<b>7</b>	H <sub>2</sub> O + CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O + CuCl <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25A/cm <sup>2</sup>	-	Cu (placa)	Cu (placa)	1.31 μm	[51]
<b>8</b>	NaNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O-EtOH	10mA/cm <sup>2</sup>	Pocas hrs.	Acero Inoxidable	Cu (placa)	d= 20-50nm l= 200-300nm (rods)	[52]

ACN = Acetonitrilo; THF = Tetrahidrofurano; TBAB = Bromuro de tetrabutil amonio



## 2.10 Cobre como agente antimicrobiano

El cobre, cuyo descubrimiento data de alrededor de 5,000 años A.C., ha sido ampliamente utilizado debido a su basta presencia en la naturaleza. En todos los seres vivos, lo encontramos como nutriente para realizar funciones básicas en el metabolismo celular.

Su uso como agente biocida es una de las aplicaciones más estudiadas actualmente. Su potencial para eliminar contaminantes, usándolo a partir de complejos de cobre o de sus iones, era conocido y empleado por numerosas civilizaciones.

Según investigaciones, este metal fue usado por los griegos, egipcios, romanos y aztecas como tratamiento de aguas para consumo y para aumentar la calidad higiénica. Empíricamente, se sabía que su uso mejoraba la condición sanitaria del agua y era utilizado en recipientes para recolectarla.

Sus propiedades antimicrobianas y su posible uso en el tratamiento de algunas enfermedades, comenzaron a investigarse después de descubrir que la causa de algunos padecimientos, eran los virus, bacterias, parásitos, entre otros. Por tanto, se han encontrado un sinnúmero de aplicaciones en diversas áreas de la salud. Se han producido pinturas antibacteriales, productos para la higiene bucal, recubrimientos para aparatos médicos, etc. [53].

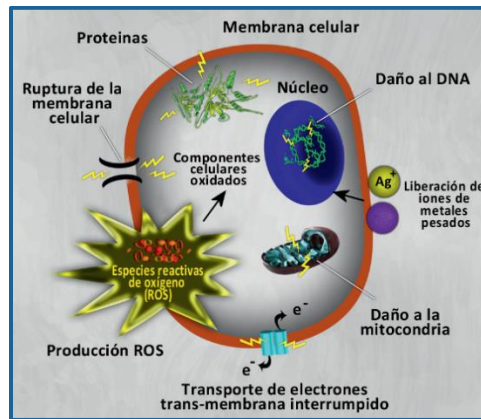
Al sintetizar nanomateriales de cobre se espera que muestren una mejoría en las propiedades bactericidas que presentan en bulto, esto debido a que su relación superficie/volumen incrementa al redimensionarse a la escala nanométrica.

En comparación con lo investigado para las nanopartículas de plata, en la literatura hay menos reportes sobre la actividad antibacterial de nanopartículas de cobre. Sin embargo, las nanopartículas de cobre han resultado buenos agentes antimicrobianos. Si bien, aún no es definido del todo el mecanismo de acción que tienen contra las bacterias, algunos autores mencionan los posibles efectos de las partículas en la célula bacteriana (tabla 4).

**Tabla 4.** Mecanismos bactericidas reportados para nanopartículas de cobre.

	<b>Tipo de material</b>	<b>Método de síntesis empleado</b>	<b>Cepas evaluadas</b>	<b>Mecanismo bactericida sugerido</b>	<b>Ref.</b>
<b>1</b>	Cu 12nm	Condensación de gas inerte	<i>E. coli</i>	Las partículas se adhieren a la pared celular bacteriana y penetran a través de la membrana celular. El citoplasma se degrada y desaparece, lo que lleva a la muerte celular.	[54]
<b>2</b>	Cu 9nm	Reducción química	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i>	Adherencia de las nanopartículas a la pared celular para romperla, lo que lleva a la desnaturalización de proteínas y muerte celular.	[55]
<b>3</b>	CuO 26-30nm	Biosíntesis	<i>E. coli</i> <i>P. fluorescens</i> <i>C. albicans</i>	La inhibición del crecimiento puede deberse al daño que causan a la membrana los iones liberados por las nanopartículas, lo que genera una descomposición en enzimas celulares.	[56]
<b>4</b>	CuO 5-10nm	Biosíntesis	<i>E. coli</i> <i>P. desmolyticom</i> <i>K. aerogenes</i> <i>S. aureus</i>	Los iones liberados por las nanopartículas se unen a la pared celular con carga negativa y la rompen. Estos iones, dentro de las células bacterianas, irrumpen en los procesos bioquímicos.	[57]
<b>5</b>	Cu 2-350nm	Reducción química	<i>MRSA</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. choleraesuis</i> <i>B. subtilis</i> <i>C. albicans</i>	Por la relación superficie/volumen, las nanopartículas interactúan con la membrana celular a través de la superficie y esto conduce a la muerte de la bacteria.	[58]
<b>6</b>	CuO 20-28nm	Combustión en gel	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Mayor sensibilidad a bacterias del tipo gram-positivas por mayor presencia de aminos y grupos carboxilo en la superficie celular y mayor afinidad del cobre a estos grupos.	[59]
<b>7</b>	Cu 50nm	Reducción química	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i>	Los iones de cobre interrumpen procesos bioquímicos y se pueden unir al DNA y provocar desorden en la estructura helicoidal.	[34]

Se cree que las nanopartículas y sus iones pueden producir radicales libres, lo que resulta en la inducción de estrés oxidativo (es decir, especies reactivas de oxígeno; ROS). Las ROS producidas pueden dañar de forma irreversible las bacterias (por ejemplo, su membrana, ADN y mitocondrias), lo que resulta en la muerte bacteriana (figura 6).



**Figura 6.** Mecanismos de toxicidad de las nanopartículas contra bacterias [60].

Raffi et al. sintetizaron nanopartículas de cobre cuyo diámetro rondaba los 12 nm y empleando un método cuantitativo demostraron que eran eficaces contra bacterias del tipo gram-negativas como *Escherichia coli* [54].

Por otro lado, se buscó hacer una comparación entre la inhibición que presentaban las partículas contra bacterias gram-negativas y gram-positivas. Un estudio sobre esto lo presentaron Ruparella et al. contra cepas del tipo *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Empleando nanopartículas de cobre de 9 nm sintetizadas por un método de reducción química en medio acuoso, encontraron que las bacterias del tipo gram-negativas (*E. coli*) eran más sensibles que las gram-positivas (*S. aureus*) [55]. El método para estudiar la capacidad de inhibición de estas nanopartículas fue prácticamente cualitativo, un estudio parecido al presentado por Usman et al. donde después de cargar papel filtro con una solución que contenía nanopartículas de cobre, se evaluó la difusión en milímetros que presentaban estas partículas contra cepas gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella choleraesuis*) y contra cepas gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) reportando al final que las partículas actuaron mejor contra cepas gram-negativas [58].

Otro método presentado para observar la sensibilidad de las cepas contra las partículas, es el método por difusión en pozo, donde se estudia la zona máxima de inhibición después de depositar una solución con concentración conocida de nanopartículas, a pozos presentes en placas que contenían agar e inóculo de la bacteria a estudiar. La actividad antibacteriana

de nanopartículas de óxido de cobre fue estudiada con este método por Naika et al. Ellos observaron, al igual que los autores antes mencionados, que las nanopartículas de cobre, o sus compuestos y derivados, actuaban mejor contra bacterias gram-negativas. En este caso actuó mejor contra las cepas *E. coli* y *K. aerogenes*, que contra la cepa *S. aureus* [57].

Sivaraj et al., empleando de igual forma el método de difusión en pozo, estudiaron la capacidad bactericida de dos cepas del tipo gram-negativo (*E. coli* y *P. vulgaris*) y encontraron mejor respuesta contra la cepa *E. coli* [56].

## 2.11 Citotoxicidad de las nanopartículas de cobre

El estudio sobre el uso de nanopartículas como agente bactericida, surge debido a la aparición de enfermedades infecciosas y el aumento de la resistencia farmacológica de bacterias y hongos [61]. Con ayuda de la nanotecnología se busca desarrollar nuevos agentes antimicrobianos mediante rutas fáciles, rápidas y ecológicas.

Gracias a la alta relación superficie/volumen de las nanopartículas, hay una mejora en su interacción con los microbios para llevar a cabo actividades antimicrobianas. Nanopartículas de plata y cobre han sido estudiadas principalmente por su naturaleza antimicrobiana y esto conlleva a que sean usadas en muchas formulaciones antimicrobianas y productos como textiles sintéticos, dispositivos biomédicos y quirúrgicos, procesamiento y envasado de alimentos, y en purificación de agua [62]–[64].

Las aplicaciones de las nanopartículas metálicas está bien documentada y estudiada, sin embargo, la información sobre el impacto que éstas pueden tener en la salud humana y el medio ambiente, es limitada debido a su naturaleza compleja. Por lo tanto, un problema importante en el uso de estos materiales es la posible toxicidad que pueden presentar.

Si bien, la relación superficie/volumen de las nanopartículas nos proporciona nuevas propiedades fisicoquímicas del material metálico, también influye en la reactividad con ellas mismas o con el entorno celular la disminución del tamaño de partícula, la composición química, la estructura de la superficie y la solubilidad [65].,

Al igual que los demás minerales, el cobre no puede ser fabricado por los organismos vivientes, por tanto, el hombre debe incorporarlo a su cuerpo desde el medio ambiente, principalmente desde los alimentos y el agua [53]. Como es necesario para mantener las funciones que significan estar vivos, se le denomina “esencial” porque forma parte de algunas proteínas. Estas proteínas, también llamadas enzimas dependientes de cobre, son vitales durante el desarrollo embrionario y cerebral; participan activamente estimulando el crecimiento de los niños y los mecanismos inmunológicos de defensa; contribuyen a evitar la anemia y la fragilidad ósea; cooperan mejorando la calidad de los tejidos y de la piel; y están activamente presentes en la síntesis de algunas hormonas y neurotransmisores [66].

Si la ingesta de cobre excede el rango de la tolerancia humana, puede ejercer efectos tóxicos como hemólisis, ictericia y eventualmente la muerte. De manera similar, si la ingesta de nanopartículas de cobre excede en el cuerpo humano por cualquier medio, como la ingestión o la inhalación, causa efectos tóxicos en el tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal y también en otros tejidos [67].

Isani et al. reportan un estudio comparativo de la toxicidad de nanopartículas de CuO y del compuesto CuSO<sub>4</sub>, donde los resultados de las pruebas in vitro de toxicidad indicaron que ambos compuestos de Cu aumentan la tasa de hemólisis en eritrocitos y diferentes tejidos en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de manera dependiente de la dosis, pero el efecto se redujo al tratar las células con nanopartículas de CuO. De igual forma, se induce mayor daño en el ADN en las células tratadas con CuSO<sub>4</sub> [68].

Por otro lado, Chen et al. reportan una comparativa de los efectos que puede tener, variar el tamaño de las partículas. Ellos realizan un estudio empleando partículas de cobre de 17 µm y nanopartículas de cobre de 23.5 nm. Las nanopartículas inducían graves efectos toxicológicos y lesiones graves en los riñones, el hígado y el bazo de ratones experimentales, pero las partículas de micro-cobre no lo hacen en masa [67].

Motivados por el aumento en el uso de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) como catalizadores industriales, Fahmy et al. expusieron células epiteliales de las vías respiratorias (HEp-2) a dosis crecientes de nanopartículas de óxido de cobre, presentando una mayor cantidad de citotoxicidad de una manera dependiente de la dosis en comparación con otros óxidos metálicos (SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), además, sugieren que las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por las nanopartículas de CuO indujeron estrés

oxidativo en las células, lo que puede ser la causa del efecto citotóxico de estas partículas [69].

El efecto tóxico de las nanopartículas depende del tipo de célula con que interacciona. Esto se debe a la variación en la fisiología celular (por ejemplo, epitelial o linfoide), el estado de proliferación (tumoral o células en reposo), las características de la membrana y las características de los fagocitos entre los diferentes tipos de células [70]. Las células cancerosas, por ejemplo, son más resistentes a la toxicidad de las nanopartículas que las células normales debido a que las células con tiempos de duplicación prolongados son más susceptibles a las lesiones inducidas por la exposición que las células tumorales con tiempos de duplicación cortos, además de la diferencia en la actividad metabólica de cada tipo de célula [71]. La diferencia en los efectos tóxicos se observa incluso para las nanopartículas del mismo material. Por lo tanto, la selección del tipo de célula apropiado basado en los métodos de introducción de nanomateriales es un factor importante en los ensayos de citotoxicidad. Para identificar el efecto exacto de las nanopartículas en los órganos o células de interés, el ensayo de citotoxicidad debe incluir células que representen la ruta de exposición y los órganos a los que se dirigen las nanopartículas. En el caso de las aplicaciones biomédicas, las nanopartículas a menudo se introducen en el cuerpo humano a través de la vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraocular [72].

# CAPÍTULO TRES

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1 Materiales

Para realizar la síntesis de nanopartículas de cobre por reducción química, se empleó un extracto de soya texturizada como agente quelante de los iones  $\text{Cu}^{2+}$ . La sal precursora fue sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y como agente reductor se usó borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), ambos obtenidos de Sigma-Aldrich  $\geq 99\%$ . El material obtenido fue lavado con etanol.

Para la síntesis de nanopartículas de cobre por el método electroquímico, se utilizó ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) para crear la solución electrolítica y promover el flujo de corriente eléctrica. Como electrodos se utilizaron una placa de cobre y una barra de grafito. La corriente eléctrica fue suministrada por una fuente. De igual forma se utilizó  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor y para realizar los lavados del material obtenido, se usó acetona.

Para llevar a cabo las pruebas bactericidas se utilizaron las cepas de control *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* 29212, caldo y agar Mueller-Hinton.

El ensayo de viabilidad se realizó en Células Mononucleares Periféricas Humanas previamente separadas haciendo uso del reactivo Ficoll-Hystopaque. Para ajustar la concentración de células necesarias se empleó medio RPMI, antibiótico (estreptomina) y suero bovino fetal (FBS). Durante la prueba se utilizó el kit colorimétrico *Cell Proliferation Kit 1 (MTT)*.

### 3.2 Técnicas de caracterización

Las muestras obtenidas de nanopartículas de cobre fueron caracterizadas para conocer su composición, forma y tamaño empleando la Dispersión Dinámica de Luz, Potencial Z, Espectroscopía UV-Vis, Microscopía Electrónica de Transmisión y Difracción de rayos X.

#### 3.2.1 Dispersión Dinámica de Luz y Potencial Z

Utilizando el equipo de dispersión dinámica de luz marca Malvern modelo Zetasizer Nano ZS (figura7), se realizó el análisis para conocer el diámetro hidrodinámico y la medición de la carga superficial de las nanopartículas obtenidas. Además, se hizo uso de un sonicador para dispersar las muestras y poder leer en el equipo.



**Figura 7.** Equipo Malvern modelo Zetasizer Nano ZS.



### 3.2.2 Espectroscopía UV-Vis

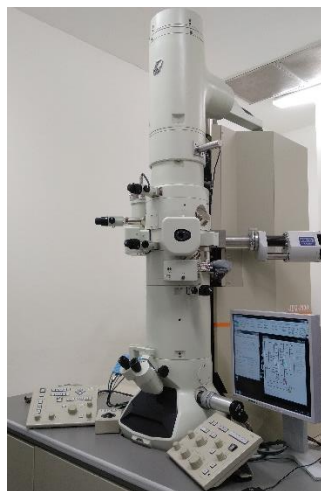
Las nanopartículas de cobre, cuya banda típica de absorción ronda los 580 nm en el espectro de luz, fueron caracterizadas por la espectroscopía UV-Vis con el equipo marca OceanOptics Inc. Modelo S2000-UV-vis (figura 8) para observar la cantidad de radiación electromagnética que puede absorber o transmitir la muestra en función de la cantidad de sustancia presente. Las partículas fueron sonicadas previamente a su medición.



**Figura 8.** Equipo OceanOptics modelo S2000-UV-vis.

### 3.2.3 Microscopia Electrónica de Transmisión

Para observar la morfología de las partículas se empleó un Microscopio electrónico de transmisión marca JEOL, modelo JEM-2100 (figura 9). Posteriormente se hicieron mediciones para obtener la distribución de tamaños obtenidos.



**Figura 9.** Microscopio Electrónico de Transmisión.

#### 3.2.4 Difracción de rayos X (DRX)

Para realizar el análisis de rayos X y conocer la estructura cristalina de las fases existentes en las muestras obtenidas, se utilizó un difractor de rayos X marca Malvern Panalytical modelo Empyrean (figura 10) con cátodo de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$ ).

El equipo mide las muestras en polvo, por lo tanto, después de realizar los lavados con etanol o acetona, y de secar las muestras, se hizo la medición. Posteriormente la identificación de las fases se realizó refinando el difractograma obtenido por el método de Rietveld utilizando el programa Maud.

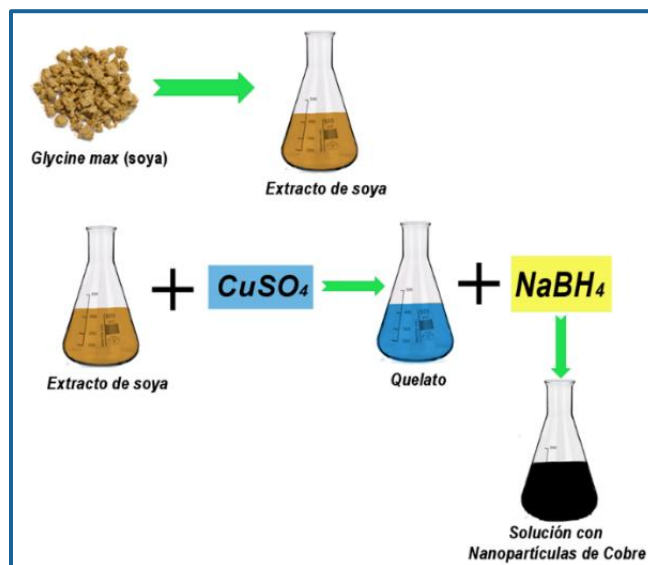


**Figura 10.** Difractor de rayos X.

### 3.3 Síntesis de nanopartículas de cobre

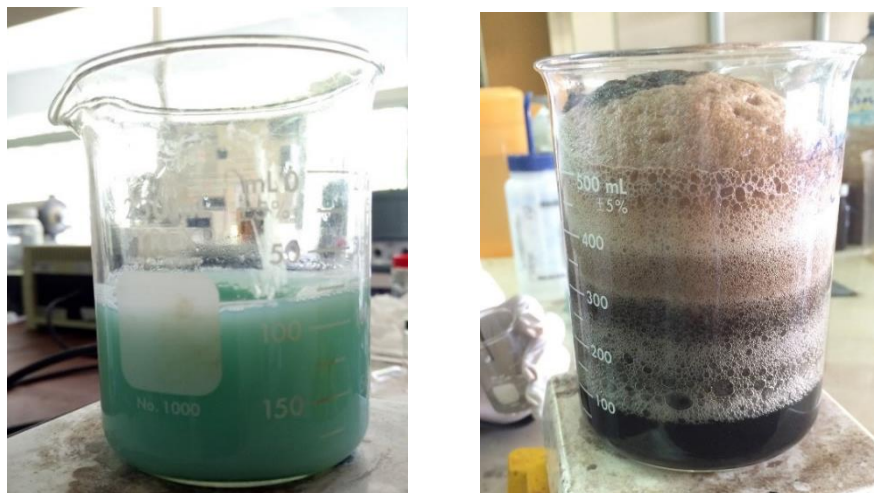
#### 3.3.1 Síntesis por reducción química

Se preparó un extracto de soya empleando 4 gramos de soya texturizada por cada 100 ml de agua desionizada, el cual fue llevado a ebullición durante 10 minutos. Posteriormente se enfrió y filtró para eliminar toda la fibra de soya posible. Después se agregó 1 gramo de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 100 ml de extracto de soya para preparar un quelato de cobre y posteriormente agregar el agente reductor (figura 11).



**Figura 11.** Esquema de la síntesis por reducción química.

Para realizar la síntesis se tomaron 50 ml de quelato (figura 12a), se agregaron 50 ml de agua sin oxígeno y esta solución se puso en agitación constante. Una solución de 0.5 gramos  $\text{NaBH}_4$  en 10 ml de agua desionizada se agregó para realizar la reducción (figura 12b). Por último, se centrifugó la muestra y se realizaron lavados con etanol para impedir la oxidación de las nanopartículas y para facilitar el proceso de secado.



**Figura 12.** a) Quelato de Cobre, b) Solución después de agregar  $\text{NaBH}_4$ .

### 3.3.2 Síntesis por el método electroquímico

Se realizó la síntesis en presencia de corriente eléctrica (30 V), empleando como ánodo una placa de cobre para obtener los iones de cobre y una barra de grafito fue utilizada como cátodo; como electrolito una solución de agua desionizada y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y como agente reductor una solución de 0.1 g de  $\text{NaBH}_4$  en 10 ml de agua desionizada (figura 13a). La reacción se llevó a cabo durante 3 minutos con agitación constante. Al finalizar la síntesis, las nanopartículas de cobre (CuNPs) fueron recuperadas, lavadas con acetona y por último se pusieron a secar a temperatura ambiente (figura 13b).



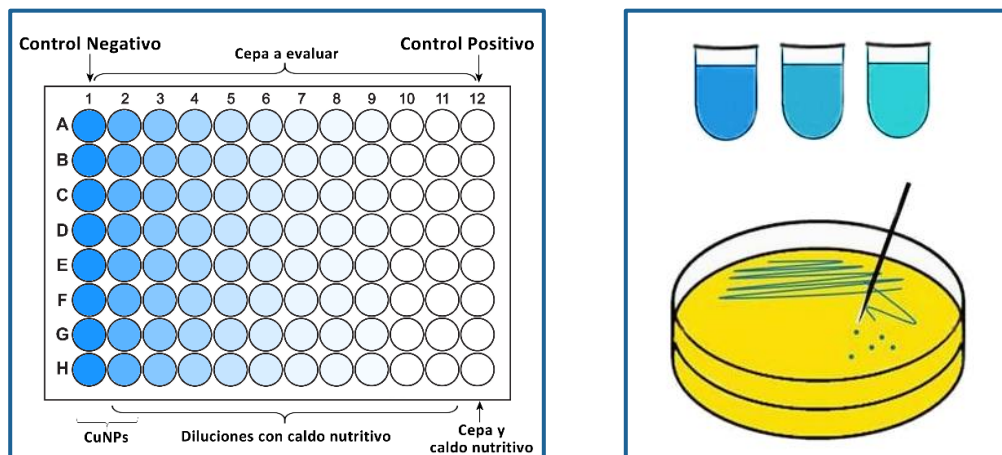
**Figura 13.** a) Síntesis de CuNPs por el método electroquímico, b) Proceso de secado para las CuNPs.

### 3.4 Comprobación de la capacidad bactericida por el método de microdilución

Los parámetros utilizados para evaluar la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas son la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos por ser un método cuantitativo basado en el estándar del CLSI. La prueba se realizó para las bacterias *E.coli*, *S. aureus* y *E. faecalis*.

Para obtener la CMI la prueba consiste en evaluar el crecimiento en la placa a partir de los blancos positivos y negativos. En primer lugar, se coloca la muestra a evaluar (50  $\mu$ l), con concentración inicial conocida ( $2.5 \times 10^3$  ppm) en las primeras dos columnas. Posteriormente se agrega caldo nutritivo Mueller-Hinton (50  $\mu$ l) de la columna dos a la doce en la placa para hacer diluciones de la columna dos a la columna once. Por último, se agrega inóculo con la bacteria correspondiente a toda la placa (50  $\mu$ l). Ésta se llevó a incubar en una cama de humedad por 24 horas a una temperatura de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para obtener la CMB se analizó la placa después de 24 horas de incubación. Se eligen pozos tomando como referencia la última columna en que no se presenta crecimiento de la cepa. Después se tomó muestra de los pozos de las dos últimas columnas en que ya no hay crecimiento y de los pozos de las siguientes dos columnas para sembrar en agar Muller-Hinton y llevar a incubación durante 24 horas a una temperatura de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  (figura 14).



**Figura 14.** a) Distribución de la placa de 96 pozos para prueba CMI, b) placa de agar con crecimiento bactericida en pruebas CMB.

### 3.5 Ensayo de viabilidad celular por reducción de sales de tetrazolio MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La validez del ensayo MTT depende de la suposición de que solo las células viables reducen las sales de tetrazolio a formazán coloreado que se puede cuantificar espectrofotométricamente [73].

Para realizar la prueba se usó una concentración inicial de las muestras de  $2.5 \times 10^3$  ppm y se realizaron disoluciones con medio completo como se observa en la figura 15.

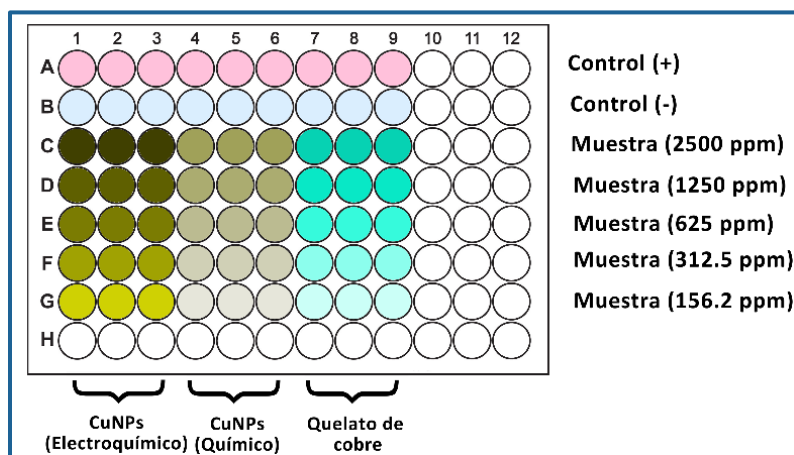
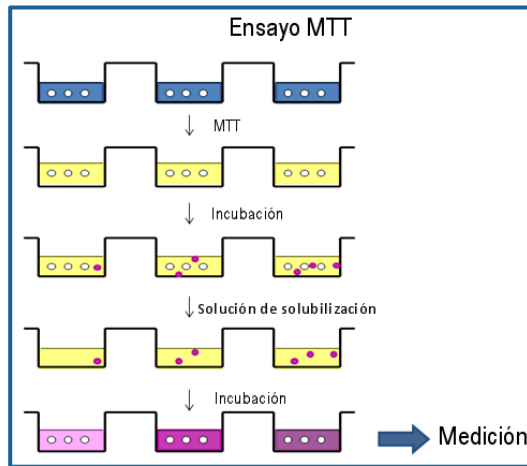


Figura 15. Distribución de la placa de 96 pozos en el ensayo MTT.

El análisis se llevó a cabo en un lector de microplacas de absorbancia iMark™ a una longitud de onda de 570 nm y empleando el kit colorimétrico *Cell Proliferation Kit 1 (MTT)*. El procedimiento es el siguiente:

1. Para el blanco positivo se colocaron 50  $\mu$ l de medio completo y 50  $\mu$ l de células mononucleares periféricas humanas (PBCM) previamente separadas por el método de gradiente de densidad de Ficoll-Histopaque y ajustadas a una concentración de  $4 \times 10^6$  cel/mL (200,000 células/pozo) en medio RPMI completo (1% estreptomycin, 10% FBS). Para el control negativo se colocan 50  $\mu$ l de medio completo, 50  $\mu$ l de células y 50  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

2. Las muestras se evaluaron por triplicado con una concentración inicial de  $2.5 \times 10^3$  ppm ( $50 \mu\text{l}$ ) y se realizaron diluciones empleando  $50 \mu\text{l}$  de medio RPMI completo. Posteriormente se agregaron  $50 \mu\text{l}$  de células a todos los pozos con muestra. Los procedimientos anteriores se realizaron en tres placas de fondo plano, para evaluar a las 2, 24 y 48 horas de incubación respectivamente.
3. Las placas se llevaron a incubación a  $37^\circ\text{C}$  en atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Pasados los tiempos deseados de incubación, se agregaron  $8 \mu\text{l}$  de reactivo MTT a cada uno de los pozos incluyendo controles positivos y negativos y se llevaron a incubar por 2-4 horas.
4. Posteriormente se agregaron cuidadosamente, evitando formación de burbujas,  $50 \mu\text{l}$  de dodecilsulfato sódico-isopropanol (1:1) solución que promueve la disolución del azul de formazán.
5. Por último, se realiza la lectura en el espectrofotómetro y se hacen relaciones de 100% de viabilidad como el control positivo (figura 16).



**Figura 16.** Procedimiento para llevar a cabo el ensayo MTT.

Los resultados se analizaron de acuerdo a la siguiente formula:

$$Viabilidad = \frac{Promedio\ del\ blanco\ positivo - Promedio\ de\ la\ muestra}{Promedio\ del\ blanco\ positivo} \times 100$$

Donde:

Promedio del blanco positivo: absorbancia promedio obtenida del blanco.

Promedio de la muestra: absorbancia promedio obtenida de la interacción de la muestra con las células.



# CAPÍTULO CUATRO

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Síntesis de nanopartículas de cobre

Para hacer un estudio comparativo de los dos métodos de síntesis empleado, es necesario conocer las propiedades del material obtenido. Después de lavar y secar las nanopartículas a temperatura ambiente, se guardaron en viales para después caracterizar las muestras. Visualmente, las partículas de cobre sintetizado por reducción química eran negras, pero en poco tiempo se tornaron color café. En el caso de las partículas sintetizadas por el método electroquímico, la coloración permanecía negra por más tiempo.

### 4.2 Caracterización de nanopartículas de cobre

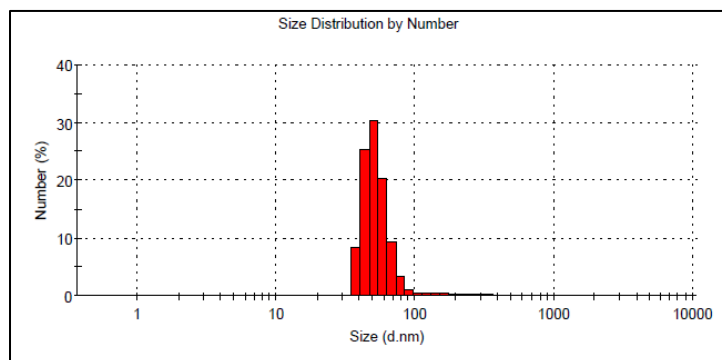
#### 4.2.1 Caracterización de nanopartículas de cobre por Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y Potencial Z

Los histogramas obtenidos para las nanopartículas sintetizadas se muestran en las figuras 17 y 18. En el caso de las nanopartículas obtenidas por el método de reducción química,

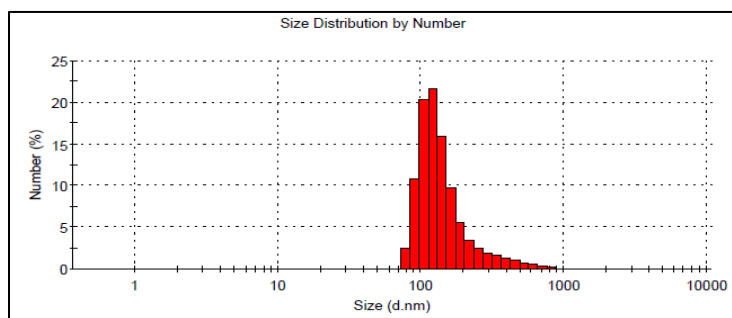
encontramos diámetros de 52nm (97.3%) y 201nm (2.7%), y las partículas obtenidas por el método electroquímico presentan diámetros de 155nm. En ambos casos se observa que el tamaño de partícula es grande para lo que se esperaba, pero el equipo suele medir como una sola partícula a partículas aglomeradas, por lo que no es una medición del todo confiable en el caso de lo obtenido en ambas síntesis.

La medición de potencial Z indicó que las partículas sintetizadas por el método químico eran más estables (-28mV) que las sintetizadas por el método electroquímico (4mV), lo cual coincide con los tamaños obtenidos por DLS, donde las partículas sintetizadas por la reducción química, además de ser más pequeña, presentaban un índice de polidispersión (PDI) más pequeño (0.435) que la otra muestra (0.857) donde probablemente existan aglomerados.

Para corroborar el análisis se debe realizar un análisis TEM para medir correctamente las partículas en caso de haber aglomerados.



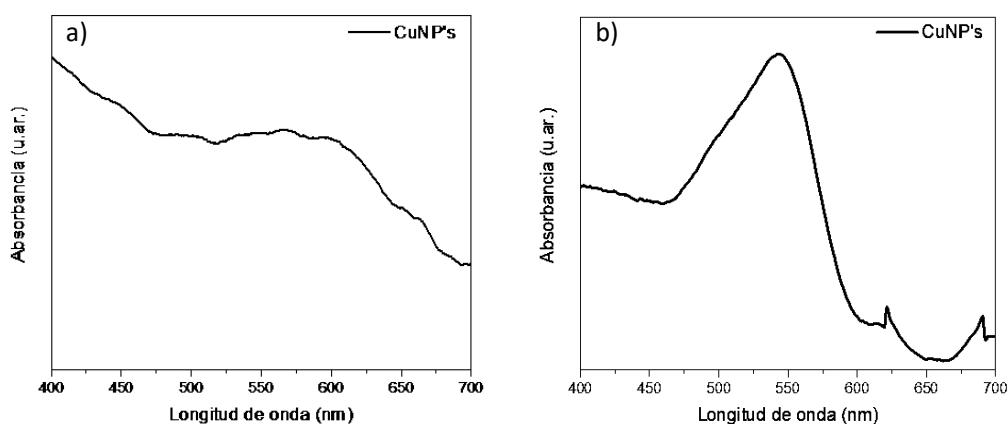
**Figura 17.** Histograma del diámetro promedio de las CuNPs sintetizadas por reducción química.



**Figura 18.** Histograma del diámetro promedio de las CuNPs sintetizadas por el método electroquímico.

#### 4.2.2 Caracterización de nanopartículas de cobre por Espectroscopia UV-vis

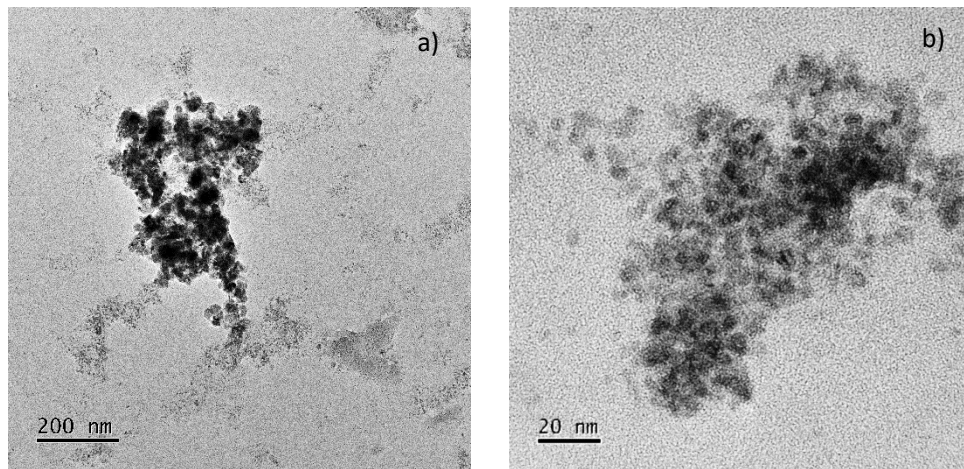
En las figuras 19 (a y b) se presentan los espectros obtenidos para las nanopartículas sintetizadas por los dos métodos reportados. Podemos observar un espectro más definido para la muestra sintetizada por el método electroquímico donde el plasmón se encuentra aproximadamente en 540 nm, mientras que en la muestra sintetizada por reducción química encontramos el plasmón en aproximadamente 566 nm. En la literatura podemos encontrar que el plasmón característico de las CuNPs se encuentra alrededor de los 580 nm [50]. La diferencia en los plasmones puede deberse a la estabilidad y distribución de tamaños en las partículas sintetizadas en ambos métodos.



**Figura 19.** a) Espectro UV-vis de CuNPs sintetizadas por reducción química y b) espectro de CuNPs sintetizadas por el método electroquímico.

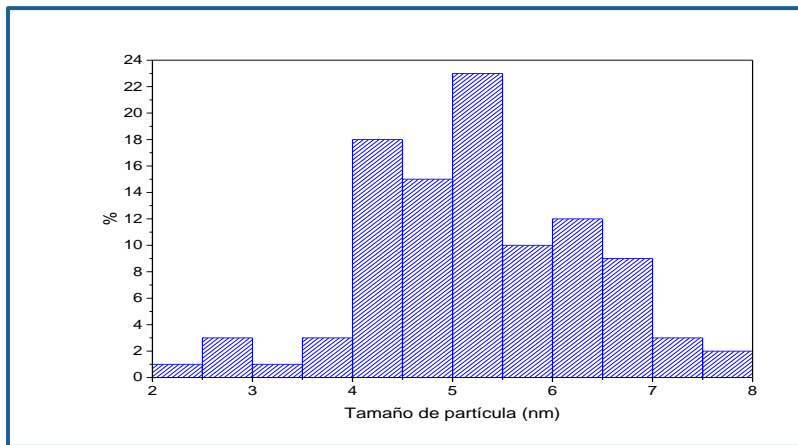
#### 4.2.3 Caracterización de nanopartículas de cobre por Microscopía Electrónica de Transmisión

Para determinar la morfología de las partículas obtenidas se utilizó un microscopio electrónico de transmisión. Los resultados obtenidos para la muestra sintetizada por reducción química se presentan en las figuras 20a-b. Se observan partículas con formas, en su mayoría, semicirculares y tamaños uniformes pero que presentan en algunas partes, aglomerados.



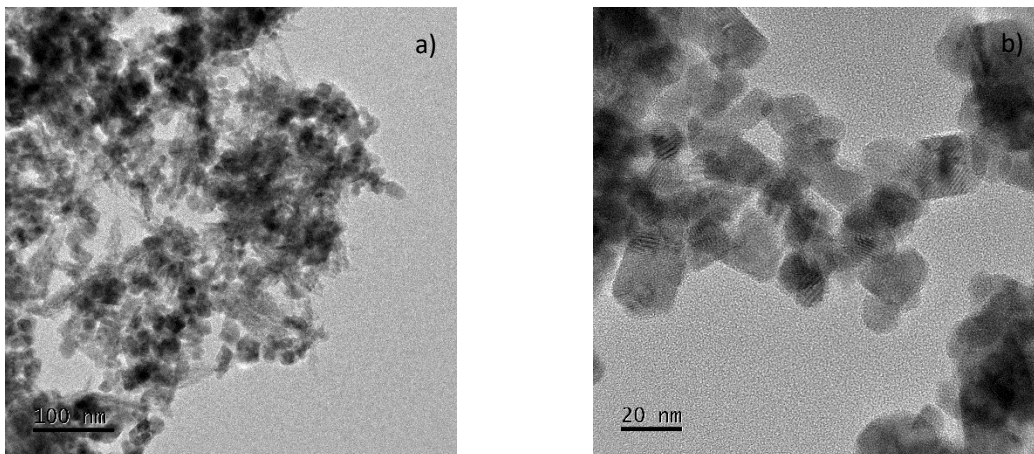
**Figura 20.** (a y b) Imágenes TEM obtenidas para la síntesis por reducción química de CuNPs.

En la figura 21 se observa el histograma de distribución de tamaños de las partículas sintetizadas donde los tamaños van de los 2 a los 8 nm.

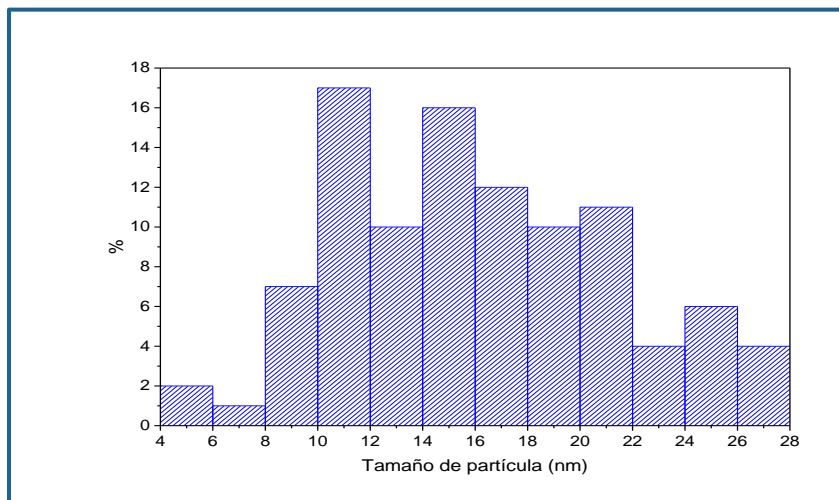


**Figura 21.** Distribución de tamaño de partícula para la síntesis por reducción química de CuNPs.

Las imágenes TEM de la muestra de nanopartículas sintetizadas por el método electroquímico se presenta en las figuras 22a-b. Las partículas se observan mayormente aglomeradas. La distribución de tamaños se presenta en la figura 23, donde en su mayoría, los tamaños de partícula se encuentran entre 10 y 20 nm.



**Figura 22.** (a y b) Imágenes TEM obtenidas para la síntesis por el método electroquímico de CuNPs.

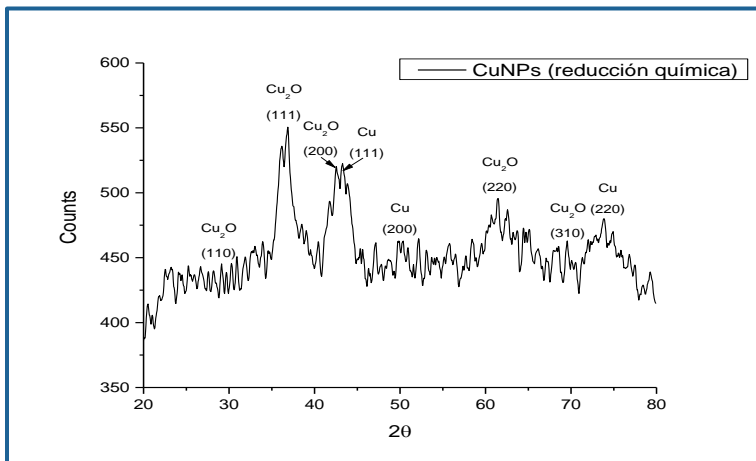


**Figura 23.** Distribución de tamaño de partícula para la síntesis por el método electroquímico de CuNPs.

#### 4.2.4 Caracterización de nanopartículas de cobre por Difracción de Rayos X (DRX)

La figura 24 muestra el difractograma obtenido para las muestras sintetizada por reducción química. Se observan picos de difracción característicos del cobre en  $2\theta = 43.22^\circ$  que corresponden a la familia de planos (111), en  $50.33^\circ$  correspondiente a la familia de planos (200) y en  $73.94^\circ$  para la familia de planos (220), por mencionar los más importantes según la intensidad. Los otros picos con mayor intensidad en  $2\theta = 29.63^\circ$ ,  $36.50^\circ$ ,  $42.40^\circ$ ,  $61.52^\circ$ , y

69.75° corresponden a las familias de planos (110), (111), (200), (220) y (310), respectivamente, de la fase de óxido cuproso.



**Figura 24.** Difractograma de las CuNPs obtenidas por reducción química.

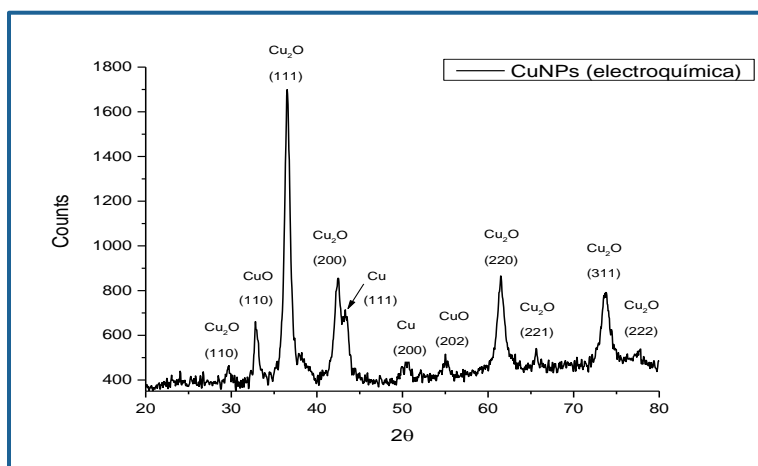
La identificación de las fases se realizó refinando por el método de Rietveld utilizando el programa Maud, los resultados se presentan en la tabla 5. Para este caso las fases existentes fueron la de cobre (41.52% en volumen) y óxido de cobre I (58.48% en volumen).

**Tabla 5.** Resultados del refinamiento de Rietveld para las CuNPs obtenidas por reducción química.

	% en volumen	Parametros de red (Å)	Tamaño de cristalito (nm)	% de error
Cobre	41.52	3.62	119.6	
Óxido de cobre I (Cu <sub>2</sub> O)	58.48	4.25	83.59	5.94

En la figura 25 se presenta el difractograma obtenido para las nanopartículas sintetizadas por el método electroquímico. Los picos observados para el cobre se encontraron en  $2\theta = 43.22^\circ$  y  $50.34^\circ$  para los planos (111) y (200), respectivamente. Para el óxido de cobre I se encontraron los picos más intensos en  $2\theta = 36.37^\circ$ ,  $42.25^\circ$ ,  $61.28^\circ$  y  $73.40^\circ$  para la familia de planos (111), (200), (220) y (311), respectivamente, y para el óxido de cobre II se

encontraron las familias de planos (110) y (202) que corresponden a los picos ubicados en  $2\theta = 32.74^\circ$  y  $54.64^\circ$ .



**Figura 25.** Difractograma de las CuNPs obtenidas por el método electroquímico.

Las fases identificadas fueron la de óxido de cobre I (72.61% en volumen), óxido de cobre II (14.65% en volumen) y cobre (12.74% en volumen), como se observa en la tabla 6 donde están reportados los resultados del refinamiento aplicado al difractograma.

**Tabla 6.** Resultados del refinamiento de Rietveld para las CuNPs obtenidas por el método electroquímico.

	% en volumen	Parámetros de red (Å)	Tamaño de cristalito (nm)	% de error
Óxido de cobre I (Cu <sub>2</sub> O)	72.61	4.27	76.27	4.91
Óxido de cobre II (CuO)	14.65	a= 4.7 b= 3.36 c= 5.49 β= 96.85	99.97	
Cobre	12.74	3.62	99.58	

En ambos casos, el resultado obtenido es muy similar a los parámetros de red reportados en la literatura para análisis DRX a muestras de nanopartículas de Cu, Cu<sub>2</sub>O y CuO [4], [74], [75].

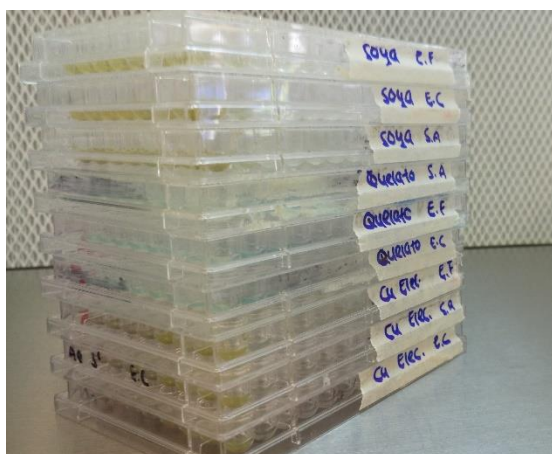
### 4.3 Comprobación de la capacidad bactericida por el método de microdilución

La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida fueron analizadas para las muestras de nanopartículas de cobre sintetizadas por reducción química, por el método electroquímico, y se agregó el quelato de cobre como tercera muestra (figuras 25a). Los resultados se desglosan en la tabla 7. Para las tres muestras evaluadas, se observa un mejor resultado contra la cepa *E. faecalis* (figura 25b) en comparación con la concentración necesaria para actuar como agente bactericida o bacteriostático contra las cepas *E. coli* y *S. aureus*.

La muestra que actuó como mejor agente bactericida fue la de quelato al requerir una concentración para inhibir, menor en un orden de magnitud con respecto a las otras dos muestras de cobre nanométrico.

**Tabla 7.** Resultados Concentración Mínima Inhibitoria y Mínima Bactericida.

	CuNPs (reducción química)		CuNPs (método electroquímico)		Quelato	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Concentración Inicial: $2.5 \times 10^3$ ppm						
<i>E. coli</i>	$2.5 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$	$1.25 \times 10^3$	$1.25 \times 10^3$	$6.25 \times 10^2$	$6.25 \times 10^2$
<i>S. aureus</i>	$2.5 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$	$6.25 \times 10^2$	$6.25 \times 10^2$
<i>E. faecalis</i>	$1.25 \times 10^3$	$1.25 \times 10^3$	$1.25 \times 10^3$	$1.25 \times 10^3$	$3.12 \times 10^2$	$3.12 \times 10^2$



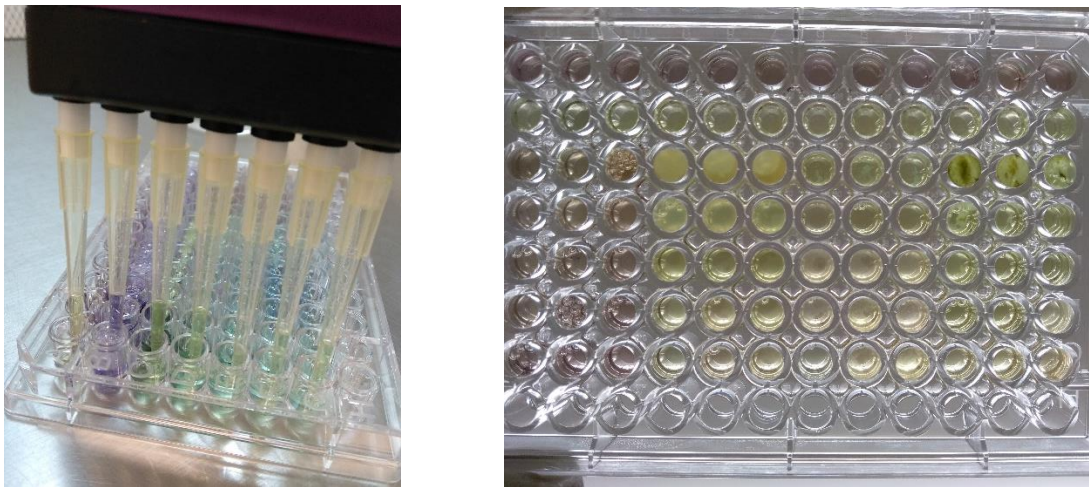
**Figura 26.** a) Muestras evaluadas para conocer CMI y b) CMB para la muestra de CuNPs (electroquímico) vs *E. faecalis*.



#### 4.4 Estudio de la viabilidad celular

El ensayo MTT es uno de los más empleados en estudios de citotoxicidad porque nos ayuda a determinar la actividad mitocondrial de las células y que nos permite comprobar que no existen afectaciones en el metabolismo celular tras la exposición a las nanopartículas [76].

En la figura 27-a se observa la placa que se incubó por un tiempo de 2 horas mientras se agrega docecilsulfato sódico (SDS) para disolver los cristales de formazan. La coloración presentada en la placa nos indica una insuficiencia en el tiempo de incubación después de agregar el reactivo MTT (2 horas), por lo que se determinó que, para las muestras de 24 y 48 horas, las placas se incubarían por más tiempo (3-4 horas). En la figura 27-b se presenta la placa que se incubó por 24 horas. Visualmente se nota que las células no fueron capaces de reducir las sales de tetrazolio a formazan porque no se observa el típico coloreado violeta en los pozos que contenían nanopartículas.

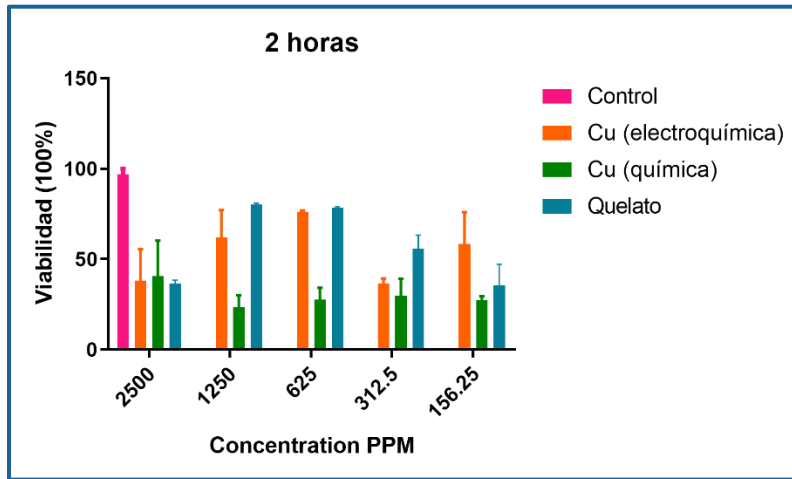


**Figura 27.** a) Placa mientras se aplicaba SDS, b) Placa incubada durante 24 horas después de agregar SDS.

La viabilidad celular representada como porcentaje se observa en la figura 28, 29 y 30 para los tiempos de incubación de 2, 24 y 48 horas respectivamente. Cada punto representa la media de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar de la media. Se considera que un material no es tóxico cuando su viabilidad celular es del 80% o superior a éste valor.

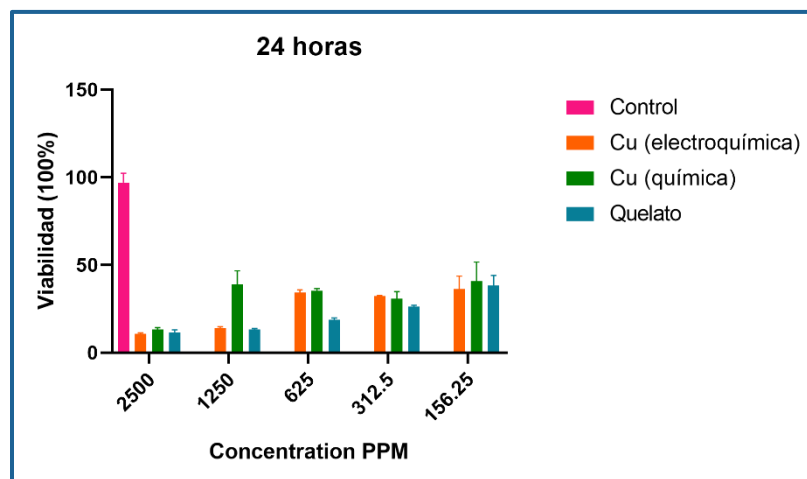
En prácticamente en todas las muestras evaluadas, después de dos horas de incubación, la viabilidad celular fue menor al 80% (exceptuando el quelato de cobre en concentración de

1250ppm). En ninguna muestra se presenta una disminución en la viabilidad celular de un modo dosis-dependiente.



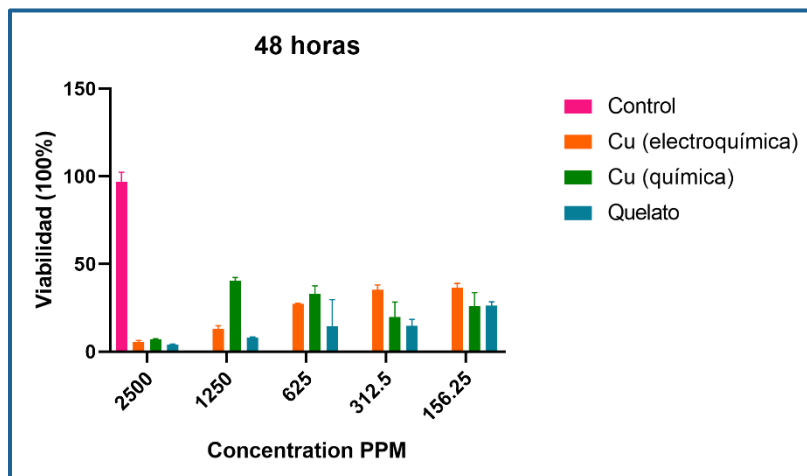
**Figura 28.** Análisis de la viabilidad celular para células PBCM después de dos horas de incubación con las nanopartículas de cobre y quelato de cobre a diferentes concentraciones.

Después de transcurridas las 24 horas de incubación, la lectura concluyó en una disminución considerable del porcentaje de células vivas. Se puede resaltar que el mayor número de células vivas, en todas las concentraciones empleadas, resultan en la muestra de nanopartículas de cobre sintetizadas por reducción química (figura 29).



**Figura 29.** Análisis de la viabilidad celular para células PBCM después de 24 horas de incubación con las nanopartículas de cobre y quelato de cobre a diferentes concentraciones.

Después de 48 horas de incubación, en algunos casos el porcentaje de células vivas estuvo cercano a cero. En todas las concentraciones empleadas para el quelato de cobre, observamos menos proliferación celular en comparación con las otras muestras (figura 30).



**Figura 30.** Análisis de la viabilidad celular para células PBCM después de 48 horas de incubación con las nanopartículas de cobre y quelato de cobre a diferentes concentraciones.

# CAPÍTULO CINCO

## 5. CONCLUSIONES

Los métodos reportados para la síntesis de nanopartículas de cobre, en el presente trabajo, fueron procesos fáciles de reproducir, pero que pueden ser perfeccionados si se tiene un mejor control en las variables que interfieren en ellos. Es necesario plantear una metodología donde el procedimiento se realice en ausencia de oxígeno para obtener cobre más puro y estable, y sin necesidad de emplear surfactantes o agentes estabilizantes que interfieran en posteriores pruebas bactericidas. La síntesis química derivó en partículas con tamaños de diámetro de partícula más pequeños ( $< 10$  nm) y con mejor estabilidad en comparación con las nanopartículas sintetizadas por el método electroquímico.

Con ayuda del análisis por Dispersión Dinámica de Luz se pudo determinar que las partículas sintetizadas por reducción química eran más pequeñas que las sintetizadas por el método electroquímico, sin embargo, en ambos casos, el diámetro se encontraba superior a lo esperado. El análisis arrojó también, que las partículas sintetizadas por la ruta electroquímica eran menos estables debido a que el índice de polidispersión que presentaban era el doble del valor obtenido para las partículas sintetizadas con soya. Esto se comprobó al medir la carga superficial de las muestras, donde el valor para la muestra sintetizada electroquímicamente era positiva cercana a cero, lo que indica una tendencia a

la aglomeración en estas partículas. Al contrario, las partículas sintetizadas por la ruta química, tenían una carga negativa con un valor muy cercano a lo sugerido para partículas estables.

Las medidas del diámetro promedio fueron corroboradas por Microscopía Electrónica de Transmisión y posteriormente se hizo un análisis de la distribución de tamaños que indicó que las partículas eran más pequeñas, en ambos casos, que el resultado obtenido por DLS. Además de corroborar que las partículas obtenidas por reducción química eran más pequeñas y de tamaños uniformes, se pudo observar la morfología, en su mayoría, formas semicirculares, y en el caso de las partículas sintetizadas por la vía electroquímica, había presencia de muchos aglomerados.

Empleando la espectroscopía UV-Vis, se determinó que las partículas obtenidas por ambos métodos eran partículas de cobre en escala nanométrica. Los espectros tienen algunas diferencias como el ancho del plasmón, que en el caso de las nanopartículas sintetizadas por la ruta electroquímica resultaba más definido. En ensanchamiento en el plasmón de las partículas obtenidas por el método químico podría deberse a la rápida aparición de especies de óxido de cobre.

Los difractogramas DRX ayudan a concluir que, si bien tenemos presencia de cobre, un porcentaje de las muestras resultó oxidado. Así mismo, se obtuvieron tamaños de cristalito considerablemente grandes para lo que se esperaba.

Con las pruebas bactericidas se concluye que ambas muestras actúan mejor contra la cepa *E. faecalis*, no obstante, se obtuvieron mejores resultados evaluando el quelato de cobre contra las tres cepas, *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis*.

Con el ensayo de viabilidad celular, se puede concluir que las muestras evaluadas son tóxicas al no presentar en ningún tiempo de incubación, ni en ninguna de las concentraciones evaluadas, un porcentaje de viabilidad igual o superior al 80%, aunque a pesar de esto, los porcentajes que prevalecieron fueron los presentados para la muestra de CuNPs sintetizadas con soya, que, en los tres tiempos de incubación, su viabilidad rondó el 30%.

## 6. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- [1] L. A. Betancourt-Galindo, R., Reyes, P. Y., Puente, B. A., Avila, C. A., Rodríguez, O. S., Cadenas, G., Lira, R. H., y García, "Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties," *J. Nanomater.*, vol. 2014, pp. 1–6, 2013.
- [2] J. N. Solanki, R. Sengupta, and Z. V. P. Murthy, "Synthesis of copper sulphide and copper nanoparticles with microemulsion method," *Solid State Sci.*, vol. 12, no. 9, pp. 1560–1566, 2010.
- [3] H. Hashemipour, M. E. Zadeh, and R. Pourakbari, "Investigation on synthesis and size control of copper nanoparticle via electrochemical and chemical reduction method," *Int. J. Phys. Sci. Vol.*, vol. 6, no. 18, pp. 4331–4336, 2011.
- [4] T. Theivasanthi and M. Alagar, "Nano sized copper particles by electrolytic synthesis and characterizations," *Int. J. Phys. Sci.*, vol. 6, no. 15, pp. 3662–3671, 2011.
- [5] J. Ramyadevi, K. Jeyasubramanian, A. Marikani, G. Rajakumar, and A. A. Rahuman, "Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles," *Mater. Lett.*, vol. 71, pp. 114–116, 2012.
- [6] T. M. D. Dang, T. T. T. Le, E. Fribourg-Blanc, and M. C. Dang, "Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method," *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 1, 2011.
- [7] A. UMER, S. NAVEED, N. RAMZAN, and M. S. RAFIQUE, "Selection of a Suitable Method for the Synthesis of Copper Nanoparticles," *Nano*, vol. 07, no. 05, p. 1230005, 2012.
- [8] S. Jeong *et al.*, "Controlling the thickness of the surface oxide layer on Cu nanoparticles for the fabrication of conductive structures by ink-jet printing," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 18, no. 5, pp. 679–686, 2008.
- [9] G. M. Uribe and J. L. R. López, "La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso," *Rev. Perfiles Latinoam.*, vol. 14, no. 29, pp. 161–186, 2007.
- [10] a Dowling *et al.*, "Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties," *London R. Soc. R. Acad. Eng. Rep.*, vol. 46, no. July, pp. 618–618, 2004.
- [11] G. Nelson and C. Kantuta, "NANOTECNOLOGIA CONCEPTOS GENERALES," pp. 7–9.
- [12] P. Fichetti, "Ferrite Nanoparticles," pp. 27–47, 2009.
- [13] W. Sigmund *et al.*, "Processing and structure relationships in electrospinning of

- ceramic fiber systems," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 89, no. 2, pp. 395–407, 2006.
- [14] S. Sun, C. B. Murray, D. Weller, L. Folks, and A. Moser, "Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices," vol. 287, no. March, pp. 2–6, 2000.
- [15] M. Mansha, I. Khan, N. Ullah, and A. Qurashi, "ScienceDirect Synthesis , characterization and hydrogen evolution reaction of carbazole-containing conjugated polymers," *Int. J. Hydrogen Energy*, pp. 1–10, 2017.
- [16] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arab. J. Chem.*, 2017.
- [17] K. Habiba, V. I. Makarov, B. R. Weiner, and G. Morell, "Fabrication of Nanomaterials by Pulsed Laser Synthesis," *Manuf. Nanostructures*, pp. 263–292, 2014.
- [18] K. N. Han and N. S. Kim, "Challenges and opportunities in direct write technology using nano-metal particles," *KONA Powder Part. J.*, vol. 27, no. 27, pp. 73–83, 2009.
- [19] S. Rajendran, R. J. Rathish, S. S. Prabha, and A. Anandan, "Green Electrochemistry - A Versatile Tool in Green Synthesis: an Overview," *Port. Electrochim. Acta*, vol. 34, no. 5, pp. 321–342, 2016.
- [20] C. Acuña, G. Andrés, R. Cuellar, and J. Constanza, "Nanocristales para degradación de un colorante contaminante Nanocrystals for the degradation of a pollutant dye Nanocristsais para a degradação de um corante poluente," 2016.
- [21] M. J. D. Mu, "El mercado del cobre a nivel mundial : evolución , riesgos , características y potencialidades futuras The copper market worldwide : trends , risks , characteristics and potential future growth," vol. 21, pp. 248–261, 2013.
- [22] A. J. Garcia-tornel, "Análisis ambiental de la producción de cobre" (Tesina de Máster) Escola Tècnica Superior d'Enginyers de Camins, Canals i Ports, Barcelona, España. Vol. 1, 2015.
- [23] International Copper Study Group. (2018). Informe Mensual, mayo 2018. Recuperado de [www.icsg.org/](http://www.icsg.org/)
- [24] Cámara Minera de Mexico. (2018). Informe Anual 2018: Participación de México en la producción Minera Mundial en 2017. Recuperado de <https://camimex.org.mx>
- [25] Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). Estadística de la Industria Minerometalúrgica: Cifras durante febrero de 2018. Recuperado de <http://www.inegi.org.mx>
- [26] A. P. Ingle, N. Duran, and M. Rai, "Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 3, pp. 1001–1009, 2014.

- [27] I. Lisiecki, F. Billoudet, and M. P. Pileni, "Control of the shape and the size of copper metallic particles," *J. Phys. Chem.*, vol. 100, no. 10, pp. 4160–4166, 1996.
- [28] M. S. Usman, N. A. Ibrahim, K. Shameli, N. Zainuddin, and W. M. Z. W. Yunus, "Copper nanoparticles mediated by chitosan: Synthesis and characterization via chemical methods," *Molecules*, vol. 17, no. 12, pp. 14928–14936, 2012.
- [29] H. X. Zhang, U. Siegert, R. Liu, and W. Bin Cai, "Facile fabrication of ultrafine copper nanoparticles in organic solvent," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 4, no. 7, pp. 705–708, 2009.
- [30] T. Harada and H. Fujiwara, "Formation of rod shape secondary aggregation of copper nanoparticles in aqueous solution of sodium borohydride with stabilizing polymer," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 61, no. 1, pp. 394–398, 2007.
- [31] R. Prucek *et al.*, "Polyacrylate-assisted synthesis of stable copper nanoparticles and copper(I) oxide nanocubes with high catalytic efficiency," *J. Mater. Chem.*, vol. 19, no. 44, pp. 8463–8469, 2009.
- [32] Y. Lee, J. R. Choi, K. J. Lee, N. E. Stott, and D. Kim, "Large-scale synthesis of copper nanoparticles by chemically controlled reduction for applications of inkjet-printed electronics," *Nanotechnology*, vol. 19, no. 41, 2008.
- [33] N. Begletsova *et al.*, "Chemical synthesis of copper nanoparticles in aqueous solutions in the presence of anionic surfactant sodium dodecyl sulfate," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 552, no. May, pp. 75–80, 2018.
- [34] T. Kruk, K. Szczepanowicz, J. Stefańska, R. P. Socha, and P. Warszyński, "Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 128, pp. 17–22, 2015.
- [35] M. N. K. Chowdhury, M. D. H. Beg, M. R. Khan, and M. F. Mina, "Synthesis of copper nanoparticles and their antimicrobial performances in natural fibres," *Mater. Lett.*, vol. 98, pp. 26–29, 2013.
- [36] H. J. Lee, J. Y. Song, and B. S. Kim, "Biological synthesis of copper nanoparticles using *Magnolia kobus* leaf extract and their antibacterial activity," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 88, no. 11, pp. 1971–1977, 2013.
- [37] R. Varshney, S. Bhadauria, M. S. Gaur, and R. Pasricha, "Characterization of Copper nanoparticles Synthesized by a novel Microbiological Method," no. December, 2010.
- [38] S. Jain, A. Jain, and V. Devra, "Experimental Investigation on The Synthesis of Copper Nanoparticles By Chemical Reduction Method," *Int. J. Sci. Eng. Res.*, vol. 5, no. 11, pp. 973–978, 2014.



- [39] Q. ZHANG, Z. YANG, B. DING, X. LAN, and Y. GUO, "Preparation of copper nanoparticles by chemical reduction method using potassium borohydride," *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, vol. 20, no. 50834003, pp. s240–s244, 2010.
- [40] J. Xiong, Y. Wang, Q. Xue, and X. Wu, "Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using l-ascorbic acid," *Green Chem.*, vol. 13, no. 4, pp. 900–904, 2011.
- [41] T. M. D. Dang, T. T. T. Le, E. Fribourg-Blanc, and M. C. Dang, "The influence of solvents and surfactants on the preparation of copper nanoparticles by a chemical reduction method," *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 2, 2011.
- [42] C. C. Huang, S. L. Lo, and H. L. Lien, "Zero-valent copper nanoparticles for effective dechlorination of dichloromethane using sodium borohydride as a reductant," *Chem. Eng. J.*, vol. 203, pp. 95–100, 2012.
- [43] J. B. Fathima, A. Pugazhendhi, M. Oves, and R. Venis, "Synthesis of eco-friendly copper nanoparticles for augmentation of catalytic degradation of organic dyes," *J. Mol. Liq.*, vol. 260, pp. 1–8, 2018.
- [44] H. J. Lee, G. Lee, N. R. Jang, J. H. Yun, J. Y. Song, and B. S. Kim, "Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract," *Une*, vol. 13, p. 15, 2016.
- [45] M. J. Guajardo-Pacheco, J. E. Morales-Sánchez, J. González-Hernández, and F. Ruiz, "Synthesis of copper nanoparticles using soybeans as a chelant agent," *Mater. Lett.*, vol. 64, no. 12, pp. 1361–1364, 2010.
- [46] I. Dealba-Montero *et al.*, "Antimicrobial Properties of Copper Nanoparticles and Amino Acid Chelated Copper Nanoparticles Produced by Using a Soya Extract," *Bioinorg. Chem. Appl.*, vol. 2017, pp. 15–17, 2017.
- [47] A. Allagui, R. Wuthrich, and E. A. Baranova, "Copper and nickel nanoparticles: synthesis by electrochemical discharges," *2008 1st Microsystems Nanoelectron. Res. Conf.*, no. August 2014, pp. 65–68, 2008.
- [48] S. Jadhav, S. Gaikwad, M. Nimse, and A. Rajbhoj, "Copper Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Their Antibacterial Activity," *J. Clust. Sci.*, vol. 22, no. 2, pp. 121–129, 2011.
- [49] R. Katwal, H. Kaur, G. Sharma, M. Naushad, and D. Pathania, "Electrochemical synthesized copper oxide nanoparticles for enhanced photocatalytic and antimicrobial activity," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 31, pp. 173–184, 2015.
- [50] M. Raja, J. Shuba, F. B. Ali, and S. H. Ryu, "Synthesis of copper nanoparticles by electroreduction process," *Mater. Manuf. Process.*, vol. 23, no. 8, pp. 782–785, 2008.

- [51] R. K. Nekouei, F. Rashchi, and A. A. Amadeh, "Using design of experiments in synthesis of ultra-fine copper particles by electrolysis," *Powder Technol.*, vol. 237, pp. 65–171, 2013.
- [52] G. Q. Yuan, H. F. Jiang, C. Lin, and S. J. Liao, "Shape- and size-controlled electrochemical synthesis of cupric oxide nanocrystals," *J. Cryst. Growth*, vol. 303, no. 2, pp. 400–406, 2007.
- [53] M. Araya, M. O. Grohnert, and F. Pizarro, "Cobre: Salud, Medio Ambiente y Nuevas Tecnologías.," p. 126, 2014.
- [54] M. Raffi *et al.*, "Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*," *Ann. Microbiol.*, vol. 60, no. 1, pp. 75–80, 2010.
- [55] J. P. Ruparelia, A. K. Chatterjee, S. P. Duttagupta, and S. Mukherji, "Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles," *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 3, pp. 707–716, 2008.
- [56] R. Sivaraj, P. K. S. M. Rahman, P. Rajiv, S. Narendhran, and R. Venckatesh, "Biosynthesis and characterization of *Acalypha indica* mediated copper oxide nanoparticles and evaluation of its antimicrobial and anticancer activity," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 129, pp. 25–258, 2014.
- [57] H. R. Naika *et al.*, "Green synthesis of CuO nanoparticles using *Gloriosa superba* L. extract and their antibacterial activity," *J. Taibah Univ. Sci.*, vol. 9, no. 1, pp. 7–12, 2015.
- [58] M. S. Usman, M. E. El Zowalaty, K. Shameli, N. Zainuddin, M. Salama, and N. A. Ibrahim, "Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 4467–4479, 2013.
- [59] A. Azam and M. Oves, "Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains," pp. 3527–3535, 2012.
- [60] M. J. Hajipour *et al.*, "Antibacterial properties of nanoparticles," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 499–511, 2012.
- [61] M. K. Rai, S. D. Deshmukh, A. P. Ingle, and A. K. Gade, "Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 112, no. 5, pp. 841–852, 2012.
- [62] L. C. Giannossa *et al.*, "Metal nanoantimicrobials for textile applications," *Nanotechnol. Rev.*, vol. 2, no. 3, pp. 307–331, 2013.
- [63] J. Theron, J. A. Walker, and T. E. Cloete, "Nanotechnology and water treatment:

- Applications and emerging opportunities," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 34, no. 1, pp. 43–69, 2008.
- [64] N. Cioffi *et al.*, "Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties," *Chem. Mater.*, vol. 17, no. 21, pp. 5255–5262, 2005.
- [65] S. Galdiero, "Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents," pp. 8894–8918, 2011.
- [66] R. Uauy, M. Olivares, and M. Gonzalez, "Essentiality of Copper in Humans," *Nutr. Rev.*, vol. 45, no. 8, pp. 176–180, 2009.
- [67] Z. Chen *et al.*, "Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo," *Toxicol. Lett.*, vol. 163, no. 2, pp. 109–120, 2006.
- [68] G. Isani *et al.*, "Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO<sub>4</sub> in rainbow trout," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 97, pp. 40–46, 2013.
- [69] B. Fahmy and S. A. Cormier, "Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells," *Toxicol. Vitr.*, vol. 23, no. 7, pp. 1365–1371, 2009.
- [70] B. Díaz *et al.*, "Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates," *Small*, vol. 4, no. 11, pp. 2025–2034, 2008.
- [71] J. S. Chang, K. L. B. Chang, D. F. Hwang, and Z. L. Kong, "In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, no. 6, pp. 2064–2068, 2007.
- [72] B. Kong, J. H. Seog, L. M. Graham, and S. B. Lee, "Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles," *Nanomedicine*, vol. 6, no. 5, pp. 929–941, 2011.
- [73] A. A. Van De Loosdrecht and M. M. A. C. Langenhuijsen, "OF IMMUNOLOGICAL METHOI ) S A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia," vol. 1759, no. 94, 1994.
- [74] A. S. Lanje, S. J. Sharma, and R. B. Pode, "Synthesis and optical characterization of copper oxide nanoparticles," no. January, pp. 4–9, 2010.
- [75] E. W. Technique and M.- Raman, "CHAPTER 6 Cu / Cu<sub>2</sub>O / CuO NANOPARTICLES : NOVEL SYNTHESIS BY EXPLODING WIRE TECHNIQUE AND EXTENSIVE."
- [76] A. Elisabet and F. López, "Viability and cytotoxicity of nanometric capsules functionalized with titanium dioxide," 2016.