

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**TESIS**

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE  
ÓXIDO DE COBRE POR HIDRÓLISIS FORZADA CON ACTIVIDAD  
FUNGICIDA”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**LICENCIADO EN QUÍMICA**

**ELABORADO POR:**

**ELIZABETH CARMEN PASTRANA ALTA**

**ASESOR:**

**Dr. HUGO ARTURO ALARCÓN CAVERO**

**LIMA – PERÚ  
2017**

**A mis padres, con amor.**

*“Mediante el trabajo ha sido como la mujer ha podido franquear la distancia que la separaba del hombre. El trabajo es lo único que puede garantizarle una libertad concreta”.*

*- Simone de Beauvoir*

# *Agradecimientos*

Agradezco por el apoyo brindado a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería. Agradezco también, por el apoyo financiero al Instituto General de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería (IGI).

Expreso mi más sincero agradecimiento a mi profesor asesor el Dr. Hugo Alarcón Cavero por los aportes y consejos académicos siempre oportunos. Agradecerle también, por las facilidades que brindó con los materiales necesarios para el proyecto y especialmente, por la confianza brindada desde el inicio hasta su culminación del presente trabajo.

A los profesores de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería por la colaboración y clases valiosas a lo largo de mi educación de pregrado. A mis profesores de la Universidad de São Paulo, especialmente al Dr. Breno Pannia por las facilidades de investigación en su laboratorio y el de sus colegas.

A mis compañeros del laboratorio del Grupo de Investigación de Síntesis de Materiales Avanzados (GISMA) por la camaradería y el apoyo que terminó contribuyendo en la realización de mi tesis. A Alejandro por cada idea nueva que motivaba el trabajo.

A mis amigos de siempre por las incalculables alegrías, momentos de diversión y reflexión que siempre me hicieron volver a la tesis. A Rafael por el apoyo invaluable.

En especial, agradezco a mi familia. A mis padres, Mateo y Mercedes, por el soporte y amor incondicional. A Yesi, por ser un referente y por su motivación constante.

A todos ustedes muchas gracias.

## RESUMEN

El presente trabajo se basa en la síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de cobre (II), obtenidas con una variación de la técnica sol-gel por hidrólisis forzada. Se utilizó la descomposición de la urea para darle el medio básico a la solución de cobre cuya sal precursora fue el acetato de cobre.

Se estudió la variación de las concentraciones de la sal precursora y de la urea para la obtención del menor tamaño de nanopartículas del óxido de cobre. Se determinaron las concentraciones “óptimas” con las que se obtuvieron los menores tamaños:  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2] = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$  y  $[\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}] = 8 \times 10^{-3} \text{ M}$ . También se estudió el efecto del pH en la síntesis a través de la acidificación o basificación con el ácido acético y amoníaco respectivamente, el pH óptimo fue de 5.6. La síntesis fue realizada bajo condiciones fáciles de alcanzar a una temperatura de  $80^\circ\text{C}$ , por lo cual se considera una metodología simple y de bajo costo.

Las nanopartículas sintetizadas fueron caracterizadas por la técnica de Dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering) para el estudio de la variación del tamaño hidrodinámico y su polidispersidad, mostrando un tamaño óptimo de 160 nm. Las técnicas FTIR y Raman muestran la formación de CuO y presencia de grupos carboxilos. El espectro DRX corrobora la presencia del óxido y asocia a este una estructura monoclinica *tenorita*. A través de la ecuación de Debye-Scherrer's se calculó el tamaño de cristallita igual a 13 nm. Las imágenes SEM muestran la morfología esférica de las nanopartículas que asociadas forman una estructura tipo *roseta* que, como tal, escapa de la escala nanométrica. Se determinó el tamaño promedio de las nanopartículas esféricas a través de una distribución normal gaussiana, el tamaño promedio fue de  $19 \pm 4$  nm. El espectro EDS muestra la cantidad porcentual de los átomos en el óxido: Cu = 69,2% y O = 27,4%. Se desarrollaron las isotermas de adsorción y desorción de  $\text{N}_2$  determinándose el área superficial BET de las nanopartículas igual a  $9,8 \text{ m}^2/\text{g}$  además de la presencia de poros mesoporosos.

Se evaluó la actividad fungicida de las nanopartículas del óxido de cobre. Se realizó el test pro-oxidante para comprender el mecanismo de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El test prooxidante reveló la generación de ROS en presencia de la sonda o en ausencia de esta. Así mismo, se realizó el test fúngico con el *Cladosporium herbarum* confirmándose una actividad fungicida a una concentración de 100 ppm. Dicha actividad antifúngica mostró una actividad superior a la del fluconazol, antibiótico del mercado farmacéutico.

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....                              | <b>1</b>  |
| 1.1. Óxido de cobre II, CuO.....                           | 1         |
| 1.2. Síntesis de nanopartículas de CuO.....                | 10        |
| 1.3. Proceso Sol-Gel.....                                  | 15        |
| 1.4. Vías de crecimiento no clásicas.....                  | 25        |
| 1.5. Especie fúngica: <i>Cladosporium herbarum</i> .....   | 26        |
| <b>2. HIPÓTESIS</b> .....                                  | <b>29</b> |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....                                  | <b>30</b> |
| <b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....                         | <b>31</b> |
| 4.1. Síntesis de nanopartículas de CuO.....                | 31        |
| 4.2. Solubilidad de las nanopartículas de CuO.....         | 33        |
| 4.3. Caracterización de las nanopartículas de CuO.....     | 34        |
| 4.4. Propiedades de las nanopartículas de CuO.....         | 36        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSIONES</b> .....                   | <b>40</b> |
| 4.1. Caracterización de las nanopartículas de CuO.....     | 40        |
| 4.2. Actividad fungicida de las nanopartículas de CuO..... | 53        |
| <b>6. CONCLUSIONES</b> .....                               | <b>58</b> |
| <b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                 | <b>59</b> |

## LISTA DE FIGURAS

Figura N.1. a) Parámetros cristalográficos. b) Celda unitaria monoclinica de CuO.

Figura N°2. Esquema de factores y mecanismos de toxicidad de las nps.

Figura N°3. Varios mecanismos de actividad antimicrobiana de las nps metálicas.

Figura N°4. Resumen esquemático de las características relevantes de las nps que pueden influir en la toxicidad: tamaño, modificación de la superficie, y la solubilidad.

Figura N°5. Visión esquemática de las diferentes vías que inducen toxicidad celular por las nps de CuO.

Figura N°6. Descripción de tecnologías y productos del proceso sol-gel.

Figura N°7: Nucleación y crecimiento de una partícula esférica.

Figura N°8: Variación de las velocidades de nucleación y crecimiento respecto a la concentración.

Figura N°9. Evolución simplificada de la concentración del soluto con el tiempo, durante la nucleación homogénea de partículas.

Figura N°10. Esquema de la superficie descrita por el modelo de Kossel-Stranski “terrazas-escalón-pliegue”.

Figura N°11. Representación esquemática de la cristalización clásica y no clásica. (a) la cristalización vía clásica, (b) Acoplamiento orientado de nanopartículas primarias que forman un cristal iso-orientado tras la fusión, (c) formación del mesocristal a través del auto-ensamblaje de nanopartículas primarias cubierta de especies.

Figura N°12. Proceso de formación de las nps de CuO a partir de  $\text{Cu}(\text{Ac})_2$  y úrea.

Figura N.13. Montaje experimental de la síntesis de las nps de CuO.

Figura N°14. Principio de funcionamiento del método de detección de especies reactivas formadas por la presencia de cobre. La adición de un prooxidante (peróxido) inicia la producción de ERO's catalizada por el  $\text{Cu}^{2+}$  presente en la muestra, convirtiendo la sonda no fluorescente DHR a su forma fluorescente (a). Curvas cinéticas de fluorescencia son obtenidas para diversas concentraciones de Cu; a partir de esas curvas, se determinan sus coeficientes angulares (m), que corresponden a la tasa de fluorescencia para una concentración dada de Fe (b). La tasa de fluorescencia es linealmente dependiente de la concentración de Cu, pudiendo ser usada para cuantificar la concentración del metal en la muestra deseada (c).

Figura N°15. Esquema de la preparación de la microplaca de 96 pocillos.

Figura N°16. Diagrama de equilibrio de fase Cu –  $\text{H}_2\text{O}$ .

Figura N°18. Espectro de infrarrojo en KBr de las nanopartículas de CuO.

Figura N°19. Espectro Raman de las nanopartículas de CuO.

Figura N°20. Patrón de Difracción de Rayos X para las nanopartículas de CuO. (\*) indica la posición del patrón de CuO, tarjeta 45-0937 JCPDS, para la difracción en fase monoclinica.

Figura N°21. Imágenes SEM de las nps de CuO. a) Magnificación 50000. b) Magnificación 100000.

Figura N°22. Distribución de diámetro de nanopartículas de CuO.

Figura N°23. Espectro EDS para las nps de CuO.

Figura N°24. Isotherma de adsorción y desorción de nitrógeno para nps de CuO.

Figura N°25. Capacidad oxidante de las nps de CuO.

Figura N°26. Fotografías de la actividad fungicida de las nps de CuO frente al antibiótico y  $\text{Cu}^{2+}$ .



## LISTA DE TABLAS

Tabla N.1. Reactivos y solventes.

Tabla N.2. Procedimiento experimental de síntesis de las nps de CuO.

Tabla N.3. Pruebas de solubilidad de las nps de CuO (1 mg/1 mL).

Tabla N°4. Diámetro hidrodinámico (d) de las nps variando la concentración de urea.

Tabla N°5. Diámetro hidrodinámico (d) de las nps variando la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Tabla N°6. Diámetro hidrodinámico (d) de las nps variando el pH de la solución de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Tabla N°7. Atribución de las bandas de infrarrojo.  $\nu$ : estiramiento,  $\delta$ : deformación.

Tabla N°8. Atribución de las bandas de infrarrojo.  $\nu$ : estiramiento,  $\delta$ : deformación,

$\rho$ : balanceo.

Tabla N°9. Cálculo del tamaño de cristalita.

Tabla N°10. Parámetros de red calculados por MAUD y de la tarjeta JCPDS.

Tabla N°11. Porcentajes de masa teóricos y experimentales de Cu y O.

Tabla N°12. Área superficial y volumen de poro de las nps y bulk de CuO.

Tabla N°13. Propiedades texturales de las nps de CuO.

## 1. MARCO TEÓRICO

Los materiales a nanoescala son de gran interés por tener propiedades únicas ópticas, eléctricas, magnéticas y por tanto tener una función como un potente candidato para aplicaciones de dispositivos nano. [1]

Los óxidos de los metales de transición (MO's) nanoestructurados, son una clase particular de nanomateriales empleados en el desarrollo de diversos materiales novedosos, funcionales e inteligentes. Estos MO's han estado atrayendo mucha atención no sólo para investigaciones científicas, sino también por las diversas aplicaciones prácticas debido a sus propiedades físicoquímicas (interacción con solventes, cohesión entre moléculas, calor específico, constante dieléctrica, entre otras). Sus propiedades físicas y químicas son estrechamente dependientes de los tamaños, formas, composiciones y estructuras de los nanocristales [2].

Fenómenos interesantes, como el notable aumento de superficie - volumen, cambio significativo en la energía de superficie y los efectos de confinamiento cuántico se dan cuando los MO's se reducen a la dimensión nano [3-5]. Además, son una importante clase de semiconductores, los cuales tienen aplicaciones en medios de almacenamiento magnético, transformación de energía solar, electrónica y catálisis [1].

La nanotecnología farmacéutica con numerosas ventajas ha ido creciendo llamando la atención de muchos investigadores. La aplicación de nanomateriales en sistemas de liberación de drogas ha sido investigado por más de veinte años mostrando innovación de formas en dosaje, con mejorados efectos terapéuticos y características físicoquímicas [6].

Recientemente, las nanopartículas (nps) de óxido de cobre (CuO) han demostrado tener efectos adversos en la supervivencia y el crecimiento de organismos [7]. La actividad antimicrobiana de metales como plata (Ag), oro (Au), titanio (Ti), zinc (Zn) y cobre (Cu) tienen en su individualidad varias propiedades, capacidades y actividades antimicrobianas de gama conocida aplicadas por siglos. Varios tipos de nps de óxidos entre ellas las de CuO han recibido gran atención por su potencial efecto antimicrobiano [6].

### 1.1 Óxido de Cobre II, CuO

El óxido de cobre II u óxido cúprico es el óxido con mayor estado de oxidación de Cu. Sus parámetros cristalográficos y la representación esquemática de su celda unitaria se muestran a continuación en la figura N°1 [8].

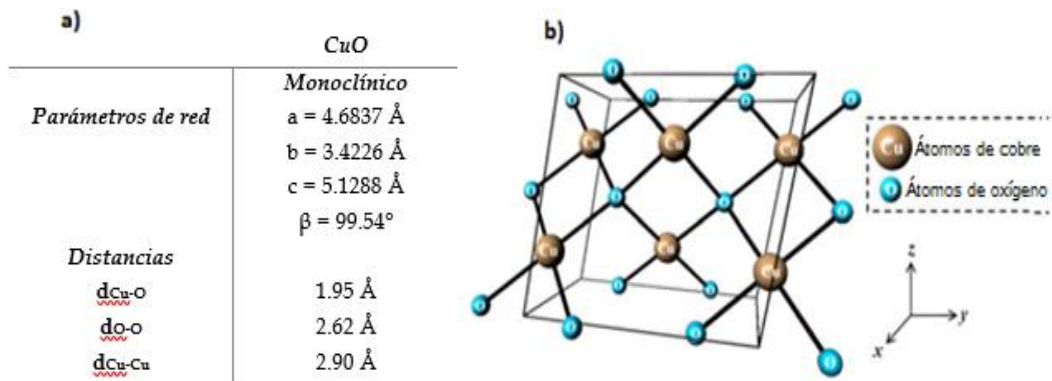


Figura N°1. a) Parámetros cristalográficos. b) Celda unitaria monoclinica de CuO. Adaptado de [8]

El CuO es un semiconductor de tipo *p* con un band gap estrecho ( $E_g$ ) de 1.2 eV teniendo diversas aplicaciones como sensores de gas, almacenamiento de hidrógeno, catálisis, conversión de energía solar, aplicaciones en emisión de campos y como agentes antimicrobianos [7]. Es bien conocido que el cobre metálico y complejos de cobre han sido usados como líquidos y sólidos desinfectantes para tejidos humanos por siglos [6]. Por otro lado, el CuO es más barato que otros óxidos y es fácilmente combinado con polímeros relativamente estables [9-10].

Hoy en día el cobre es usado como purificador de agua, alguicida, fungicida, nematocida, molusquicida y como agente bactericida [7].

### 1.1.1 Características de las nps de CuO

El CuO es el miembro más simple en la familia de compuestos de Cu y exhibe una gama de propiedades físicas, tales como la superconductividad en altas temperaturas, efectos de correlación de electrones y “spin dynamics” [11,12].

El CuO puede ser mezclado con polímeros fácilmente para obtener compuestos con propiedades químicas y físicas únicas. Debido a que pueden reducir la fricción [13] y reparar superficies desgastadas las nps de CuO se utilizan como aditivo en lubricantes, polímeros/plásticos y recubrimientos metálicos [14]. Por otra parte, la gran área superficial y sus inusuales morfologías cristalinas los dotan con actividad antimicrobiana, y dependiendo de la dosis inhiben cepas como la *Escherichia coli* [15]. Este hallazgo abre el camino hacia el desarrollo de un novedoso y específico agente antimicrobiano [16-17].

En la figura N°2 se resumen esquemáticamente el efecto tóxico de las nps de CuO. Los factores clave que dan lugar a su toxicidad incluyen el tamaño de partícula, disolución,

vías de exposición, estructuras, etc. Los mecanismos perjudiciales incluyen estrés oxidativo, efectos de coordinación, no-homeostasis, genotoxicidad, etc [7].

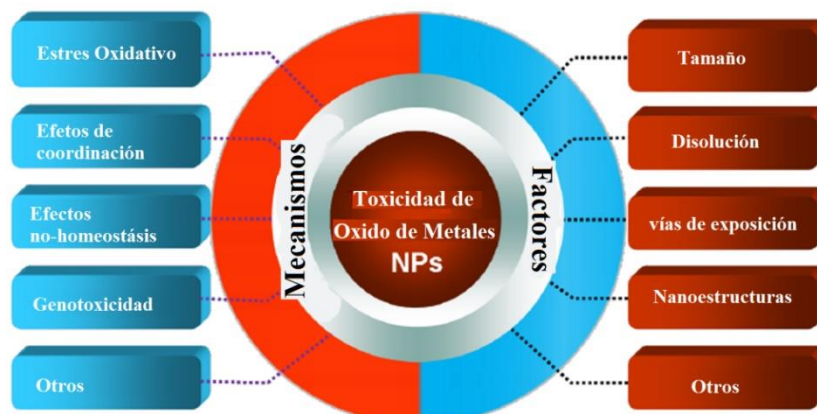


Figura N°2. Esquema de factores y mecanismos de toxicidad de las nps. Adaptación [7]

### 1.1.2 Toxicidad de las nps de CuO

#### ➤ En el ser humano

En el organismo, el cobre es uno de los elementos indispensables para mantener la homeostasis. Los iones de cobre pueden causar toxicidad una vez que ellos exceden el rango de tolerancia fisiológica *in vivo* (máxima concentración en el serum ceroplasmático 400 mg/L) [18-19].

Se realizaron bioensayos cancerígenos pulmonares después de la instilación intratraqueal de las nps de CuO. La evaluación histopatológica mostró que las nps de CuO inducen cambios inflamatorios agudos y severos en el pulmón de ratas a dosis altas y crónica a dosis bajas con instilaciones frecuentes [20]. Las nps de CuO podrían causar daños de citotoxicidad y daño en el ADN del epitelio pulmonar humano. Se verificaron lesiones oxidativas mediante la medición de la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) con la sonda fluorescente sensible a la oxidación, 2', 7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Comparando la relación entre la generación de ROS y el daño del ADN, se demostró que el estrés oxidativo era el efecto tóxico primario [21]. En comparación con células cultivadas en medio normal, las células expuestas a las nps de CuO exhibieron reducción de la actividad de las enzimas catalasa y glutatión reductasa (GR) y mostraron un aumento de la actividad glutatión peroxidasa (GPx) [22].

La toxicidad de las nps de CuO *in vitro* fue mayor que la de muchos otros óxidos metálicos y nanotubos [23].

➤ *En algas y peces*

Fueron estudiados los modelos experimentales de algas y pez cebra, cuyo crecimiento y toxicidad son tratados como indicadores de relevancia ambiental. Se estudió la toxicidad de las nps de CuO en la *Pseudokirchneriella subcapitata*, una microalga, utilizando la formulación “macro” de óxido de metal como un control. A bajas concentraciones, las nps de CuO (EC50 = 0,71 mg Cu/L) eran más soluble y más tóxicas que el control (EC50 = 11,55 mg Cu/L). Estos hallazgos demostraron que las formas solubles de Cu fueron altamente tóxicas para los peces [24]. Otro estudio indicó que las nps de CuO disminuyen el contenido de clorofila de la lenteja de agua y que la toxicidad de las nps de CuO es de tres a cuatro veces mayor que la del Cu iónico, debido a la mayor absorción de la nanopartícula [25].

➤ *En microorganismos*

Las interacciones metal-microorganismos han sido objeto de considerable atención en los últimos años, el interés ha surgido debido al potencial biotecnológico para la eliminación y/o recuperación de metales en los organismos superiores de las cadenas alimentarias, y la toxicidad de metales pesados en los metabolismos microbianos [26].

La actividad germicida de cobre, tanto como Cu libre o como especie complejada, es conocida y se ha documentado durante muchos años. Algunos informes interesantes han sido publicados sobre sus propiedades biocidas como polímeros que contienen sales de cobre [16-18].

Por su parte, los agentes fúngicos también pueden ser agentes perjudiciales patógenos y el cobre se ha utilizado durante décadas como un eficaz fungicida [7]. Todo esto exige la exploración de materiales alternativos para revestimientos antifúngicos eficaces, aunque la principal preocupación en esta estrategia es minimizar su toxicidad hacia los seres humanos.

### 1.1.3 Factores clave y mecanismos de toxicidad

Existen varios mecanismos propuestos con respecto a la actividad antimicrobiana de las nps metálicas. En la figura N°3 se muestran los diferentes mecanismos antimicrobianos propuestos de los nanometales.

Para el caso de las nps de CuO, el mecanismo antimicrobiano propuesto es atravesar la membrana celular del microorganismo y afectar sus enzimas vitales. El principal factor que influye en esta actividad es el tamaño de la partícula y la concentración [6].

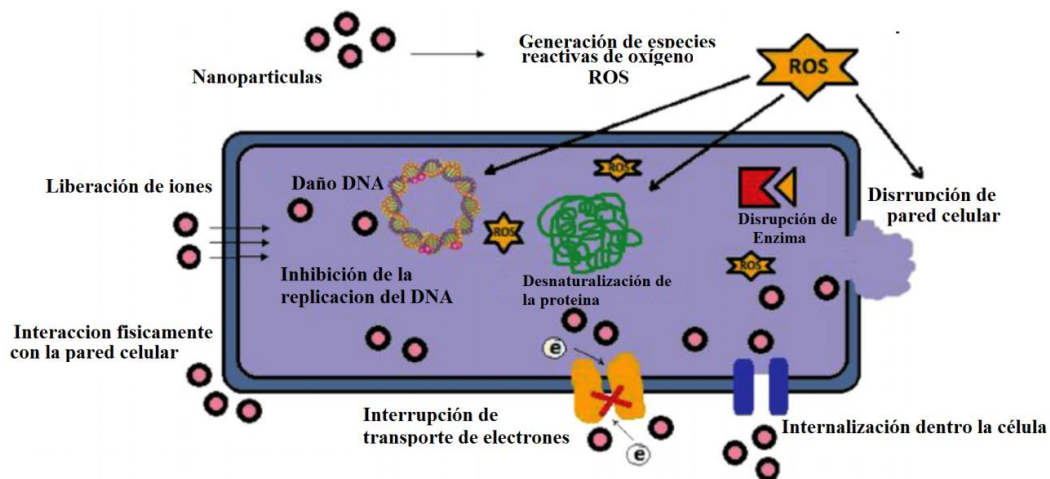
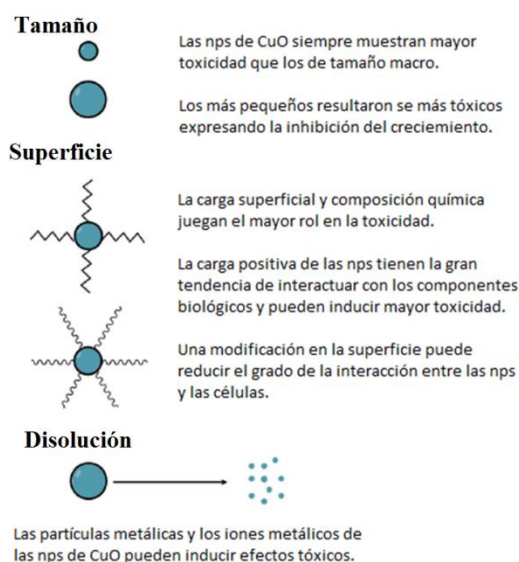


Figura N°3. Varios mecanismos de actividad antimicrobiana de las nps metálicas. Adaptado [6]

Para un adecuado entendimiento de la toxicidad de las nps de CuO es necesario explicar cómo se induce los efectos biológicos adversos. Las investigaciones aún están en curso, sin embargo, discutimos lo que se conoce actualmente.

#### 1.1.3.1 Factores Clave

Para las nps de CuO, los factores adicionales incluyen, nano-tamaño, nano-superficie, disolución, los efectos cuánticos, la concentración, la agregación, vías de exposición [27], ver figura N°4.



**Figura N°4. Resumen esquemático de las características relevantes de las nps que pueden influir en la toxicidad: tamaño, modificación de la superficie, y la solubilidad. Adaptado [7]**

➤ *Factor tamaño y características de superficie*

La mayoría de las propiedades de los nanomateriales se debe a su tamaño. Varios estudios comprueban que la toxicidad de las partículas depende del tamaño de las mismas. Se estudió la inhibición de crecimiento del alga verde *Desmodesmus subspicatus* con partículas de 25 y 100 nm encontrándose que las pequeñas inhibieron su crecimiento en mayor grado. Por otro lado, también se demostró que partículas nanométricas de menor tamaño provocaron la activación de trombocitos y granulocitos y la hemólisis generando inflamación inducida por hemólisis en muestras de sangre humana [28-29].

Los tamaños de las nps están directamente correlacionadas a varias propiedades esenciales como la de superficie, solubilidad y reactividad química, y algunos de ellos tienen efectos sobre las interacciones entre nanomateriales y biomoléculas que subsecuentemente afectan el comportamiento nanotoxicológico de las nps *in vivo* [30].

Además del tamaño, las características de superficie (por ejemplo, carga superficial y defectos de superficie) de las nps son otros factores clave que determinan la toxicidad de las nps de CuO [7].

➤ *Disolución*

Otro factor clave de la toxicidad es la disolución de iones metálicos. Los estudios han sugerido que las paredes celulares de las raíces de las plantas y hojas dejan excluidos

las nps grandes [31], pero absorben los iones metálicos del soluto de las nps [32]. La solubilidad es una importante propiedad que explica las razones de los efectos tóxicos en muchos organismos. En las bacterias se demostró que las nps de CuO eran mucho más solubles que el CuO en escala macro. Por otro lado, las partículas de tamaño nanométrico tienen áreas superficiales más grandes e interactúan con las moléculas del disolvente en mayor proporción que las partículas macro con el mismo peso, además las nps presentan una disolución más rápida [33].

Una posible razón para explicar la toxicidad de las nps CuO es su solubilidad, la cual excede de las partículas a escala macro de 45 a 50 veces más veces en comparación a las partículas a escala nano [34].

La solubilidad de las nps de CuO están relacionadas al pH de la solución y temperatura. La curva de solubilidad del CuO en agua como función del pH presenta un perfil en forma de V a una temperatura específica, y en valores de pH de 9 a 11 tienen poco efecto sobre la solubilidad a temperatura ambiente [35] y presentan menor toxicidad [7].

La toxicidad en las células (célula de carcinoma rectal, RKO) se consideró dependiente del contacto con las nps en lugar de la exposición a soluciones de iones metálicos solubles. Cuando aumenta el tiempo de exposición a 24 horas, el Cu<sup>2+</sup> liberado de las nps de CuO causa un daño significativo al ADN y representó el 31% del daño de la membrana celular [36]. Se cree que tanto las nps de óxido metálico como los iones disueltos contribuirán a la citotoxicidad, cuando las células son expuestas a las nps del óxido del metal.

Los potenciales efectos tóxicos de las nps de CuO son los efectos combinados de las partículas y solubilidad.

### ***1.1.3.2 Mecanismo de toxicidad de las nps de CuO***

Es conocido que las nps de CuO causan toxicidad en organismos y el medio ambiente. Los mecanismos de toxicidad de CuO siguen siendo desconocidos, estos dependen principalmente de la interacción entre las nps-biomoléculas, y la toxicidad implica principalmente desplegamiento de la proteína, fibrilación, entrecruzamiento tiol y la pérdida de la actividad enzimática [37].



Tres mecanismos que potencialmente explicarían la razón por la cual las nps de CuO ejercen efectos tóxicos son: estrés oxidativo, efectos de coordinación, y los efectos de no homeostasis. En la figura N°5 se presenta el mecanismo de entrada de las nps de CuO en las células (5a). Las nps pueden difundirse a través de la membrana directamente, cuando el tamaño es lo suficientemente pequeño, y es favorecido debido a los iones cargados en la superficie de las nps. También, los canales de iones y proteínas transportadoras permiten a las nps cruzar la membrana plasmática. Algunas nps entran en las células a través de "endocitosis": La membrana las envuelve alrededor y las vesículas transportan las nps dentro de la célula. El  $\text{Cu}^{2+}$  de las nps puede entrar en las células por el transporte y los canales iónicos dependientes del voltaje. El efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular inducido por las nps de CuO se muestran en la figura N°5b. Las nps pueden interactuar directamente con organelas oxidativas como las mitocondrias, las proteínas redox activas estimulan la producción de ROS en las células, y el ion  $\text{Cu}^{2+}$  producidos por las nps pueden inducir ROS por varias reacciones químicas. Las ROS pueden inducir roturas de la cadena de ADN y afectar la expresión genética. Por otra parte, el  $\text{Cu}^{2+}$  tiene la capacidad de formar quelatos con biomoléculas o desplazar los iones metálicos en metaloproteínas específicas, que pueden resultar en la inactivación funcional de la proteína (figura N°5c). El  $\text{Cu}^{2+}$  liberado por las nps aumentan la concentración local y alteran la homeostasis celular del catión para dar lugar a la toxicidad celular (figura N°5d) [7].

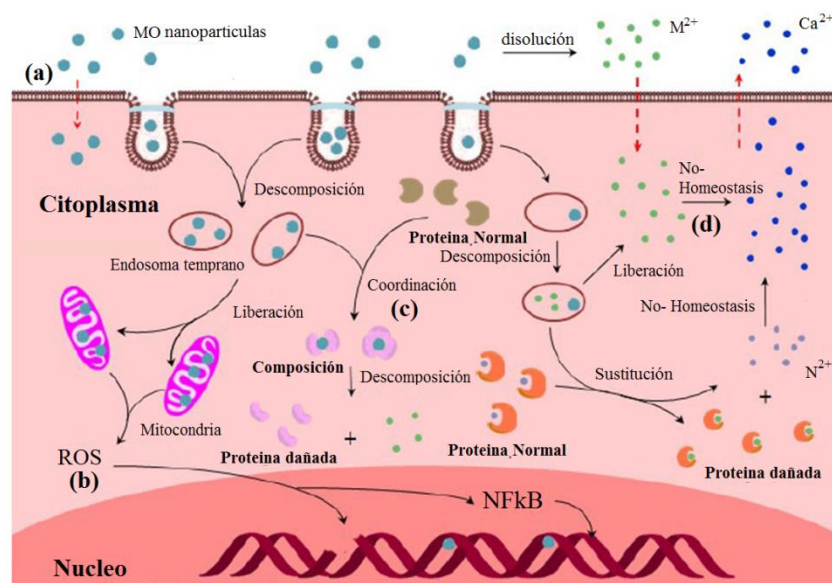


Figura N°5. Visión esquemática de las diferentes vías que inducen toxicidad celular por las nps de CuO. Adaptado [7]

➤ *Estrés oxidativo*

La generación de ROS y la inducción de estrés oxidativo son los principales mecanismos toxicológicos de las nps. Grandes cantidades de ROS podrían generarse incluso cuando sólo pequeñas cantidades de nps de CuO se incorporan en las células [38]. Las nps pueden inducir ROS directamente, una vez que están expuestos a un ambiente ácido de los lisosomas o interactuar con orgánelas oxidativas, tales como las mitocondrias [39-40]. Las nps son capaces de interactuar con biomoléculas debido a su gran superficie específica que dota al CuO con alta actividad reactiva y densidad electrónica. Durante este proceso, las reacciones químicas tienen lugar y aumentan la formación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), lo que conduce a la acumulación de ROS y del estrés oxidativo. Las ROS son derivados de oxígeno que surgen durante la vida en un ambiente oxigenado y contienen aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicales hidroxilos, y peróxido de hidrógeno. Las ROS puede reaccionar con biomoléculas, provocando un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad del sistema biológico para desintoxicar intermediarios reactivos o reparar el daño resultante [41].

La generación de ROS inducida por las nps puede conducir a una variedad de respuestas biológicas que dependen de la abundancia relativa de la producción de ROS, el tipo de vías celulares, y el elemento de respuesta antioxidante que se dedican a estrés oxidativo [42]. El radical  $\cdot OH$  se considera generalmente como una de las especies más tóxicos de las ROS y es capaz de oxidar casi todos los componentes celulares. El OH extracelular generado por las nps del óxido metálico podrían inducir daño oxidativo en las membranas celulares, que pueden causar efectos tóxicos en los organismos [7].

El exceso de estrés oxidativo puede modificar las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que estimula el sistema de defensa antioxidante o incluso conduce a la muerte celular. Mientras tanto, con el aumento de la producción de ROS, las nps pueden causar daños en el ADN y aumentar la expresión génica del receptor de la muerte [41]. Además, el aumento de ROS inducida por las nps en los lisosomas puede causar mutaciones puntuales de ADN o inducir roturas de acción simple o doble filamento [43].

➤ *Efectos de coordinación*

Las interacciones entre las nps de óxido de metal y proteínas *in vivo* o *in vitro* implican la coordinación e interacciones no covalentes. Aproximadamente el 40% de todas las proteínas conocidas contiene cationes metálicos, y el ion  $\text{Cu}^{2+}$  se unen a las proteínas en condiciones fisiológicas [44-45]. Si las mutaciones se producen en los sitios de unión a metal existentes, la estructura de proteínas y la actividad pueden ser reducidos o perdidas. Se ha discutido que la solubilidad es uno de los factores clave que causan toxicidad. El  $\text{Cu}^{2+}$  tienen la capacidad de formar quelatos con moléculas donantes. Un gran número de biomoléculas en organismos contienen átomos de coordinación, principalmente átomos de O y N, que pueden donar electrones solitarios pudiendo formar agentes quelantes para  $\text{Cu}^{2+}$  [46].

➤ *Efectos de no homeostasis*

Hay muchas funciones importantes para metales funcionales *in vivo*. Algunos metales funcionan de forma independiente y otros mantienen el funcionamiento compuesto. Los iones en  $\text{Cu}^{2+}$  desempeñan un papel importante de homeostasis en los organismos [47], niveles altos o bajos de este metal pueden alterar los mecanismos homeostáticos. La nps de CuO pueden liberar  $\text{Cu}^{2+}$  aumentando las concentraciones locales de este ion interrumpiendo la homeostasis celular del metal [48].

## **1.2 Síntesis de nanopartículas de CuO**

El desarrollo de métodos químicos ha sido ampliamente investigado para entender la importancia de la nanoescala de los nanomateriales permitiendo modular los parámetros como morfología, tamaño, distribución y composición de partícula.

Algunas rutas de síntesis de nanoestructuras de CuO involucran métodos electroquímicos, sonoquímicos, radiación microondas, electrospining, plantillas, spray-pirólisis, etc [2].

### **1.2.1 Métodos de síntesis [2]**

#### **1.2.1.1 Basado en soluciones**

Los métodos sintéticos basados en soluciones son maneras muy comunes y eficaces de preparar MO con un buen control de la forma, composición y reproducibilidad. Por lo general, a baja temperatura de reacción adecuados para la producción a gran escala.

Además, los parámetros de síntesis pueden ser racionalmente adaptados a lo largo de todo el proceso, lo que permite un control más preciso de las composiciones, tamaños y dimensiones de los materiales resultantes. Entre estos métodos se tiene el hidrotermal y el de precipitación.

#### A. Método hidrotermal

Las reacciones se realizan en agua en un recipiente sellado a temperatura de reacción sobre el punto crítico de una solución. La reacción es simple y ecoamigable con un post-tratamiento sencillo. El método presenta las siguientes ventajas: (i) las sales de cobre pueden estar bien disueltas en agua, lo que permite un ajuste de la fuente de los iones metálicos; (II) el agua es de bajo costo, no tóxica, y amistoso con el medio ambiente; (III) se pueden coordinar las moléculas para modular el crecimiento de los nanocristales; y (IV) la fuerte polaridad del agua favorece el crecimiento orientado.

La síntesis hidrotérmica de basa en un proceso de dos pasos. En primer lugar, la formación de las partículas de hidróxido cúprico  $[Cu(OH)_2]$  por la reacción de la sal cúprica con una solución básica, como hidróxido sódico o hidróxido de amonio. Las partículas de  $Cu(OH)_2$  se deshidratan a temperaturas fijas formando las nanopartículas de  $CuO$  finales. Los parámetros experimentales como la concentración cúprica, pH, tiempo de crecimiento o temperatura de crecimiento determinan la dimensión final, tamaño y calidad de las nanopartículas de  $CuO$ . En ese sentido varias han sido las síntesis de  $CuO$  desarrolladas a lo largo de los últimos años como se muestra en la tabla N°1.

**Tabla N°1. Resumen de las nanoestructuras obtenidas por la síntesis hidrotermal a diferentes condiciones [polietilenglicol (PEG), sodio dodecil sulfato (SDS), Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), etilenglicol (EG), dodecilbencenosulfonato de sodio (SDBS), dodecilsulfato (DS), hexametilenediamina (HMDA), poli-sodio-4-estirenosulfonato (PSS) [2].**

| <i>Morfología</i>                           | <i>Tamaño (nm)</i>   | <i>Precursor</i>                                     | <i>Aditivos</i>             | <i>Temperatura síntesis (°C)</i> |
|---|--|--|-----------------------------|----------------------------------|
| Tipo flor, tipo bote, tipo plato, elipsoide | Varios   | $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$<br>$NH_3 \cdot H_2O$        | PEG                         | 100-180                          |
| Tipo panal                                  | 90-100 nm diámetro, micrómetros de largo   | Hojas de Cu  | $Na_2WO_4$ ,<br>$Na_2MoO_4$ | 160                              |
| Nanoplaquetas                               | 400 nm a 2 mm de ancho y 1 mm a varios micrómetros de largo<br>1 $\mu m$ de ancho<br>120-300 nm de ancho y 480-700 nm de largo | $Cu_xS$<br>NaOH<br>Hojas de Cu<br>$Cu(DS)_2$<br>NaOH | $H_2O_2$                    | 150, 200, 230<br>150<br>120      |

|                                   |   |  |  |            |
|-----------------------------------|---|--|--|------------|
| Tipo hoja                         | 0.5-1.5 $\mu\text{m}$ de extensión, 80-110 nm de largo  | $\text{Cu}(\text{OH})_2$   | Urea   | 150        |
| Tipo momornica                    | Menor a 100 nm de largo y 30-50 nm de ancho   | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$<br>$\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$            | -  | 180        |
| Tipo dendrita                     | 100 nm en ancho y varios micrómetros de largo   | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$<br>NaOH  | EG   | 200        |
| Tipo rama y tipo hojuela          | Cientos de nm de largo y de 20-100 nm de diámetro para tipo rama.<br>50-200 nm de ancho y 300-400 nm de largo para tipo hojuela | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  | Citrato de sodio   | 160        |
| Esférica                          | 500 nm diámetro   | $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$   | Urea   | 121        |
| Huecos microesféricos jerárquicos | 3.5 $\mu\text{m}$ de diámetro   | $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$                                  | Urea   | 120        |
| Tipo rueda dentada                | 10 $\mu\text{m}$ de diámetro  | $\text{Cu}(\text{NO}_3) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   | PEG  | 150-180    |
| Tipo flor                         | 2.5-3 $\mu\text{m}$ de largo<br>6 $\mu\text{m}$ de diámetro   | Hilos de cobre<br>$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$                                    | $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,<br>$\text{H}_2\text{SO}_4$<br>CTAB | 140<br>150 |
| Tipo flor jerárquica              | 5-10 $\mu\text{m}$ de largo   | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$<br>NaOH  | $\text{H}_2\text{O}_2$   | 120        |
| Tipo murciélago                   | 70 nm de diámetro, 170 nm de largo  | $\text{Cu}(\text{NO}_3) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   | Urea   | 100-150    |
| Tipo mariposa jerárquica          | 6 $\mu\text{m}$ de largo y 2-4 $\mu\text{m}$ de ancho   | $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  | SDBS   | 80-150     |
| Nanomarañas                       | 20-30 nm de diámetro y 350-500 nm de largo  | $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  | SDBS   | 130        |
| Tipo semilla de durazno           | 4 $\mu\text{m}$ de largo y 3 $\mu\text{m}$ de ancho   | $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  | [Omin]TA   | 100        |
| Huecos micro                      | 1.5-3 $\mu\text{m}$   | $\text{CuSO}_4$<br>$\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$                                      | Tirosina   | 130        |
| Tipo nave espacial                | 200-300 nm de ancho y varios micrómetros de largo   | $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$                                  | CTAB   | 120        |
| Tipo manojo                       | 2 $\mu\text{m}$ de largo  | $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   | Urea   | 120        |
| Tipo discos hexagonales en capas  | 3-4 $\mu\text{m}$ de largo y 1.5-2.0 $\mu\text{m}$ de ancho   | $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$<br>$\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | HMDA   | 130        |
| Tipo diente de león jerárquica    | 3-6 $\mu\text{m}$ de tamaño   | $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   | EG   | 130        |
| Tipo unión de hemisferios         | 2-2.5 $\mu\text{m}$ de tamaño   | $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$<br>NF                            | PSS  | 180        |
| Tipo dendrita jerárquica          | 6-9 $\mu\text{m}$ de tamaño   | $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   | Urea   | 160        |

### B. Método de precipitación

La síntesis de precipitación química de CuO es similar al método hidrotérmico con una reacción también ocurriendo en un recipiente abierto a bajas temperaturas

(normalmente por debajo de 100° C). Este proceso puede definirse simplemente como la reacción química entre los precursores para producir monómeros que posteriormente se agregan.

Usualmente se parte de sales cúpricas y compuestos alcalinos (usualmente NaOH). En la tabla N°2 se muestran un resumen de las nanoestructuras de CuO obtenidas por esta técnica. Este método se caracteriza por el control en la morfología y tamaño de las estructuras además del bajo costo.

**Tabla N°2. Resumen de las nanoestructuras obtenidas por el método de precipitación a diferentes condiciones [polietilenglicol (PEG), Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), dodecilsulfonato de sodio (SDBS), dodecilsulfato (DS), hexametilenediamina (HMDA), polivinilpirrolidona (PVP) [2].**

| <i>Morfología</i>                                | <i>Precursor</i>  | <i>Aditivos</i>   | <i>Temperatura Síntesis (°C)</i> | <i>Duración (h)</i> |
|--|---|---|----------------------------------|---------------------|
| Nanoalambres, rectángulos, semillas, cinta, hoja | Cu(NO <sub>3</sub> ).3H <sub>2</sub> O<br>NaOH  | -   | 80                               | 0.5                 |
| Tipo erizo                                       | Cu(NO <sub>3</sub> ).3H <sub>2</sub> O  | Urea  | 100                              | 6                   |
| Tipo flor  | Cu(NO <sub>3</sub> ).3H <sub>2</sub> O<br>NaOH  | HMTA  | 100                              | 3                   |
| Tipo cinta, bamboo, hoja y nave espacial         | CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O<br>NaOH  | PEG, CTAB   | 75                               | 0.5                 |
| Tipo hoja  | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, KOH<br>NH <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O              | -   | 25                               | 2                   |
| Tipo hoja jerárquica                             | Cu(NO <sub>3</sub> ).3H <sub>2</sub> O<br>NaOH  | -   | 100                              | 12-72               |
| Tipo Carambola                                   | Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .3H <sub>2</sub> O<br>NaOH                                | HMTA  | 95                               | 3                   |
| Tipo flor  | Cu(NO <sub>3</sub> ).3H <sub>2</sub> O<br>NaOH  | HMTA,<br>CATB   | 100                              | 3                   |
| Nanocintas y nanoanillos                         | CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O<br>NaOH  | SDBS  | 120                              | 0.5                 |
| Nanoalambre                                      | CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O<br>NH <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O                   | -   | 35                               | 40                  |
| Nanocadenas jerárquicas                          | CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O<br>NaOH  | PVP,<br>(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 100                              | 12                  |
| Nanohojas jerárquicas                            | Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O<br>NH <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O | -   | 30                               | 72                  |
| Nanohojas y nanoelipses                          | Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O<br>NH <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O | -   | 65                               | 24                  |
| Microesferas tipo flor                           | Cobre en polvo,<br>NaOH   | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> | 25                               | 20                  |
| Microesferas tipo elípticas                      | Cu(CH <sub>3</sub> COO),<br>NaOH  | -   | 25                               | 24                  |
| Tipo plato                                       | Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , NaOH  | -   | 80                               | 0.5                 |
| Tipo flor jerárquica                             | Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .3H <sub>2</sub> O<br>NH <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O   | -   | 80                               | 4                   |

### ***1.2.1.2 Conversión térmica de estado sólido***

Se pueden generar varias nanoestructuras de CuO mediante la conversión térmica de los precursores. El proceso generalmente comienza con la síntesis de los precursores de Cu a través de la reacción de una sal cúprica (usualmente nitrato o cloruro) con compuestos alcalinos (usualmente NaOH). Los precursores cúpricos obtenidos se centrifugan, a continuación, se lavan con agua y etanol absoluto. Finalmente, estos se calcinan en estado sólido para obtener nanoestructuras de CuO finales.

Este método es similar al método de precipitación química, pero la deshidratación térmica de los precursores cúpricos ( $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$ ,  $\text{CuC}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , etc.) se da a una temperatura más alta.

### ***1.2.1.3 Método electroquímico***

Este método es altamente usado para la preparación de materiales de CuO nanoporosos debido a su simplicidad, baja temperatura en la operación y la viabilidad comercial. Las ventajas del uso de este método fue el control del crecimiento, morfología y tamaño de los productos a través de los parámetros de deposición (voltaje, densidad de corriente, temperatura, entre otros). De hecho, el incrementar la densidad de corriente de  $5 \text{ mAcm}^{-2}$  a  $10 \text{ mAcm}^{-2}$  y luego a  $20 \text{ mAcm}^{-2}$ , la tendencia de la morfología varía de nanoagujas a nanorods y luego a nanoplacas irregulares. Para la síntesis de CuO soportados en sustratos de vidrio o tipo panal de abejas el  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  fue fabricado por deposición electroquímica de una hoja de cobre en solución acuosa básica y luego fueron tratadas térmicamente a diferentes temperaturas (mayores a  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Para la síntesis de nanocristales de CuO los electrodos fueron sumergidos en una solución de  $\text{NaNO}_3$  y se mantuvo un potencial de crecimiento constante de 3V a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los nanotubos obtenidos por esta técnica tuvieron un ancho de 50 nm con una superficie muy rugosa. Este método se ha caracterizado por el control que se puede tener respecto a las fases del CuO.

### ***1.2.1.4 Método de oxidación térmica***

Este método ha sido usualmente empleado para la síntesis de nanoestructuras 1D de CuO. El método consiste en calentar directamente el cobre en presencia de oxígeno para fomentar la reacción que origine las nanoalambres de CuO. La morfología del material depende de la temperatura de oxidación, el tiempo, el caudal del gas y tipos de sustratos.

Este método se caracteriza por la fabricación a gran escala, uniformidad del material y la baja impureza.

#### **1.2.1.5 Otros métodos**

Estos métodos se han utilizadas en menor medida para preparas nanoestructuras de CuO. Estas incluyen síntesis sonoquímica, por irradiación microondas, asistido por plantillas, microemulsión, electrospinning y síntesis combinadas con métodos físicos (pulverización – pirolisis, irradiación – sonoquímica, etc.). Se han obtenido materiales como por ejemplo nanorods, nanopartículas, microesferas con diferentes estructuras como tipo hoja, huecas, flor, entre otras.

Como se observa el CuO ha sido ampliamente sintetizado por varios métodos, particularmente el método basado en soluciones es una de los más desarrolladas por su buen control de las nanoestructuras, equipos de uso común y su bajo costo en general.

Uno de los procesos donde se tiene más control químico de la síntesis por este método es el proceso Sol-Gel.

### **1.3 Proceso Sol-Gel**

El proceso Sol-Gel consiste en la evolución de redes poliméricas híbridas (metal-cadena orgánico), a través de la formación de una suspensión coloidal (sol), de tamaño de partícula de ~ 1-100 nm y la posterior gelificación del sol para formar una red en una fase líquida y continua (gel). Los precursores de estas redes están generalmente coordinados a un ligando que poseen dos funciones: complejación del metal en un estado estable en la fase líquida y la de monómero de polimerización para formar dicho gel [49] (figura N°6). La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) definen un sistema coloidal como una dispersión de una fase en otra donde, “las moléculas o partículas polimoleculares dispersas en un medio tienen al menos en una dirección una dimensión aproximadamente entre 1 nm y 1 micras”. Así, el término “sol” puede aplicarse a sistemas formados in situ de partículas de polímero inorgánico a través de enlaces covalentes [50].



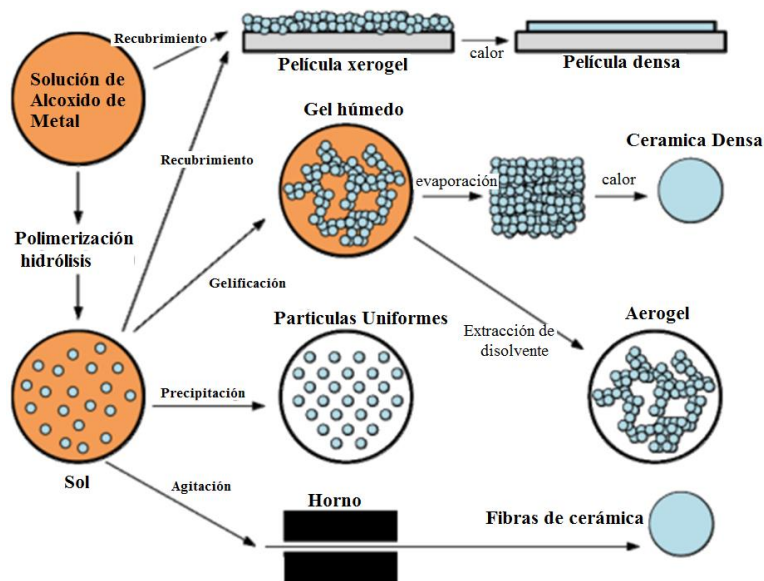


Figura N°6. Descripción de tecnologías y productos del proceso sol-gel. Adaptado [51]

Básicamente son tres los tipos de procesos Sol- Gel dependiendo de la clase de ligando unidos al metal envuelto en el óxido final [49]. Estos son:

- Alcóxidos.** El ligando es un alcohol desprotonado. Suelen reaccionar con el aire y se debe trabajar en atmósfera controlada. Es el sistema más estudiado.
- Carboxilatos.** El ligando es un ácido orgánico desprotonado como el trifluoroacetato. Son compuestos poco volátiles y de difícil descomposición.
- $\beta$ -dicetonas.** Compuestos con dos oxígenos resonantes con gran capacidad quelante, alta volatilidad y gran capacidad polimerizante cuando están coordinadas con un metal. Se descomponen a temperaturas muy bajas.

Un sol es una dispersión de partículas coloidales en fase líquida que son suficientemente pequeñas para permanecer suspendidas por movimiento Browniano. Habitualmente es obtenido por vía polimérica, implica hidrólisis y condensación de sales metálicas o compuestos metalorgánicos [51].

El desarrollo de Sol-Gel ha sido enfocado hacia la obtención de óxidos [51].

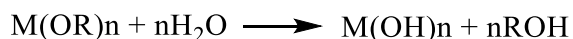
### 1.3.1 Precursores moleculares metal orgánicos [49]

Los grupos *alcoxi* (OR) están formados por R: grupo orgánico saturado o no saturado. Los alcóxidos de un metal (M),  $M(OR)_n$ , forman precursores moleculares versátiles para la síntesis de los óxidos. Los metal-alcóxidos son en general altamente reactivos debido a la presencia del grupo altamente electronegativo OR (fuertes  $\pi$ -donadores) que

estabilizan a M en altos estados de oxidación y los hacen susceptibles a ataques nucleofílicos.

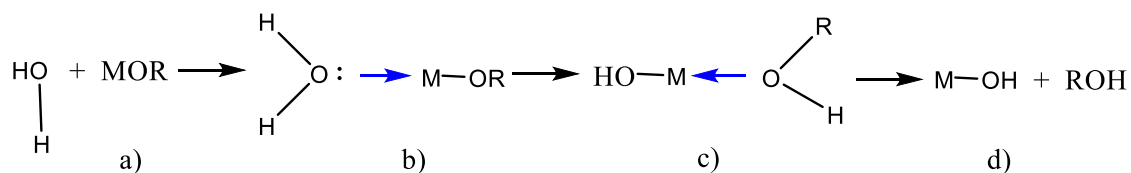
### 1.3.2 Hidrólisis y condensación de alcóxidos del metal [49]

Los grupos *alcoxi* (OR) hacen del átomo metálico sumamente reactivos con el agua formando hidróxidos u óxidos hidratados (a través de un ataque nucleofílico). La reacción global puede estar escrita como sigue:

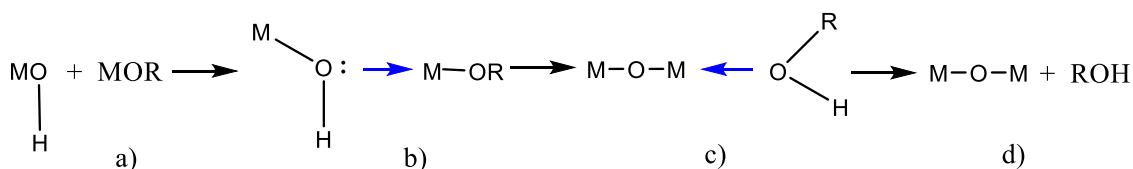


El proceso de hidrólisis y condensación están involucrados en la formación de una red de óxido de alcóxidos de metal. La hidrólisis y condensación se desarrollan por mecanismos de sustitución nucleofílica ( $S_N$ ) envolviendo una adición nucleofílica ( $A_N$ ) seguida de la transferencia de un proton debido al ataque de la molécula a un alcóxido o ligando hidroxilo sin la transición de estado y remoción de la especie protonada como alcohol (alcoxolación) o agua (oxolación).

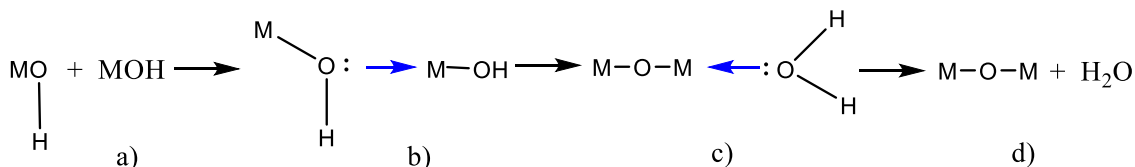
#### Hidrólisis



#### Alcoxolación



#### Oxolación



La termodinámica del proceso de hidrólisis, alcoxolación y oxolación son gobernadas por el carácter nucleofílico de la molécula, la electrofilicidad del metal y la carga parcial y estabilidad del grupo saliente. O sea, cuando la carga parcial,  $\delta$ , sea:  $\delta(\text{O}) \ll 0$ ,  $\delta(\text{M}) \gg 0$  y  $\delta(\text{H}_2\text{O})$  o  $\delta(\text{ROH}) > 0$ .

La cinética es gobernada por la instauración en la coordinación del átomo metálico en los alcóxidos  $N - z$ , donde  $N$  es el máximo número de coordinación y  $z$  es el estado de oxidación del átomo metálico en el óxido, y la habilidad de transferir el electrón.

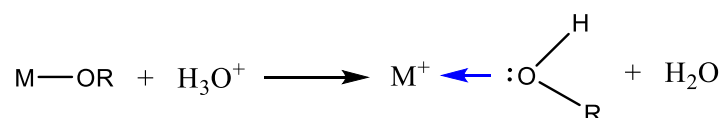
Según las condiciones experimentales se pueden considerar tres mecanismos competitivos: alcoxolación, la oxolación y la olación.

- i) **Alcoxolación** es una reacción por la cual un grupo *alcoxo* forma puentes a través de la eliminación de una molécula alcohólica. El mecanismo es análogo a la hidrólisis, por tanto, su termodinámica y cinética de esta reacción es gobernada por los mismos parámetros.
- ii) **Oxolación** sigue el mismo mecanismo de la alcoxolación, pero el grupo R de las especies que salen es un protón. El grupo saliente es el agua.
- iii) **Olación** puede ocurrir cuando la coordinación completa del átomo de metal no está satisfecha en el alcóxidos ( $N - z > 0$ ). Los grupos hidroxilo pueden formarse a través de la eliminación de una molécula del solvente. La molécula saliente puede ser  $H_2O$  o ROH dependiendo de la concentración del agua en el medio. Su cinética es alta porque no ocurre la transferencia del protón, no hay especie intermediaria.

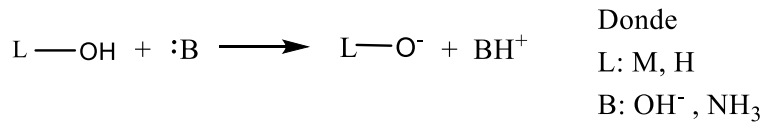
Las reacciones de hidrólisis, alcoxolación, oxolación y olación pueden estar involucradas en la transformación de un precursor molecular en una red de óxido. La estructura y la morfología del óxido resultante depende fuertemente de la contribución relativa de cada reacción, además de los parámetros internos (naturaleza del átomo metálico y grupo alquil, estructura del precursor molecular) y externos (radio, catalizador, concentración, solvente y temperatura).

### 1.3.3 Rol del catalizador [49]

Los catalizadores ácidos y básicos pueden influenciar en la velocidad de hidrólisis y condensación y la estructura del producto. En medio ácido se puede protonar los grupos alcóxidos mejorando la cinética de la reacción produciendo buenos grupos salientes.



Mientras que en condiciones alcalinas se producen fuertes nucleófilos debido a la desprotonación de los ligandos hidroxilo, como se muestra a continuación.



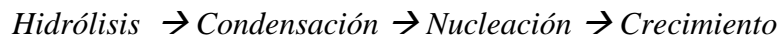
### 1.3.4 Nucleación y crecimiento [52]

El proceso Sol Gel busca obtener una dispersión de tamaños de partícula muy reducido con un tamaño y forma similar, partículas monodispersas.

En este sentido controlamos los procesos de Nucleación y crecimiento. Nucleación es el proceso por el cual se forman los iniciadores conocidos como “embriones” (centros de nucleación). El crecimiento es la etapa siguiente, en la cual los embriones crecen formando núcleos desde los cuales empiezan a crecer el sólido.

### 1.3.5 Relación entre hidrólisis, condensación y la formación de partículas sólidas[52]

Las reacciones químicas que transforman los precursores en la solución, producen una gran variedad de complejos. Estos complejos pueden agruparse para formar estructuras grandes produciendo la fase sólida. La formación de partículas sólidas puede ser descrita como un proceso de nucleación y crecimiento según:



La obtención de una estructura homogénea sugiere alcanzar los siguientes objetivos:

- Tamaño de partículas entre 0,1 y 1 μm.
- Distribución de partículas pequeñas (monodispersión).
- Estado no aglomerado.
- Forma equiaxial (por ejemplo, las esferas).

### 1.3.6 Energía libre de una partícula esférica [52]

En el proceso de transformación de fase producida por la nucleación y el crecimiento, la energía libre total ( $\Delta G_r$ ) para formar una partícula esférica con radio ‘r’ comprende una contribución de energía  $\Delta G_s$ , para crear la superficie de la partícula, y una contribución de energía  $\Delta G_{int}$ , para la transformación de fase dentro de la partícula.

$$\Delta G_r = \Delta G_s + \Delta G_{int} \dots (1)$$

La contribución debida a la superficie es de signo positivo y depende de la energía superficial ( $\gamma$ ) de la partícula.

$$\Delta G_s = 4\pi r^2 \gamma > 0 \dots (2)$$

La contribución debida a la formación de fase dentro de la partícula es de signo negativo ( $\Delta G_{int}$ ) y depende de la diferencia entre las energías libres por unidad de volumen ( $\Delta G_v$ ) entre la nueva fase  $\beta$  y la fase anterior  $\alpha$ .

$$\Delta G_{int} = \frac{4}{3}\pi r^3(G\beta - G\alpha) = \frac{4}{3}\pi r^3\Delta G_v < 0 \dots (3)$$

La variación de la energía libre,  $\Delta G_r$ , para formar la partícula depende de  $r$ . Al comienzo cuando  $r$  es muy pequeño, la contribución superficial domina,  $\Delta G_r > 0$ , no siendo un estado termodinámicamente favorable; sin embargo, para un valor crítico ( $r_c$ ),  $r = r_c$ , la contribución interna empieza a ser la dominante y la evolución pasa a ser termodinámicamente favorable, ver figura N°7. El valor de  $r_c$  para el cual  $\Delta G_r$  alcanza el máximo valor está dado por la derivada en función del radio:

$$\frac{\partial \Delta G_r}{\partial r} = 0 \dots (4)$$

Por tanto:

$$r_c = \frac{-2Y}{\Delta G_v} = 0 \dots (5)$$

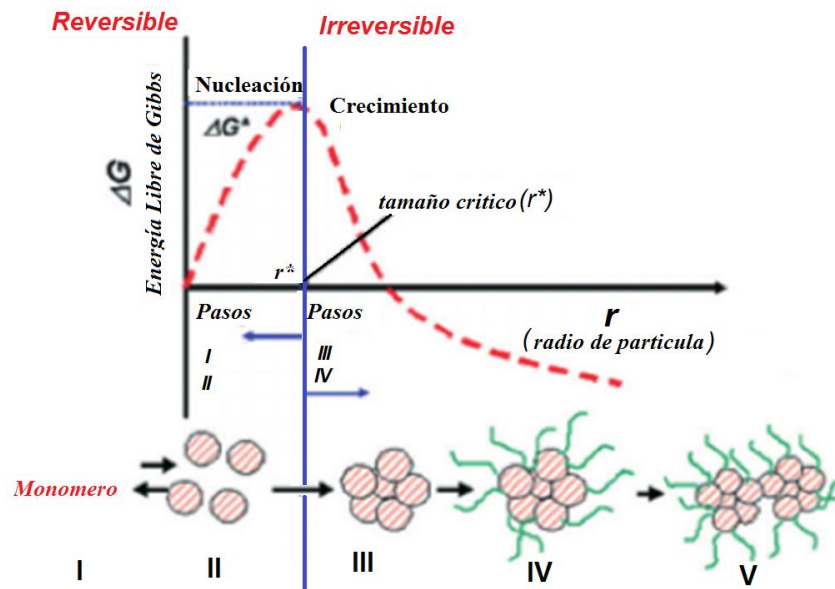


Figura N°7. Nucleación y crecimiento de una partícula esférica. Adaptado [53]

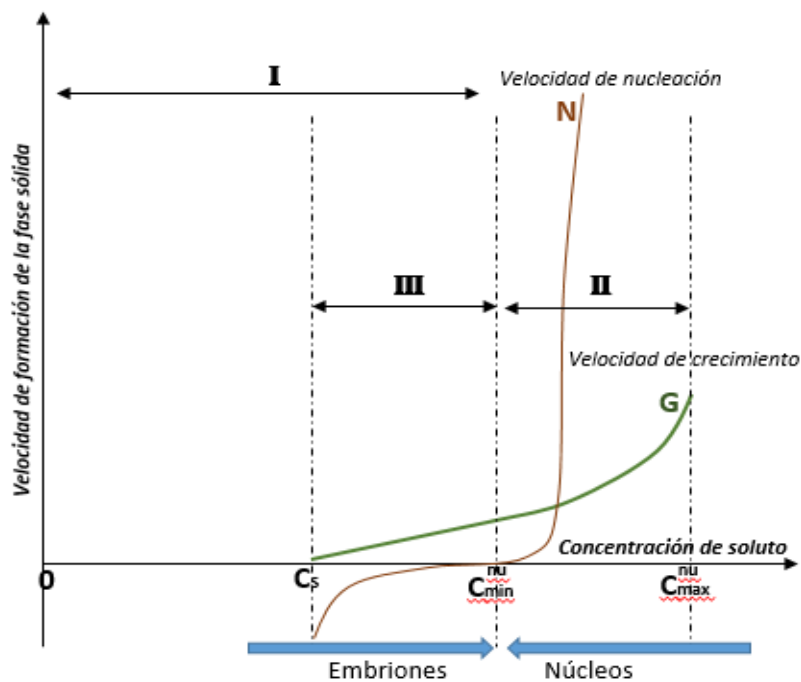
Cuando  $r < r_c$  la nueva fase se conoce como “embrión” por ser el inicio del proceso *nucleación*. Cuando  $r > r_c$  la partícula formada se llama núcleo y el proceso *crecimiento*. La energía libre del punto crítico corresponde al máximo de  $\Delta G_r$  denominado ahora  $\Delta G_c$  se determina reemplazando  $r$  por  $r_c$ :

$$\Delta G_c = \frac{4}{3}\pi r_c^2 \gamma = \frac{16 \pi \gamma^3}{3(\Delta G_v)^2} \dots (6)$$

### 1.3.7 Modelo de lamer para la nucleación homogénea en solución [52]

Si no se tiene suficiente cuidado, la nucleación y el crecimiento pueden ocurrir simultáneamente obteniéndose una población polidispersa de tamaños de partícula. Cuando dos líquidos son mezclados rápidamente, se producen variaciones locales en la concentración de los reactivos, obteniéndose una distribución irregular de tamaños. Para obtener una distribución monodispersa es necesario saber, al menos cualitativamente, la cinética de la nucleación y del crecimiento. Las variantes más conocidas de nucleación homogénea usadas para sintetizar partículas monodispersas incluyen la hidrólisis forzada y la incorporación controlada de cationes y aniones.

El control de la nucleación homogénea descansa en las sucesivas etapas que encuentran ilustradas en la figura N°8.



*Figura N°8: Variación de las velocidades de nucleación y crecimiento respecto a la concentración. Adaptado [52]*

La razón de crecimiento (G) y de nucleación (N) están en función de la concentración (C) del soluto. Este soluto puede ser cualquier complejo en solución, el cual será el resultado de la hidrólisis y condensación de precursores. La razón de crecimiento es mayor de cero por encima del límite de solubilidad (C<sub>s</sub>). Para que ocurra la nucleación se requiere una

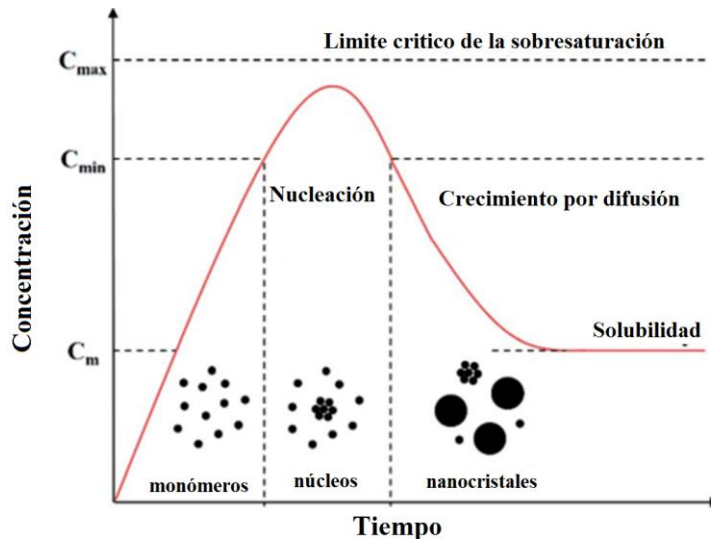
mínima concentración de supersaturación ( $C_{\min}^{nu}$ ),  $C_{\min}^{nu} > C_s$ . Dependiendo de la composición de la solución y de la naturaleza de los complejos los cuales pueden alcanzar más fácilmente la mínima supersaturación necesaria para el crecimiento, G y N pueden ser más o menos rápidos uno con respecto del otro. La nucleación ocurre en la región II, así como también el crecimiento. Sin embargo, si G es relativamente pequeña en comparación con N, es posible mantener C por encima de  $C_{\min}^{nu}$  por un tiempo considerable para que los núcleos se puedan formar mientras no se produzca un crecimiento apreciable. Si la magnitud relativa de estas velocidades se invierte, es necesario permitir que la nucleación proceda por un periodo de tiempo corto. Para detener la nucleación se debe disminuir la concentración del soluto por debajo de  $C_{\min}^{nu}$  pero mantenerla por encima de  $C_s$  para que proceda sólo el crecimiento.

### 1.3.8 Hidrólisis forzada [52]

La técnica de hidrólisis forzada consiste en darle suficiente tiempo a la nucleación, de una solución que contenga una determinada concentración de precursores, para que esta ocurra espontáneamente.

Los precursores están inicialmente dispersos en el disolvente, a continuación, se generan los monómeros a partir de la reacción química entre precursores. A medida que la concentración de monómeros aumenta el nivel de sobresaturación, los núcleos se forman por agregación y auto-nucleación de monómeros. Con la agregación continua de los monómeros en estos núcleos pre-existentes, el crecimiento de nanocristales se produce hasta que la concentración de monómeros cae por debajo del nivel crítico  $C_{\min}^{nu}$ , ver figura N°9.

Hay que señalar que los nuevos núcleos pueden formarse durante el crecimiento de nanocristales y que a menudo producen el aumento del tamaño debiendo, por tanto, ser un proceso controlado.



*Figura N°9. Evolución simplificada de la concentración del soluto con el tiempo, durante la nucleación homogénea de partículas. [54]*

La concentración inicial del precursor se debe seleccionar de tal manera que la nucleación solo se produzca por un corto tiempo, así los núcleos prácticamente crecerán simultáneamente.

Dependiendo de cómo el crecimiento es llevado a cabo, a partir de complejos poliméricos o complejos iónicos pequeños, se forman partículas amorfas o cristalinas, respectivamente. El tamaño de partícula, la forma y la composición, dependen también fuertemente del tipo de anión y de la fuerza iónica. Si se usa una pequeña concentración del precursor, se necesita más tiempo para que los complejos alcancen la supersaturación y las partículas puedan nuclear. Otra posibilidad es que diferentes complejos, con una cinética de formación más lenta, pero con una estructura termodinámica estable puedan nuclear diferentes partículas. Por tanto, el tipo de partícula obtenido, por ejemplo, amorfo o cristalino depende fuertemente del proceso químico.

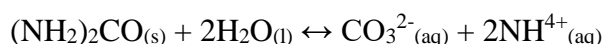
### **1.3.9 Incorporación controlada de cationes y aniones [52]**

Una incorporación controlada de aniones facilita la obtención de una distribución precisa de tamaños. Por ejemplo, se puede crear una distribución bimodal de tamaños monitoreando la apariencia de dos conjuntos de núcleos a diferentes instantes.

Un resultado similar se puede alcanzar controlando la incorporación de cationes. El ión actúa como reservorio de complejos quelatos. El agua es un reservorio de OH mientras que la urea, un reservorio de  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{NH}_4^+$ . La incorporación de especies deseadas de un reservorio puede ser alcanzada por reacciones químicas, adición de un reactivo,



modificación de pH o la temperatura. Por ejemplo, se muestra la adición de iones por la descomposición térmica de la úrea.



### 1.3.10 Modificación de la temperatura [52]

Según Matijevic, en la síntesis se puede variar la temperatura para cambiar la saturación. Al inicio, el sistema puede ser colocado a una temperatura  $T_1$  tal que la concentración del soluto  $C$  esté por encima de la concentración de saturación 1 ( $C_{S1}$ ) pero debajo de  $C_{\min 1}^{nu}$  para la nucleación a esta temperatura. A continuación, la temperatura de sistema puede ser disminuida a  $T_2$ , tal que  $C$  esté por encima de la nueva concentración de supersaturación  $C_{\min 2}^{nu}$  de modo que las partículas puedan nuclear. Cuando se ha alcanzado el número deseado de núcleos, la temperatura puede volver a incrementarse a  $T_1$  de modo que pare la nucleación y acelere el proceso de crecimiento.

### 1.3.11 Crecimiento cristalino

En 1992 la Unión Internacional de Cristalografía (IUCr) definió los cristales respecto a su orden discreto de difracción, es decir, sobre sus arreglos largos permitiendo así la inclusión de los materiales policristalinos y quasicristalinos. Los materiales cristalinos rara vez se encuentran en la naturaleza, incluso bajo estrictas condiciones en un laboratorio debido a la inclusión de impurezas y defectos de límite de grano [54].

#### ➤ *Celda unitaria*

Es la mínima repetición unitaria de un material cristalino. Su simetría influencia enormemente la morfología del cristal y siempre es un paralelepípedo de tamaño y ángulos definidos. Los cristales resultantes poseen a menudo hábitos cristalinos de poliedros con superficies lisas y ángulos fijos [55].

La superficie del cristal dominante depende de la velocidad relativa de crecimiento de sus diferentes fases. Las fases de crecimiento lento serán las finales al término del periodo de crecimiento. Las fases de crecimiento rápido con alta energía de superficie serán, eliminadas.

Diferentes aditivos o parámetros físicos influyen la velocidad de crecimiento de las fases que indirectamente influyen en la morfología, exomorfismo.

En el proceso de crecimiento los átomos, moléculas o iones son ordenados sobre la superficie de la estructura del cristal, por tanto, formando bloques que se pueden acomodar en diferentes posiciones. El modelo Kossel-Stranski, ver figura N°10, muestra el arreglo de los bloques acomodándose en los pliegues o sobre un escalón que son los energéticamente preferidos [56]. Las fases del cristal pueden ser ensambladas capa por capa formando estructuras planas al final del proceso.

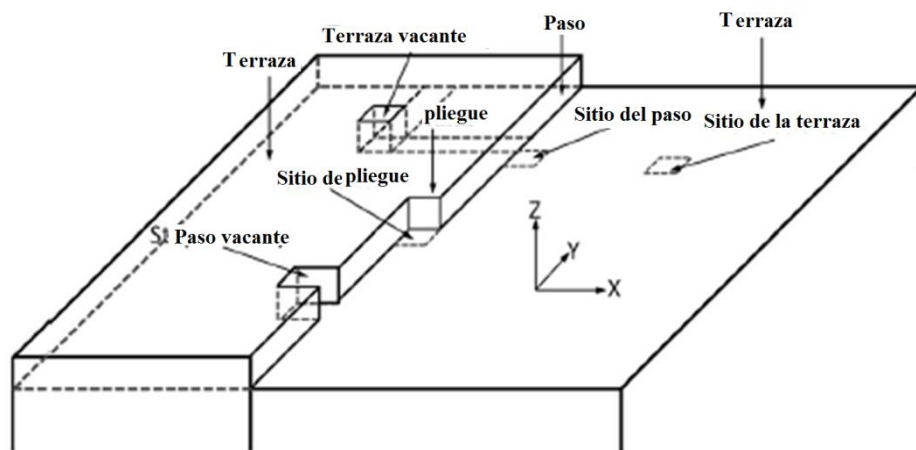


Figura N°10. Esquema de la superficie descrita por el modelo de Kossel-Stranski "terrazza-escalón-pliegue". Adaptado [57]

#### 1.4 Vías de crecimiento no clásicas

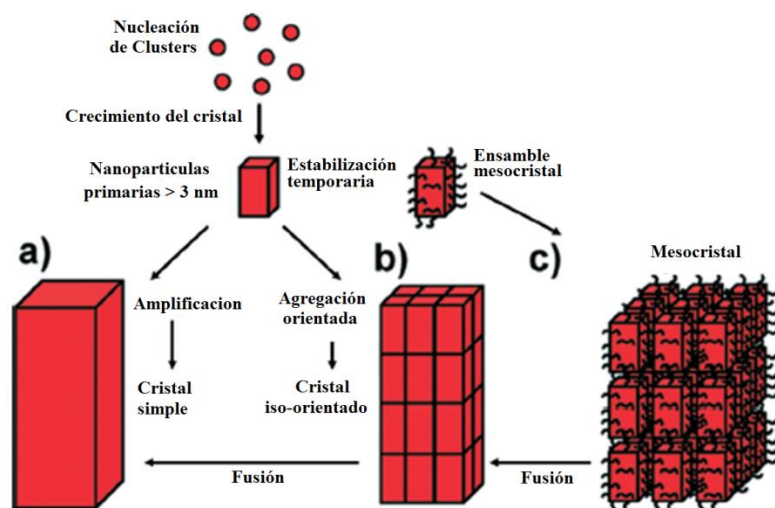
Son vías alternativas por la cual los materiales cristalinos no se forman con la nucleación y crecimiento de cristales a través de átomos, moléculas o iones sino a través de la agregación mediada de partículas o proceso de autoensamblaje [58].

Ambas vías inician con la formación de partículas inducidas por la supersaturación formando bloques de construcción y a partir de esa variedad de bloques es que pueden llegar a ser largos. Este procedimiento también puede ser usado para la formación de bloques de construcción para estructuras amorfas y estructuras líquidas [59].

Han sido identificados diferentes pasos dentro de la cristalización no clásica que son ilustrados en la figura N°11

- Formación de bloques primarios de construcción como clústeres intermediarios o como *fase de separación* en el caso de los precursores líquidos.
- La transformación mesoscópica de superestructuras que han sido formadas por bloques de construcción amorfas.

- La orientación de la nanopartículas.
- La formación de mesocristales de tres dimensiones vía el autoensamblaje de nanopartículas inorgánicas/orgánicas.



**Figura N°11.** Representación esquemática de la cristalización clásica y no clásica. (a) la cristalización vía clásica, (b) Acoplamiento orientado de nanopartículas primarias que forman un cristal iso-orientado tras la fusión, (c) formación del mesocrystal a través del auto-ensamblaje de nanopartículas primarias cubierta de especies. Adaptado [60]

#### 1.4.1 Terminación del crecimiento [1]

Un fenómeno importante es la terminación del crecimiento para un tamaño de partícula dado. Los aniones tienen un efecto no sólo en la estructura y forma de las partículas, sino también en su tamaño. Por ejemplo, el tamaño del polvo esférico de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  es una función de la proporción de iones  $\text{SO}_4^{2-}$  respecto de los iones  $\text{Al}^{3+}$  en la solución. En el caso de partículas  $\text{CdS}$  y  $\text{MnO}_2$ , el crecimiento se detiene en un tamaño final muy preciso, el cual depende de los parámetros de fabricación (concentración de iones, pH, solventes). Con alcóxidos, la cantidad de agua necesaria para la hidrólisis es también un parámetro importante, el cual determina el tamaño final de las partículas. Un exceso de agua generalmente ocasiona la producción de polvos más finos, una posible explicación puede ser las diferentes cinéticas del hidrólisis para diferentes ligandos.

#### 1.5 Especie fúngica: *Cladosporium herbarum*

Existen muchas infecciones fúngicas perniciosas causadas por el grupo de hongos dematiaceae, uno de ellos el *Cladosporium spp.* Estas infecciones son ampliamente distribuidas por el aire, materia orgánica, alimentos contaminantes. Algunas especies

están presentes en los trópicos y subtropicos siendo los animales, plantas y árboles fuentes de alimento para este hongo [61].

### 1.5.1 Clasificación de *Cladosporium herbarum* spp [61]

No se caracterizan por la fase sexual de multiplicación y, por lo tanto, pertenecen al grupo *fungi imperfecti*. Este género comprende más de 30 especies. *Cladosporium elatum*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides*.

Según las características generales, los hongos de este género se clasifican en el grupo de Dermatiaceae, que contienen melanina en la pared celular de conidios y/o hifas, lo que da un color característico que va desde el color gris oliva hasta el negro.

### 1.5.2 Características microscópicas de la morfología

Microscópicamente presenta hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides o cilíndricos, algunos con forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos. Los conidios se forman por gemación sucesiva del conidio anterior, estando el conidio más joven y pequeño al final de la cadena [62], ver figura N°12.

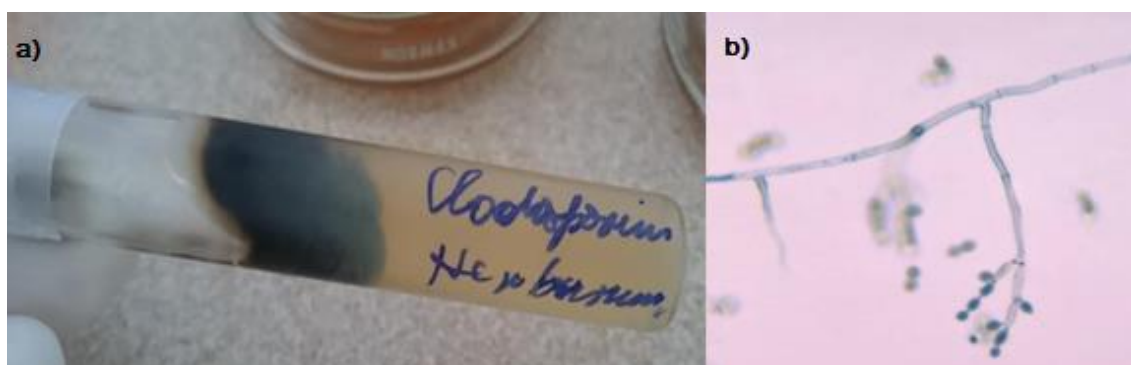


Figura N°12. *Cladosporium herbarum* usado en el proyecto; a) escala macro, b) escala micro [63]

### 1.5.3 Cultivo [61]

Crecen rápidamente en medios (Sabouraud-agar) formando oscuros pigmentos. El micelio vegetativo suele ser de color oscuro, las colonias se forman después de cinco días. La identificación y la diferenciación de especies es posible después del cultivo en agar a la temperatura de 25 °C, a esa temperatura inicia también su reproducción.

La evaluación de su crecimiento y resistencia a un material fungicida, será evaluado en el presente, ver apartado 4.4.2.

### **1.5.3 Patogenicidad y toxicidad [61]**

Son frecuentes y bien conocidos los aeroalergenos que habitan en las plantas, madera y objetos de cuero. Los conidios (esporas) se propagan fácilmente a lo largo de las vías respiratorias, causando reacciones alérgicas en la mucosa del tracto respiratorio, asma seguido de edema y broncoespasmos en la fase aguda. El asma, puede desarrollar enfisema pulmonar.

Los pacientes en diálisis peritoneal presentan un alto riesgo para desarrollar peritonitis por este tipo de hongo filamentoso.

Recientes investigaciones indican que este hongo, además de causar reacciones alérgicas, también puede causar infecciones fúngicas en las vías respiratorias. Se estudió un caso con lesión intrabronial causada por un paciente no asmático.

Como se ha descrito extensamente en todo el marco teórico, el óxido de cobre ha sido ampliamente investigado, sin embargo, sigue siendo de interés su estudio debido a sus propiedades (antimicrobianas, por ejemplo). Uno de los métodos de síntesis donde se tiene mayor control del tamaño y morfología es la basada en soluciones, solución precursora del metal. La técnica de sol-gel trabaja en base al método en solución y permite el control de procesos de nucleación y crecimiento que influyen directamente en el tamaño del material. Como se ha mencionado también, la especie fúngica *Cladosporium herbarum* es muy común en las plantas y permite un fácil manejo en medios agarizados.

## 2. HIPÓTESIS

Al sintetizar nanopartículas de óxido de cobre (II), a través del método en solución, utilizaremos una variación de la técnica sol-gel para la formación de nps de CuO, ya que, se tiene un mejor control de los procesos de nucleación y crecimiento obteniendo partículas más pequeñas en relación a las síntesis convencionales de este óxido. Además, debido al uso de la urea como promovedor de las especies hidróxido, las condiciones fáciles de alcanzar de la síntesis y los equipos de uso común en el laboratorio obtendremos una síntesis sencilla y de bajo costo económico.

El menor tamaño de las nanopartículas de CuO aumentará la actividad antimicrobiana del CuO, ya descrita en investigaciones previas, permitiendo mejorar su rol como fungicida y a su vez disminuir las concentraciones de cobre liberadas al medio ambiente. Se utilizará la especie fúngica *Cladosporium herbarum* debido a su frecuente presencia en nuestro medio (maderas), permitiéndonos estudiar la actividad fungicida de las partículas sintetizadas con respecto a la de un antibiótico de uso común en el mercado.

### 3. OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo General

Síntesis de nanopartículas de CuO a través de la variación del método sol- gel.  
Caracterización de las nanopartículas de CuO y estudio de su actividad fungicida.

#### 2.2 Objetivos Específicos

- Estudio de los parámetros para el desarrollo de la síntesis de nanopartículas de CuO a través del método Sol-Gel.
- Caracterización de las nanopartículas de CuO usando técnicas de Dynamic Light Scattering, FTIR, Raman, DRX, SEM, EDS y BET.
- Estudio de la actividad oxidante de las partículas a través del test Pro-Oxidante por la técnica de espectrometría de fluorescencia.
- Evaluación de las nanopartículas de CuO como agentes fungicidas en la especie fúngica *Cladosporium herbarum*. Comparación de su actividad fungicida con un antibiótico de uso comercial.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Síntesis de las nanopartículas de CuO

#### 4.1.1 Reactivos y solventes

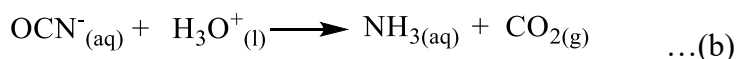
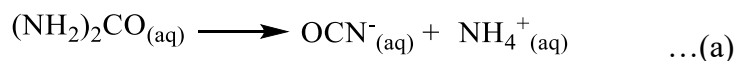
Tabla N°3. Reactivos y solventes

| <i>Reactivo</i>     | <i>Procedencia</i>           | <i>Grado</i> |
|---------------------|------------------------------|--------------|
| Acetato de cobre II | Merck                        | 99%          |
| Acetona             | Merck                        | Analítico    |
| Ácido oleico        | Codex ERBA                   | 97%          |
| Agua desionizada    | Purelab Classic.<br>Labwater | Ultra-pura   |
| Alcohol etílico     | Merck                        | Analítico    |
| Benceno             | Merck                        | Analítico    |
| Metanol             | Merck                        | Analítico    |
| 2-propanol          | Sigma-Aldrich                | Analítico    |
| Urea                | Scharlau                     | 99.5%        |

#### 4.1.2 Síntesis de las nps de CuO

La síntesis se realizó en medio acuoso básico generado por la descomposición térmica de la úrea, hidrólisis forzada. En la reacción, en un inicio se forman los iones cianato y amonio (a) y a continuación el  $\text{OCN}^-$  reacciona formando amonio y  $\text{CO}_2$  (b). A partir del equilibrio del amoniaco se generan las especies hidroxilo (c).

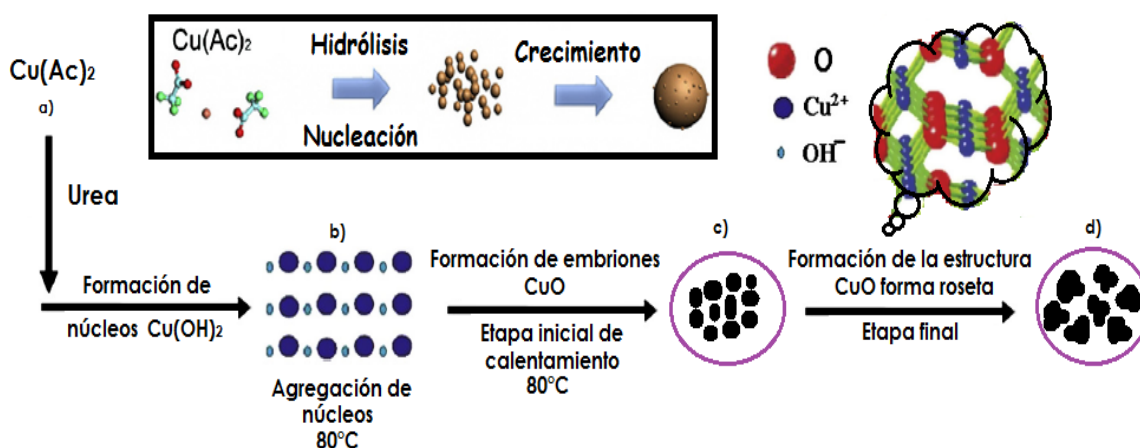
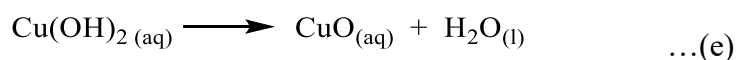
➤ *Reacción de descomposición de la úrea en medio acuoso [64]*



La síntesis de las nps de CuO fue realizada de acuerdo a la metodología descrita en el artículo de síntesis de nps de CuO a partir de sales análogas usando la urea para generar el medio básico según lo publicado por Jia W y Reitz E. [65], en un inicio formando el hidróxido de cobre (d) y terminando con la formación del óxido respectivo (e) como se



muestra en las reacciones a continuación. En la figura N°12 se muestra el proceso de formación de las nps de CuO.



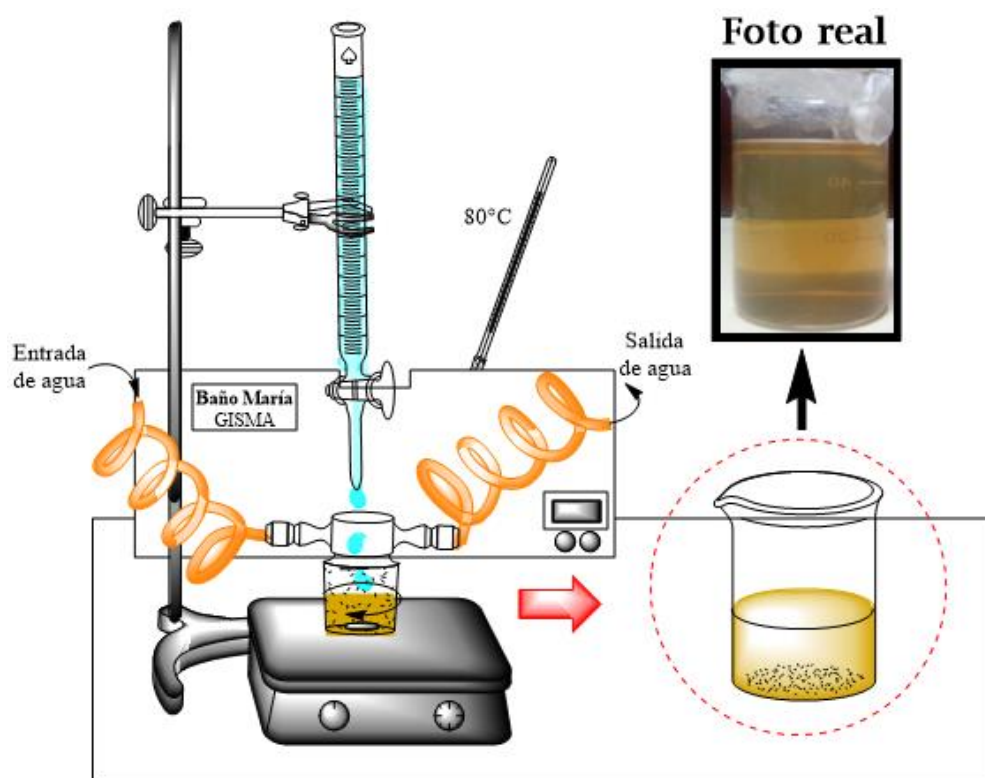
*Figura N°12. Proceso de formación de las nps de CuO a partir de Cu(Ac)<sub>2</sub> y úrea. Adaptado [66-67].*

En un vaso de doble fondo “chaqueta” fluye el agua caliente a 80°C, envolviendo la superficie del vaso (como una chaqueta). En el vaso es colocada la solución de urea 8 mM por 15 minutos. La solución de acetato de cobre (CuAc)<sub>2</sub> 5 mM es adicionada por goteo continuo de ~ 2 gotas/3 s a la solución de urea en agitación constante. Al finalizar el goteo, la chaqueta es cubierta con una luna de reloj y es dejada en agitación y a 80°C por 40 minutos notándose el cambio de coloración de la solución a marrón. Se dejó en reposo el sol formado por 1 h para su envejecimiento, ver figura N°13. Posteriormente se centrifuga el sol a 10000 rpm y se decanta la solución remanente y comienza la etapa del lavado. Para el lavado se usó agua ultrapura y el equipo de ultrasonido para enjuagar y dispersar respectivamente las nps de los reactivos sin reaccionar, se repitió este proceso por 5 veces.

En la tabla N°4 se presentan las condiciones experimentales de la síntesis de las nps de CuO.

**Tabla N°4. Procedimiento experimental de síntesis de las nps de CuO**

|   |  |
|---|--|
| 1° Descomposición térmica de la urea, formación del medio básico.<br>CuAc <sub>2</sub> (5 mM)/Urea (8 mM). T=80 °, 15 min.          | 4° Formación de sol de las nanopartículas de CuO.  |
| 2° Adición por goteo lento de la solución precursora de Cu <sup>2+</sup> . Tiempo total de goteo 15 minutos en agitación constante. | 5° Envejecimiento. Estabilización del sol por 60 minutos.                                |
| 3° Formación de las especies hidroxio, condensación y finalmente centros de nucleación.   | 6° Lavado, vibración ultrasónica y centrifugación a 10000rpm del sol con agua ultrapura. |
| 7° Secado de las nps de CuO a 80 °C en la estufa.   |  |



**Figura N°13. Montaje experimental de la síntesis de las nps de CuO**

## 4.2 Solubilidad de las nps de CuO

Las pruebas de solubilidad de las nps de CuO fueron determinados con varios solventes de uso habitual en los laboratorios.

El mejor solvente fue usado en la disolución de las nps para las pruebas de actividad fungicida. En la tabla N°5 son mostrados los resultados positivos y negativos de la solubilidad con los diferentes solventes.

*Tabla N°5. Pruebas de solubilidad de las nps de CuO (1 mg/1 mL)*

| <i>Solventes</i> | <i>Agitación</i> | <i>Solubilidad</i> |
|------------------|------------------|--------------------|
| Acetona          | Moderada         | Alta               |
| Ácido oleico     | Fuerte           | Ninguna            |
| Alcohol etílico  | Fuerte           | Ninguna            |
| Benceno          | Moderada         | Alta               |
| n-hexano         | Moderada         | Alta               |
| Metanol          | Fuerte           | Ninguna            |
| 2-propanol       | Moderada         | Baja               |

### **4.3 Caracterización de las nanopartículas de CuO**

#### **4.3.1 Dynamic Light Scattering (DLS)**

La distribución del tamaño de las nps de CuO para el estudio de las condiciones de síntesis, en función al menor diámetro hidrodinámico, fueron obtenidos por el método DLS usando un Brookhaven 90Plus equipado con un láser de 35mW, 658nm, Brookhaven Instruments USA en la Facultad de Ciencias de la UNI.

#### **4.3.2 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)**

El espectro FTIR fue obtenido en la Facultad de Ciencias de la UNI con un equipo IRPrestige-21 SHIMADZU equipado con un detector DLATGS y componentes ópticos de KBr. Los espectros fueron obtenidos en KBr con una resolución fue de  $4\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.3.3 Espectroscopía Raman**

El espectro fue obtenido en el Laboratorio de electroquímica de la Facultad de Ciencias de la UNI a temperatura ambiente con un espectrómetro Horiba Xplora Confocal Micro-Raman, con una láser fuente diodo de 638 nm de longitud de onda, una potencia aplicada de 9 mW y un rango de 90 a  $1000\text{cm}^{-1}$  con una resolución espectral de  $3\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.3.4 Difracción de Rayos X (DRX)

El difractograma obtenido de las nps de CuO fueron obtenidos a partir de un Difractómetro de rayos X de polvo RIGAKU, modelo Ultima +. El análisis fue realizado en el Instituto de Química de la Universidad de São Paulo (IQ-USP). Las condiciones de las medidas fueron 30kV, 15mA, 15s por punto, paso angular de 0.01 grado y una fuente de rayos X  $\text{CuK}\alpha_1$ .

#### 4.3.5 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Las imágenes por microscopía electrónica de barrido fueron realizadas en la Central Analítica del IQ-USP, utilizando un equipamiento Jeol JSM-7401 F *Field Emission Gun Scanning Electron Microscope* (FEG-SEM) usando un detector LEI (*Lower secondary electron Image*), el voltaje de aceleración fue 1.0kV y la distancia de trabajo varió de 7.7-8.1mm.

#### 4.3.6 Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS)

El espectro EDS fue realizado en la Facultad de Ciencias de la UNI con el equipo Oxford Instruments con detector de deriva de Silicio, SDD - X - MaxN unido a FE – SEM con un rango de detección de tamaño para microanálisis de 20  $\mu\text{m}^2$ . El espectro fue obtenido con el software AZtec V.2.1.

#### 4.3.7 Área superficial específica BET

Para la medición de la superficie específica se usó el equipo Micromeritics GEMINI-VII serie T del laboratorio de Investigación de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional de Ingeniería. Se utilizó  $\text{N}_2$  como gas de análisis (99% LINDE) y nitrógeno líquido como refrigerante para la condensación de  $\text{N}_2$ . El área BET se calculó en el rango de las presiones  $P/P_0$  0.05-0,33 para la adsorción de una monocapa. Los puntos de equilibrio se midieron con el software Gas Micromeritics con un tiempo de equilibrio por punto de 7s. La muestra fue pre-tratada desgasificándola al vacío durante 2 h a 90 °C.

Para calcular el área superficial se usó el método Brunauer-Emmett-Teller (BET) según la ecuación:

$$\frac{P/P_0}{V_a(1 - \frac{P}{P_0})} = \frac{1}{VmC} + \frac{(C - 1)P/P_0}{VmC}$$

Donde  $V_a$  = volumen adsorbido a una presión  $P$ ;  $V_m$  = volumen adsorbido en la monocapa;  $P_o$  = presión saturada del  $N_2$ ;  $C$  = constante relacionada con el calor [68].

#### 4.4 Propiedades de las nps de CuO

##### 4.4.1 Actividad Pro-oxidante de las nps de CuO

La detección de especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por la presencia de cobre es posible a través de la reacción de un conjunto pro-oxidante (peróxido y cobre) con una sonda fluorimétrica de cloruro de dihidrorodamina (DHR). En la forma reducida, la sonda es no fluorescente, mientras que, una serie de sustancias (ERO's,  $O_2$ ) pueden convertirla a su forma oxidada fluorescente, figura N°14. Adaptamos el método, que originalmente fue concebido para la detección de hierro redox-activo, para nuestro estudio [69-70].

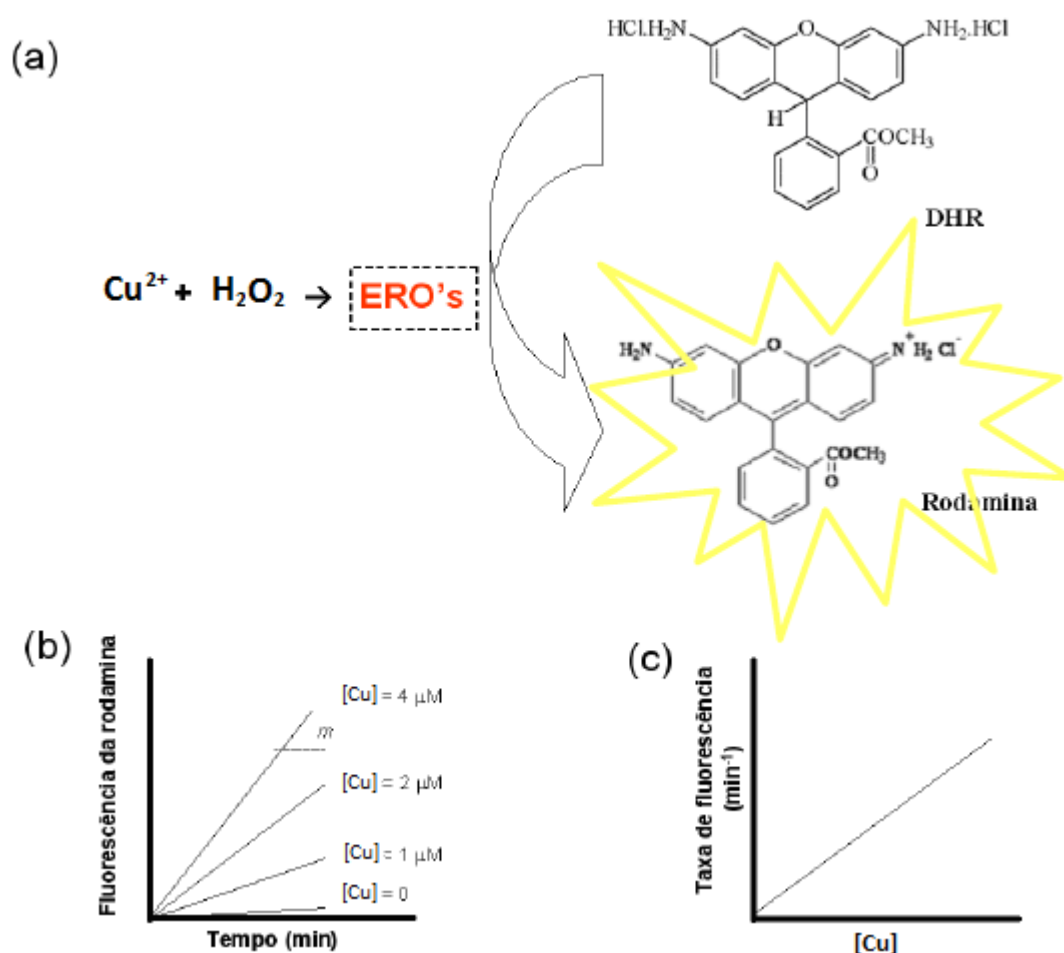


Figura N°14. Principio de funcionamiento del método de detección de especies reactivas formadas por la presencia de cobre. La adición de un prooxidante (peróxido) inicia la producción de ERO's catalizada por el  $Cu^{2+}$  presente en la muestra, convirtiendo la sonda no fluorescente DHR a su forma fluorescente (a). Curvas cinéticas de fluorescencia son obtenidas para diversas concentraciones de Cu; a partir de esas curvas, se determinan sus coeficientes angulares ( $m$ ), que corresponden a la tasa de fluorescencia para una concentración dada de Fe (b). La tasa de fluorescencia es linealmente dependiente de la concentración de Cu, pudiendo ser usada para cuantificar la concentración del metal en la muestra deseada (c) [69].

En una microplaca transparente de 96 pozos se adicionaron alícuotas (10  $\mu\text{L}$ ) de 0 – 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  de nps de CuO y tratadas con 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de agua y finalmente 180  $\mu\text{L}$  de 50  $\text{mmol.L}^{-1}$  de DHR en medio neutral (agua). Como control positivo se usó 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0 – 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) y como control negativo se usó 10  $\mu\text{L}$  de cobre ácido nitrilotriacético (NTA),  $\text{Cu}(\text{NTA})_2$  0 – 1  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Ambos en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Los ensayos fueron realizados por quintuplicado. La fluorescencia fue medida en un BMG FLUOstar Optima, las microplacas fueron leídas por 40 minutos a  $22 \pm 3$  °C ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emis}} = 485/520$  nm). La velocidad de oxidación (fluorescencia/minuto) fue determinada de la pendiente de las curvas cinéticas después del punto  $t = 15$  min [70-71].

#### **4.4.2 Actividad fungicida de las nps de CuO [72]**

La actividad fungicida de las nps de CuO fue evaluada según el protocolo del comité Nacional para estándar con un tipo de hongo de maderas común en la amazonía peruana: *Cladosporium herbarum* que fue donado por el Instituto Nacional de Salud del Perú.

La actividad fungicida fue evaluada con la determinación de la concentración inhibitoria, en la cual las nps impiden el crecimiento visible de un microorganismo en ensayos de sensibilidad por microdilución en caldo.

Se dispersaron las nps de CuO en acetona, ya que se requirió un solvente soluble en medio acuoso (medio), mientras que el Fluconazol (antibiótico) fue disuelto en agua ultrapura. El autoclavado de los medios y material de vidrio fue realizado a 121°C, 1atm por 20 minutos.

##### **4.4.2.1 Replique en tubos con agar inclinado**

Se replicó la especie fúngica en tubos de ensayo con el medio inclinado, Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Este proceso se realizó cerca a la llama del mechero de Bunsen en el interior de la cabina de siembra. El medio fue preparado a partir de 60 g de SDA en 1 L agua ultrapura que se dejó en ebullición hasta su disolución total para luego ser autoclavado. Los tubos sembrados fueron dejados en la estufa a 25°C por 72 horas.

##### **4.4.2.2 Padronización de la carga microbiana**

Luego del crecimiento del hongo, en el tubo se adicionó 9 mL de solución salina (NaCl, 0.85% p/V) con 0.9  $\mu\text{L}$  de tensoactivo (Tween 80, 1% v/v). Se agitó suavemente con la

ayuda de perlas de vidrio de 3 mm para suspender el microorganismo, *suspensión madre* (*sm*), y finalmente se filtra la suspensión para homogenizarla. Se tomó 1 mL de la *sm* para la suspensión filtrada  $10^{-1}$  y de esa forma se inicia la dilución seriada hasta  $10^{-6}$  (1 mL de la suspensión anterior en 9 mL de solución salina).

#### **4.4.2.3 *Conteo, UFC/ mL***

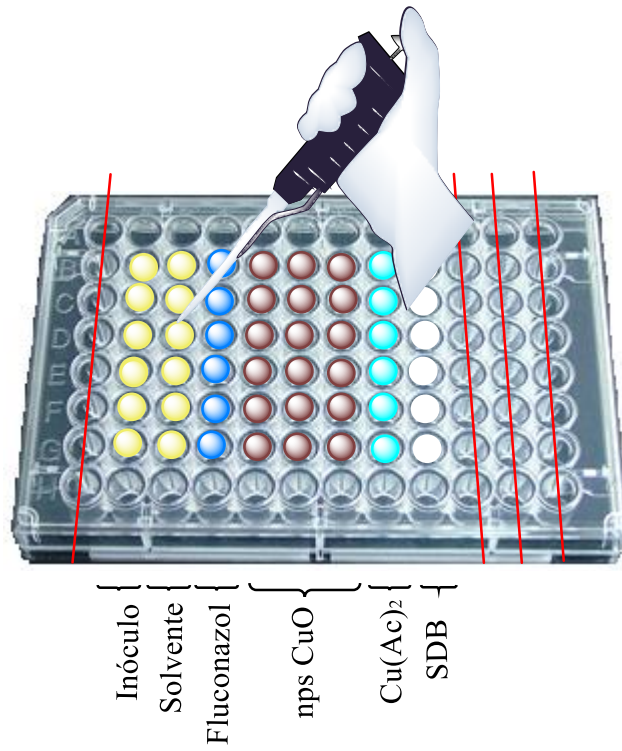
Para la determinación de la Unidades formadoras de colonias (UFC) se plaqueó por duplicado, 1 mL de las suspensiones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en SDA en placas Petri, se homogenizó con movimientos suaves en forma de “8” y finalmente las placas fueron colocadas en la estufa a 25°C por 24 horas. Para el conteo de las UFC/mL de la *sm* se consideró las placas dentro de 30-300 UFC, se calculó la media y se multiplicó por la inversa de la dilución. Se trabajó con 270 UFC/pozo.

#### **4.4.2.4 *Inóculo para las microplacas***

El inóculo fue preparado tomando 1 mL de la suspensión con la carga microbiana deseada en un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de medio preparado con Sabouraud Dextrosa Caldo (SDB). El medio fue preparado a partir de 60 g de SDB en 1 L agua ultrapura que se dejó en ebullición hasta su disolución total para luego ser autoclavado.

#### **4.4.2.5 *Preparación de la microplaca***

Se utilizaron placas estériles de 96 pozos y en cada uno se colocó un volumen total de 200  $\mu$ L. En la columna 2 se colocó 20  $\mu$ L de inóculo y 180  $\mu$ L de SDB; en la columna 3 se colocó 20  $\mu$ L de acetona y 180  $\mu$ L de SDB; en la columna 4 se colocó 20  $\mu$ L de Fluconazol 1000 ppm y 180  $\mu$ L de SDB; en las columnas 5, 6 y 7 se colocaron 20  $\mu$ L de nps de CuO 1000, 500 y 250 ppm respectivamente y 180  $\mu$ L de SDB; en las columnas 8 se colocaron 20  $\mu$ L de Cu(Ac)<sub>2</sub> 1000ppm y 180  $\mu$ L de SDB; finalmente en la columna 9 se colocó 200  $\mu$ L de SDB en cada pozo. La figura N°15 muestra el esquema de la preparación de la microplaca.



*Figura N°15. Esquema de la preparación de la microplaca de 96 pocillos*



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1 Caracterización de las nps de CuO

Las nanopartículas de CuO sintetizadas a partir de la descomposición térmica de la úrea, para generar las especies hidróxido y por calentamiento el óxido respectivo, formaron un sol de coloración marrón. Luego del envejecimiento del sol, las partículas fueron lavadas y secadas en la estufa para su caracterización estructural y su aplicación como se muestra a continuación.

#### 5.1.1 Dynamic Light Scattering (DLS)

Se usó el diámetro hidrodinámico para relacionar este con el tamaño de la partícula. Los histogramas del DLS fueron muy útiles para el estudio y la determinación del diámetro hidrodinámico óptimo, menor tamaño, de las nps sintetizadas.

Para la determinación de la concentración óptima de los precursores, se varió las concentraciones de urea y acetato de cobre (II) manteniendo una de ellas fija.

En la tabla N°6 se presenta los tamaños obtenidos al variar la concentración de la urea en un rango de 1.25 – 20 mM. Se tomaron las muestras al final de la síntesis, luego de 1 hora y 18 horas de envejecimiento. El ensayo se realizó por duplicado y en la tabla N°6 se presenta el promedio aritmético de los diámetros hidrodinámicos.

*Tabla N°6. Diámetro hidrodinámico (d) de las nps variando la concentración de urea*

| $[Cu^{2+}]$ (mM) | $[Urea]$ (mM) | $d_{1h}$ envejecimiento (nm) | $d_{18h}$ envejecimiento (nm) |
|------------------|---------------|------------------------------|-------------------------------|
| 4                | 1.25          | 289.4                        | 321.3                         |
|                  | 2.5           | 448.8                        | 464.3                         |
|                  | 5             | 209.6                        | 264.2                         |
|                  | 10            | 550.7                        | 1197.6                        |
|                  | 15            | 395.7                        | 351.8                         |
|                  | 20            | 336                          | 418.3                         |

De la Tabla N°6 se observa que el menor diámetro hidrodinámico se obtuvo para una concentración de urea de 5 mM con 209.6 y 264.2 nm luego de 1 y 18 horas de envejecimiento del sol respectivamente.

También se estudió el tamaño del diámetro hidrodinámico obtenido al variar la concentración del acetato de cobre (II) en un rango entre 4 – 12 mM manteniendo la

concentración de la urea en 5 mM, ver tabla N°7. Se tomaron las muestras al final de la síntesis, luego de 1 hora (h) y 18 h de envejecimiento del sol. El ensayo se realizó por duplicado y en la tabla N°7 se presenta el promedio aritmético de los diámetros hidrodinámicos.

**Tabla N°7. Diametro hidrodinámico (d) de las nps variando la concentración de Cu<sup>2+</sup>**

| [Urea] (mM) | [Cu <sup>2+</sup> ] (mM) | <i>d</i> <sub>1h envejecimiento</sub> (nm) | <i>d</i> <sub>18h envejecimiento</sub> (nm) | <b>Polidispersidad</b><br>(1 h de envejecimiento) |
|-------------|--------------------------|--|---|---|
| 5           | 4                        | 209.6                                      | 264.2                                       | 0.145   |
|             | 6                        | 534.9                                      | 552.3                                       | 0.071   |
|             | 7                        | 925.9                                      | 280.3                                       | 0.130   |
|             | 8                        | 159.5                                      | 212.6                                       | 0.093   |
|             | 9                        | 1170.6                                     | 275.5                                       | 0.083   |
|             | 10                       | 750.4                                      | No medible                                  | -   |
|             | 12                       | 740.9                                      | No medible                                  | -   |

De la tabla N°7 se observa que el menor diámetro hidrodinámico se obtuvo para una concentración de Cu<sup>2+</sup> de 8 mM con 159.5 y 212.6 nm luego de 1 y 18 horas de envejecimiento del sol respectivamente. En algunos casos no fue posible la medición, luego del envejecimiento por 18 horas, debido al gran aumento de tamaño de las partículas ([Cu<sup>2+</sup>]: 10 y 12 mM).

Sobre el envejecimiento debe mencionarse que las fases sólidas solubles son las primeras que tienden a formarse, mientras las fases solidas son termodinámicamente más estables y son pocos solubles. El envejecimiento depende de la cinética de las reacciones de hidrólisis, condensación y de la naturaleza del anión que modifica las reacciones de cinética de los complejos solubles o actúan como centros de nucleación heterogéneos. Durante este proceso puede desarrollarse mecanismos de disolución-reprecipitación provocando el aumento de tamaño de la nps [73].

Otro parámetro que se estudió en la síntesis fue el pH de la solución precursora de Cu<sup>2+</sup>. Para este fin, se utilizó amoniaco y ácido acético. Se hizo un test preliminar usando NaOH, sin embargo, no se pudo controlar el tamaño de la partícula y para todos los casos se obtuvieron partículas *no medibles*, debido a su gran tamaño.

Estudiar la relación del pH con el tamaño de las nps usando amoníaco y ácido acético se justifica, ya que al ser base y ácido débil respectivamente permite la adición gradual y homogénea de iones hidróxido en toda la solución, evita el aumento violento del pH y así la precipitación del hidróxido de cobre, lo que posibilita tener un control en el proceso de crecimiento [74]. Otra ventaja del uso de estas sustancias es la introducción de los iones amonio y acetato presentes también en la descomposición térmica de la urea y como contraión de la sal precursora (iones no ajenos). En la Tabla N°8 se presenta el diámetro hidrodinámico al variar el pH de la solución de  $\text{Cu}^{2+}$ .

*Tabla N°8. Diámetro hidrodinámico (d) de las nps variando el pH de la solución de  $\text{Cu}^{2+}$*

| <i>[Urea] (mM)</i> | <i>[<math>\text{Cu}^{2+}</math>] (mM)</i> | <i>pH de <math>\text{Cu}^{2+}</math></i> | <i><math>d_{1h}</math> envejecimiento (nm)</i> |
|--------------------|---|--|--|
| 5                  | 8   | 4  | No medible                                     |
|                    |   | 5  | No medible                                     |
|                    |   | 5.6                                      | 159.5  |
|                    |   | 6  | 279.2  |
|                    |   | 7  | 200.7  |

De la Tabla N°8 observamos que se obtiene un menor diámetro hidrodinámico de las nps a un pH = 5,6; obtenido en la disolución de la sal de  $\text{Cu}^{2+}$  en agua ultrapura (pH = 7).

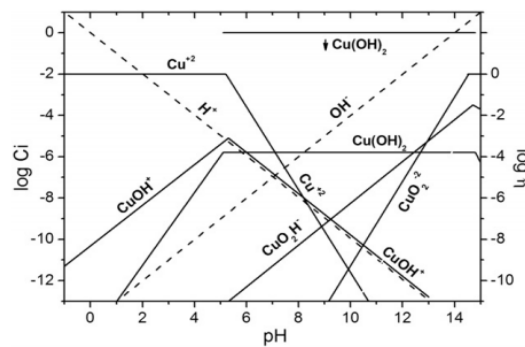
En las tablas N°6, N°7 y N°8 los radios no presentan algún tipo de relación directa, sino aleatoria, en función al aumento de la concentración de la urea,  $\text{Cu}^{2+}$  o pH respectivamente.

La relación urea/ $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{OH}^-/\text{Cu}^{2+}$ ) “óptima” se obtuvo al usar: [urea] = 5 mM y [ $\text{Cu}^{2+}$ ] = 8 mM debido a que a esas concentraciones y pH nos permitió un proceso de crecimiento de la partícula controlada de modo que la obtención de diámetros hidrodinámicos fueron los más pequeños. El tamaño de las nps al variar las concentraciones de urea y  $\text{Cu}^{2+}$  modifican la cantidad de especies capaces de formar diferentes complejos, que terminan condensando en partículas de diferentes tamaños, y como consecuencia modifican también el pH de la solución.

La variación del pH afecta el equilibrio de disociación del complejo, la protonación o la hidroxilación de los grupos iónico liberados en la disolución. Estos cambios se relacionan íntimamente a las estructuras de los agentes complejantes y la interacción de las nps con agua [75]. En ese sentido, la variación de la concentración de especies afecta directamente el potencial zeta, que en medio acuoso se aproxima al potencial superficial. El potencial

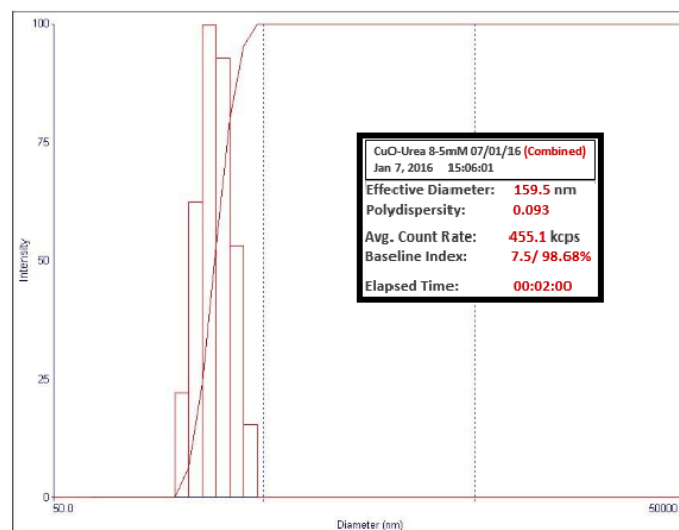
zeta es la medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla [76]. El potencial zeta permite controlar el comportamiento del coloide ya que indica los cambios en el potencial de superficie y las fuerzas de repulsión en el coloide. Un potencial zeta diferente de cero permite la existencia de las nps de menor tamaño, puesto que provoca la repulsión de estas [76].

En la síntesis de nps de CuO, valores altos de pH en la solución provoca una disminución del potencial zeta y un aumento en el tamaño del diámetro hidrodinámico [77]. Por otro lado, valores bajos de pH no permiten la existencia de las especies acomplejantes que terminarán formando el óxido de cobre, es decir, no se formará el hidróxido de cobre. Esto se verifica con la figura N°16, donde se muestra la existencia de las especies de cobre en medio acuoso en función del pH [78].



**Figura N°16. Diagrama de equilibrio de fase Cu – H<sub>2</sub>O [3]**

En la figura N°17 se presenta la distribución del tamaño de la partícula y la distribución de familias de partículas con el mismo diámetro obtenidas a las condiciones óptimas ([Urea] = 5 mM, [Cu<sup>2+</sup>] = 8 mM, pH = 5,7).



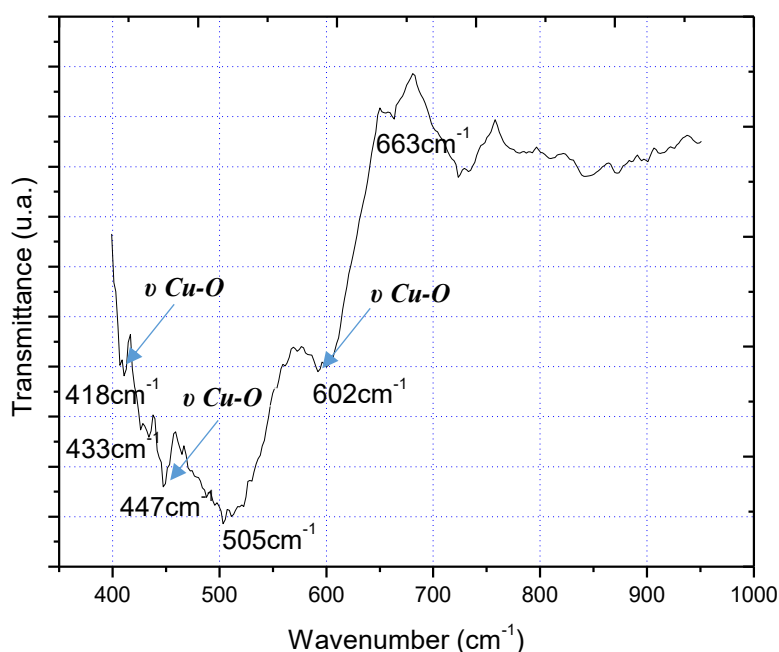
**Figura N°17. Intensidad basada en la distribución del tamaño de las nps de CuO obtenido por DLS**

Como se observa en la figura N°17 se tiene un diámetro hidrodinámico de 159,5 nm. Este valor es mayor al obtenido por SEM (ver apartado 4.1.5), como era de esperar, debido a capas del disolvente que interacciona con la nanopartícula [77]. Por otro lado, se observa la presencia de varias familias de partículas con un mismo diámetro hidrodinámico, representadas por las columnas, confirmando la buena dispersión de las partículas en el medio [77].

Otra característica importante a notar en la Figura N°17 es la polidispersidad con un valor de 0.093, esto confirma que las nanopartículas formadas están constituidas por familias de tamaños con valores cercanos entre sí. Esto sugiere un buen grado de homogeneidad para las nps sintetizadas, esta afirmación es comprobada con las fotografías por SEM (ver apartado 4.1.5).

### 5.1.2 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Las nps de CuO presentaron un espectro en la región de infrarrojo en KBr con lo que se determinaron los grupos funcionales presentes, ver figura N°18.



*Figura N°18. Espectro de infrarrojo en KBr de las nanopartículas de CuO*

Las principales bandas son listadas en la tabla N°9, seguidas de las atribuciones sugeridas.

**Tabla N°9. Atribución de las bandas de infrarrojo.  $\nu$ : estiramiento,  $\delta$ : deformación**

| <b>Banda</b>                    | <b>Valor en <math>cm^{-1}</math></b> | <b>Referencia</b> |
|---------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| $\nu$ Cu-O monoclínico          | 418                                  | [79]              |
| $\nu$ Cu-O dirección [101]      | 433, 505                             | [79-80]           |
| $\nu$ Cu-O monoclínico          | 447                                  | [81]              |
| $\nu$ Cu-O monoclínico          | 529                                  | [82]              |
| $\nu$ Cu-O dirección [101]      | 602                                  | [83]              |
| $\delta_{\text{simétrico}}$ OCO | 663                                  | [84]              |
| $\delta$ Cu-O-Cu                | 706-912                              | [85]              |

De acuerdo a la tabla N°9, se observan las bandas de vibración de estiramiento Cu-O (418, 433, 505, 447, 529, 602  $cm^{-1}$ ) para el sistema monoclínico del CuO y las bandas de los picos de deformación característica Cu-O-Cu (706 – 912  $cm^{-1}$ ). Este conjunto de picos nos confirma la presencia del CuO (II) con un, mayoritario, sistema cristalino monoclínico.

En la tabla N°9 también se observa una leve banda característica de deformación simétrica de O-C-O (663  $cm^{-1}$ ). Esto indica que el anión acetato está aún presente en las nps del óxido, a pesar de las continuas lavadas realizadas, formando parte de su estructura.

Además, la figura N°18 no presenta modo activo en IR para el rango entre 605 - 660  $cm^{-1}$ , lo que en definitiva deja fuera la existencia de otra fase, como por ejemplo el Cu<sub>2</sub>O [83].

### **5.1.3 Espectroscopía Raman**

Se determinó el espectro Raman de las nps de CuO que hace posible determinar los grupos funcionales presentes en frecuencias menores, ver figura N°19.

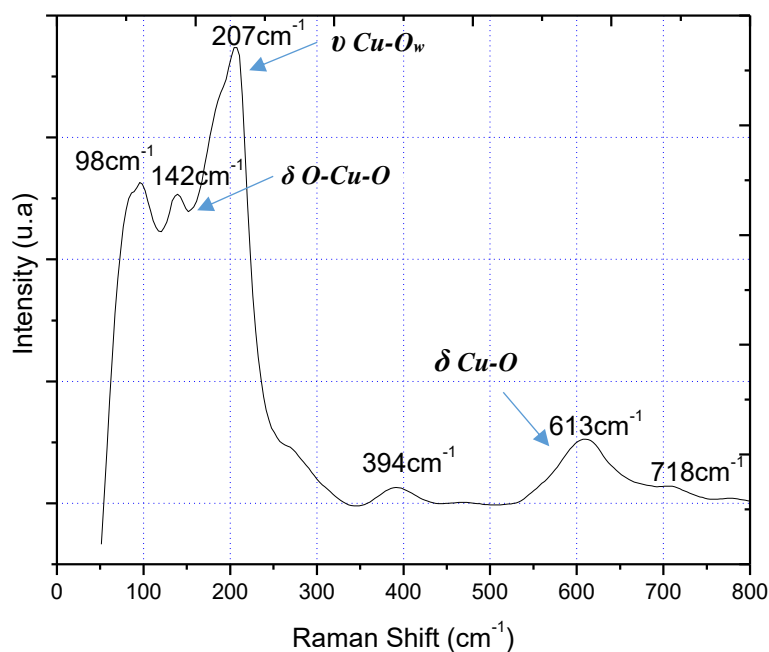


Figura N°19. Espectro Raman de las nanopartículas de CuO

Las principales bandas son listadas en la tabla N°10.

Tabla N°10. Atribución de las bandas de infrarrojo.  $\nu$ : estiramiento,  $\delta$ : deformación,  $\rho$ : balanceo

| Banda                                 | Valor en $\text{cm}^{-1}$ | Referencia |
|---------------------------------------|---------------------------|------------|
| $\delta$ (Cu-Cu-O)                    | 89.2                      | [86]       |
| $\delta$ (Cu-Cu-O <sub>w</sub> )      | 98.6                      | [86]       |
| $\delta$ (O-Cu-O) <sub>ring def</sub> | 142.4                     | [86]       |
| $\delta$ (O-Cu-O)                     | 185.9m                    | [86]       |
| $\delta$ (O-Cu-O)                     | 207.7m                    | [86]       |
| $\nu$ (Cu-O <sub>w</sub> )            | 272.4                     | [86]       |
| $\rho$ (COH) ligando heterocíclico    | 394                       | [86]       |
| $\delta$ (Cu-O)                       | 613.6                     | [87]       |
| $\delta$ (OCO)                        | 718.8                     | [88]       |

*O<sub>w</sub>*: indica que el átomo de oxígeno proviene del agua

De acuerdo a la tabla N°10, se observan dos bandas de vibración de deformación para los átomos de Cu-Cu-O y Cu-Cu-O<sub>w</sub> (89.2 y 98.6  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente) donde se confirma la presencia de los enlaces metal-metal, además, que el cobre está enlazado a un átomo de oxígeno proveniente del agua probablemente para los átomos de Cu superficiales. Esta

característica también se confirma en la vibración de estiramiento para el Cu-O<sub>w</sub> a 272.4 cm<sup>-1</sup>.

El espectro muestra también un conjunto de picos de deformación para los átomos de O-Cu-O a 142,4; 185,9 y 207.7 cm<sup>-1</sup>; estos dos últimos picos se presentan solapados y tienen una intensidad alta característica de este óxido. El pico O-Cu-O *ring* a 142,4 cm<sup>-1</sup> hace referencia a la medición de esta vibración en presencia de una vecindad proveniente de la red cristalina en la que se encuentran los átomos. Otro pico característico, activo solo en Raman, se debe a la deformación del enlace Cu-O de intensidad media también se presenta a 613,6 cm<sup>-1</sup> [87].

Al igual que en el espectro de IR, el espectro Raman muestra la presencia de la vibración de balanceo del ligando heterocíclico, probablemente enlazado al oxígeno, COH a 394 cm<sup>-1</sup> y la vibración de deformación del OCO a 718,8 cm<sup>-1</sup>. Estas vibraciones Raman, dejan en evidencia, nuevamente, la presencia del anión acetato presente en la estructura final del óxido de cobre.

#### 5.1.4 Difracción de Rayos X (DRX)

Se examinó la cristalinidad de las nps de CuO y su fase cristalina por DRX, como se muestra en la figura N°20.

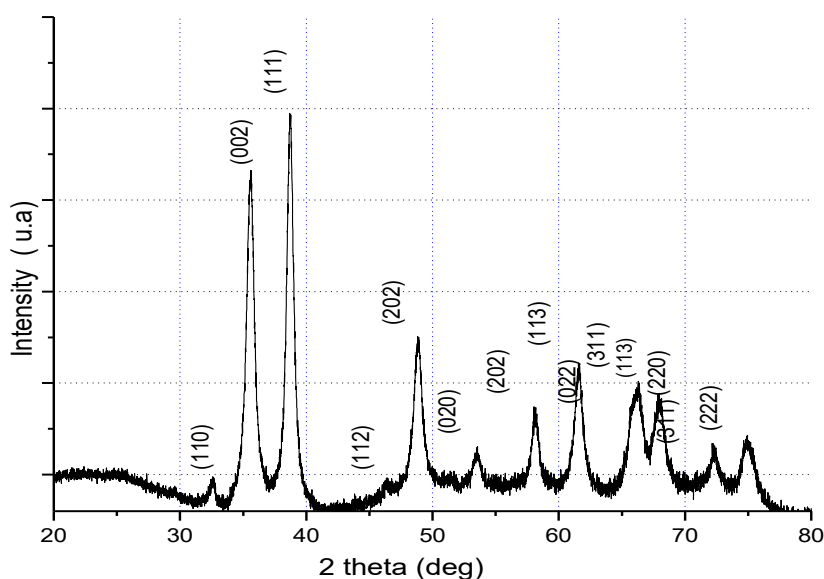


Figura N°20. Patrón de Difracción de Rayos X para las nanopartículas de CuO. (\*) indica la posición del patrón de CuO, tarjeta 45-0937 JCPDS, para la difracción en fase monoclinica.



La figura N°20 muestra que los todos los picos de Difracción de Rayos X de las nps de CuO son los mismos para el CuO *bulk*, ya que, son consistentes con los reportados en la literatura y con la respectiva tarjeta N° 45-0937 del Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) [87].

Este DRX confirma la presencia del CuO y que su crecimiento ha seguido una estructura monoclinica de *tenorita* con grupos espaciales *C2/c*. Por otro lado, no hay presencia de picos de Difracción de Rayos X correspondientes a impurezas de Cu(OH)<sub>2</sub> y Cu<sub>2</sub>O lo que nos da idea de la alta eficiencia de la síntesis [82].

Es importante mencionar un incremento en el ancho de los picos y una disminución de intensidad de los mismos respecto a espectros de DRX de partículas mayores óxido de CuO. Esta característica indica una disminución del tamaño de partícula, así como una pérdida de la cristalinidad del óxido, como era de esperar [89].

El tamaño de cristalito o grano (*D*) fue determinado usando la fórmula Debye-Scherrer's usando el plano cristalográfico (111) [82]:

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta}$$

Donde *k* es el factor de forma (0.90),  $\lambda$  es el número de onda de la radiación CuK $\alpha$ ,  $\beta$  es la mitad del ancho del pico más intenso (FWHM) y  $\theta$  es el ángulo de reflexión. En la tabla N°11 se muestran los parámetros y el tamaño de cristalita.

**Tabla N°11. Cálculo del tamaño de cristalita**

| <b>Parámetros</b>          | <b>D</b>   |
|----------------------------|------------|
| k = 0,90                   | 13,2063 nm |
| $\lambda = 1,5418\text{Å}$ |            |
| $\beta = 0,63812^\circ$    |            |
| $\theta = 19,3641^\circ$   |            |

Fueron calculados también los parámetros de red usando el programa MAUD (Materials Analysis Using Diffraction) v. 2.71 usando el número de tarjeta N° 45-0937 JCPDS. El número de iteraciones fueron 5 para obtener una confiabilidad del 100% de tenorita respecto a la tarjeta. Los parámetros de cristalinidad se presentan en la tabla N°12.

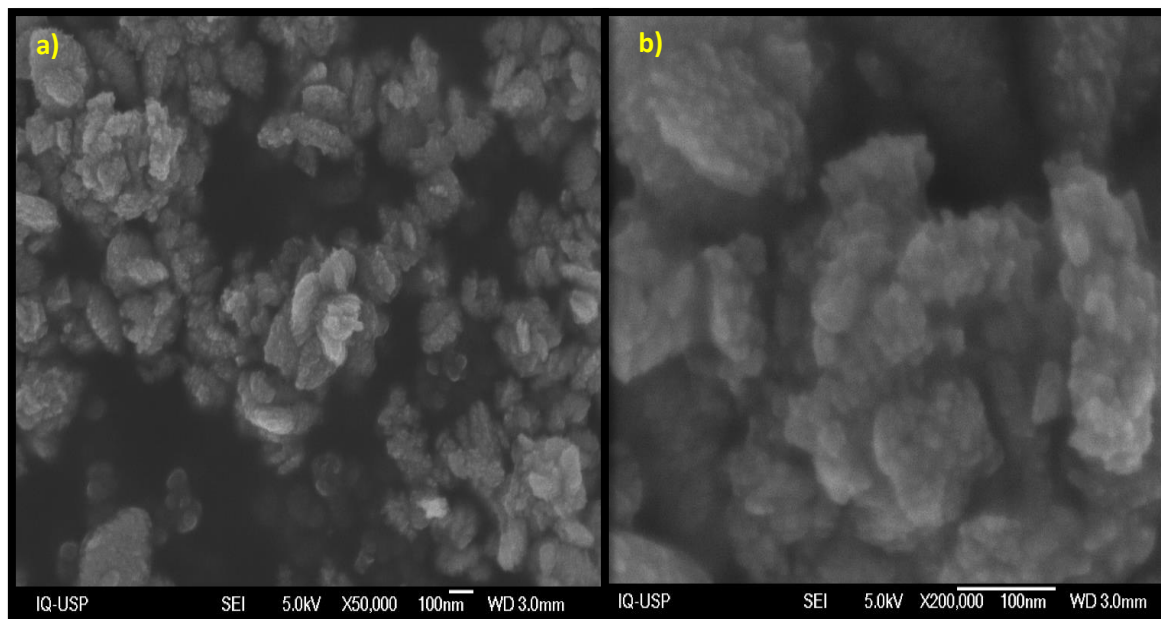
**Tabla N°12. Parámetros de red calculados por MAUD y de la tarjeta JCPDS**

| <b>Parámetros calculados MAUD (nm)</b> | <b>Parámetros N° 45-0937 (nm)</b> |
|--|-----------------------------------|
| a = 0,4691                             | a = 0,4685                        |
| b = 0,3429                             | b = 0,3425                        |
| c = 0,5147                             | c = 0,5130                        |

Como se observa los valores de los parámetros de red son muy cercanos, por tanto, se puede afirmar que se obtuvo un CuO con un crecimiento en forma de tenorita.

### 5.1.5 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Se realizó un estudio de la morfología a través de fotografías por SEM para describir su forma y su tamaño, como se muestra en la Figura N°21.



**Figura N°21. Imágenes SEM de las nps de CuO. a) Magnificación 50000. b) Magnificación 100000**

En la figura N°21a se observa la forma de roseta jerárquica del CuO formada en el proceso de envejecimiento, además, se puede notar que cada *hoja* de la roseta está conformada por partículas menores de forma esférica. En la figura N°21b se observa con mayor facilidad las partículas de forma esférica que conforman las *hojas*. También, se ve claramente que el tamaño de dichas partículas es muy inferior a 100 nm confirmando la escala nanométrica de las partículas.

Se determinó, según la fotografía SEM (figura N°21b), el tamaño promedio de las nanopartículas de forma esférica a través del número de frecuencia de diámetro para cada una. Se utilizaron 100 nanopartículas y se ajustaron las frecuencias de tamaños a la función de Gauss como se muestra en la figura N°22.

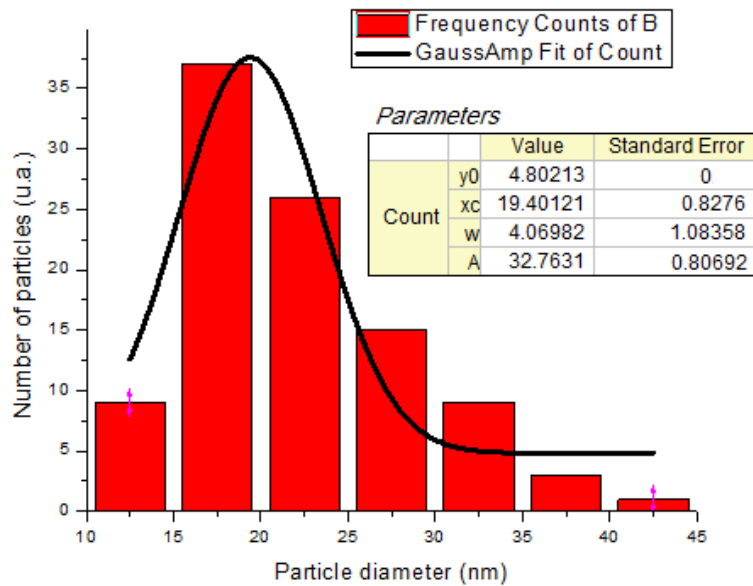


Figura N°22. Distribución de diámetro de nanopartículas de CuO

La figura N°22 presenta la distribución normal gaussiana donde hay familias de tamaños de nanopartículas entre 10 – 45 nm, evidenciando un crecimiento relativamente homogéneo. La distribución gaussiana muestra también el tamaño promedio de las familias de nanopartículas  $19 \pm 4 \text{ nm}$ . Este valor nos indica un tamaño lógico respecto a la cristalita (13 nm) determinada por DRX y mucho menor en comparación con el diámetro hidrodinámico.

### 5.1.6 Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS)

El espectro EDS de las nanopartículas de CuO se muestra en la figura N°23, indicando los componentes de las nps.

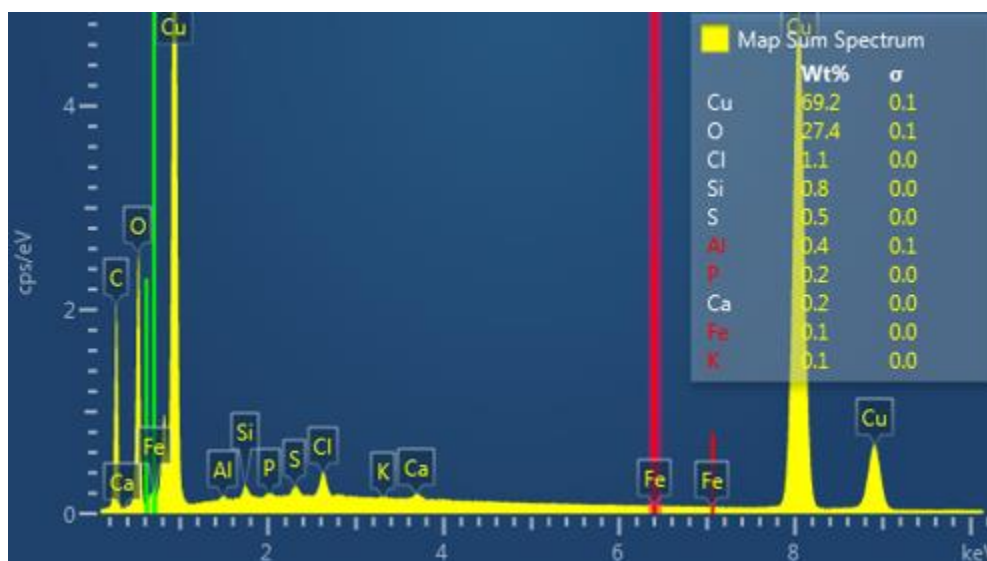


Figura N°23. Espectro EDS para las nps de CuO

Como se observa claramente en la figura N°23, hay presencia de los elementos de oxígeno (intensidad media) y de cobre (alta intensidad). El Cobre presente debe únicamente a la presencia de la especie  $\text{Cu}^{2+}$  demostrada por las técnicas de IR, Raman y XRD.

La figura N°23 también muestra, bajo porcentaje en masa, la presencia de elementos como Cl, Si, S, Al y a nivel de trazas a otros elementos como P, Ca, Fe y K. Es importante mencionar que los reactivos usados en la síntesis tuvieron un porcentaje de pureza de grado analítico, por tanto, hay presencia de otros elementos a nivel de trazas. La presencia de elementos de bajo porcentaje en masa se asume como contaminación en el proceso de secado.

En la tabla N° 13 se muestra la relación de peso teórico y experimental del cobre y oxígeno para el  $\text{CuO}$ , además del porcentaje de error según por EDS.

**Tabla N°13. Porcentajes de masa teóricos y experimentales de Cu y O**

|                  | <i>% Peso experimental</i> | <i>% Peso teórico</i> | <i>Diferencia de %</i> |
|------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------|
| <b><i>Cu</i></b> | 69.2                       | 79.9                  | 10.7                   |
| <b><i>O</i></b>  | 27.4                       | 20.1                  | 7.3                    |

En la tabla N°13 se observa la diferencia en porcentajes del cobre y oxígeno de menor y mayor cantidad respectivamente en comparación a la teórica.

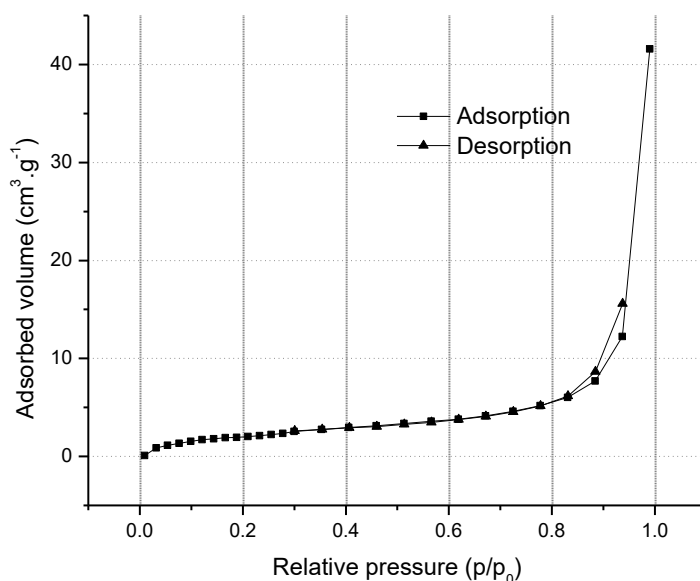
La mayor cantidad de oxígeno (7.3%) presente en la estructura de las nps de  $\text{CuO}$  se debe a la presencia del oxígeno de los grupos acetatos presentes en la estructura, como se puso en evidencia a través de las técnicas de caracterización de IR y Raman.

La menor cantidad de cobre (-10.7%) que la esperada se debe a que los sitios, o vecindades del cobre en la estructura, fueron ocupados por los grupos correspondientes a  $\text{OCO}$  impidiendo la entrada de este. El cobre, que estuvo como excedente en la síntesis, probablemente se quedó en forma de complejos solubles en medio acuoso y fueron descartados en las sucesivas lavadas realizadas a las nps.

Es importante mencionar la presencia del átomo de Carbono en el espectro EDS con una intensidad media. Como se observa en la figura N°23, no hay cuantificación de este elemento debido a que la medición se realizó con el uso de la cinta conductora de carbono, por tanto, la cuantificación final de este elemento no es tomada en cuenta. Sin embargo, la cantidad total de carbono debe sumar la cantidad de carbono de la cinta conductora y la correspondiente a los grupos acetatos.

### 5.1.7 Área superficial específica BET

La adsorción física de moléculas de gas sobre una superficie sólida (nps CuO) nos sirvió para la medición de la superficie específica, usando el método de Brunauer-Emmet-Teller (BET). En la figura N°24 se muestran las isotermas de adsorción y desorción de N<sub>2</sub> para las nps de CuO.



**Figura N°24. Isoterma de adsorción y desorción de nitrógeno para nps de CuO**

En la figura N°24 se muestra la adsorción de nitrógeno y el ciclo de histéresis que aparece a alta presión en la isoterma de las nps de CuO, que es presumiblemente debido al espaciamiento interparticular entre las nps [90]. El ciclo de histéresis es de tipo H1, lo que nos confirmaría una porosidad abierta de forma cilíndrica en la superficie de las nps aglomeradas [91].

En la tabla N°14 se presenta el área superficial y volumen de poro de las nps de CuO.

**Tabla N°14. Área superficial y volumen de poro de las nps y bulk de CuO [92]**

|                 | <i>Volumen de poro<br/>(cm<sup>3</sup>/g)</i> | <i>Área superficial<br/>BET (m<sup>2</sup>/g)</i> |
|-----------------|---|---|
| <i>nps CuO</i>  | 0,07  | 9,76  |
| <i>Bulk CuO</i> | 0,01  | 4,07  |

Como se observa en la tabla N°14, el área superficial de las nps fue mayor en comparación con el bulk de CuO [92] y se mantiene la relación al comparar el volumen de los poros.

El área superficial es menor en comparación con otras nps del mismo óxido, esto se debe al tamaño de las rosetas de aproximadamente 500 nm, en promedio, que terminan formando las nps de CuO luego del proceso de lavado y secado. Por tanto, es coherente obtener un valor de área superficial de las nps de CuO de más del doble del área de las partículas del bulk, que se hallan en escala de micras.

Se determinó la superficie microporosa y la mesoporosa que conforman el área total de la superficie. Para la extrapolación de la recta, se consideró el espesor tangente a la curva *t-plot* para realizar los cálculos. Se determinó, también, el tamaño de poro por el método de Barrett, Joyner y Halenda (BJH) [91]. Todos estos valores son mostrados en la tabla N°15.

*Tabla N°15. Propiedades texturales de las nps de CuO*

|                | $S_{BET}$<br>( $m^2/g$ ) | $S_{micro}$<br>( $m^2/g$ ) | $S_{meso}$<br>( $m^2/g$ ) | Tamaño de poro<br>BJH (nm) |
|----------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| <i>nps CuO</i> | 9,76                     | 1,16                       | 8,60                      | 14,03                      |

Como se observa en la tabla N°15, las rosetas formadas presentan microporos (< 2 nm) y mesoporos (2 – 50 nm) [93], siendo de mayor cantidad los poros de tipo meso. Esto sugiere que se tienen un área superficial aportada básicamente por poros cilíndricos de tamaños entre 2-50 nm.

El tamaño de poro de 14,03 nm corresponde a un tamaño mayor al calculado para la cristalita (13,2 nm), esto sugiere que las superficies de las rosetas presentan una gran porosidad que podría favorecer a la interacción con moléculas a través de adsorción o por reacciones específicas.

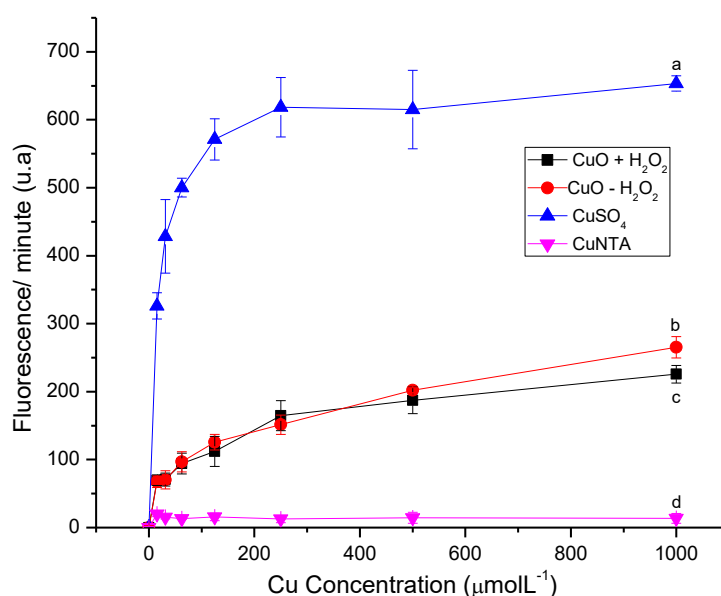
## **5.2 Actividad fúngica de las nps de CuO**

### **5.2.1 Actividad pro-oxidante de las nps de CuO**

Las sondas fluorescentes basadas en rodamina parecen ser particularmente atractivas debido a sus excelentes propiedades espectroscópicas, fluorescencia alta, rendimiento cuántico y alta estabilidad [94]. Para la determinación de especies radicalarias se utilizó una sonda fluorimétrica sensible a la oxidación, dihidrorodamina 123 (DHR). La sonda DHR se convierte de su forma no fluorescente (reducida) a la fluorescente cuando es oxidada (rodamina), de tal manera que la generación de especies reactivas de oxígeno puede ser seguida como un aumento en la fluorescencia del sistema. El peróxido de

hidrógeno es usado como un agente productor de radicales reactivos en presencia del cobre libre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) [95].

Para evaluar la capacidad oxidante de los compuestos en este sistema, utilizamos como control positivo (generación de especies reactivas en presencia de peróxido) el  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y como control negativo  $\text{Cu}(\text{NTA})_2$  [96]. El efecto oxidante de las nps de  $\text{CuO}$  se muestran en la figura N°25.



**Figura N°25. Capacidad oxidante de las nps de  $\text{CuO}$**

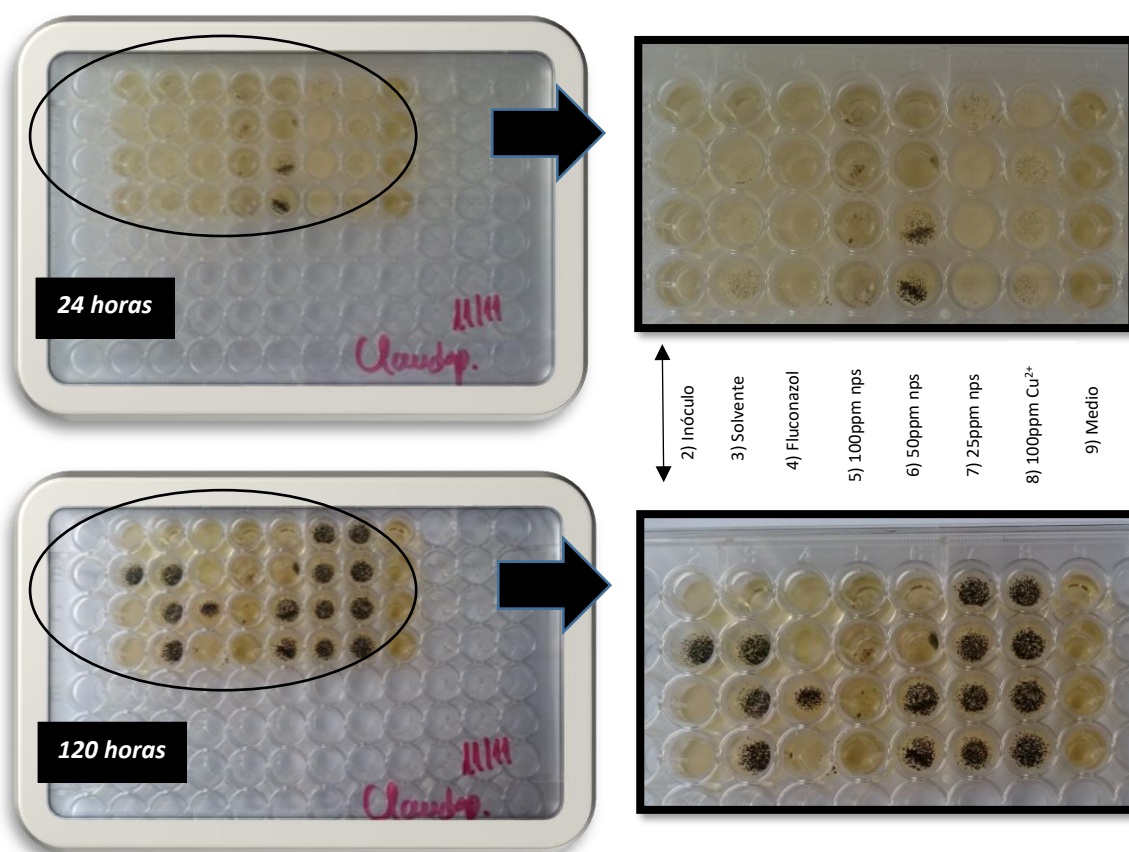
Como se observa en la figura N°25, a medida que la concentración del control positivo y de las nps de  $\text{CuO}$  se incrementa, la intensidad fluorescente se incrementa también debido a la oxidación de la sonda. La intensidad fluorescente para el control positivo es mayor que para las nps debido a que la disposición de la especie  $\text{Cu}^{2+}$  es mucho mayor para el primer caso. La fluorescencia del control negativo extremadamente baja se debe a la pobre concentración de la especie  $\text{Cu}^{2+}$  ya que, forma un complejo con el NTA con una constante de estabilidad muy alta ( $\log \beta = 17,42$  [97]).

Para el caso de las nps de  $\text{CuO}$  se observa que estas terminan oxidando la sonda fluorimétrica DHR en presencia y ausencia del peróxido, es decir, con y sin el precursor de EROs. En ese sentido, los resultados sugieren que las nps de  $\text{CuO}$  podrían estar generando EROs que terminan oxidando la sonda y/o podrían estar oxidando la sonda fluorimétrica directamente, ambos mecanismos son probables.

### 5.2.2 Evaluación de la actividad fúngica de las nps de CuO

Se evaluó la capacidad fúngica de las nps de CuO a través del protocolo de comité Nacional con la cepa de hongo *Cladosporium herbarum*.

Los resultados cualitativos son mostrados en las fotografías de las placas de 96 pozos a diferentes tiempos, ver figura N°26.



**Figura N°26. Fotografías de la actividad fúngica de las nps de CuO frente al antibiótico y Cu<sup>2+</sup>**

Como se observa en la figura N°26 existe claramente una actividad fúngica por parte de las nps de CuO a partir una concentración final de pocillo de 100 ppm (columna 5) en comparación con la concentración de 50 ppm y mucho más con la de 25 ppm (columnas 6 y 7 respectivamente). Para la concentración de 25 ppm el crecimiento del hongo fue rápido, comparable incluso con el del inóculo.

Es importante notar que, la actividad de las nps a 100 ppm fue mejor luego de 5 días en comparación con el antibiótico utilizado a la misma concentración (Fluconazol 100 ppm), columna 4 de la placa, lo que revela un mecanismo de acción fúngico más eficaz por parte de las nps de CuO. Debido a la hidrofobicidad de la nps de CuO, la dispersión resultó

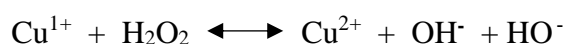
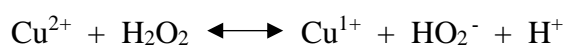


mejor en el solvente de acetona/agua, sin embargo, no fue la deseada ya que como se observa en la placa hay partículas macroscópicas que no lograron dispersarse completamente. En ese sentido, de obtener una mejor dispersión, la concentración fúngica para las nps de CuO sería menor a 100 ppm.

La columna 8 en la figura N°26, correspondiente a la concentración de 100 ppm para el ión de Cu<sup>2+</sup>. Se observa claramente que el Cu<sup>2+</sup> no tuvo actividad fúngica contra el hongo, la velocidad de crecimiento de este es comparable con la del inóculo. A partir de este hecho se puede afirmar que el mecanismo de la actividad fúngica de la nps de CuO no se dá debido a la presencia directa de especies Cu<sup>2+</sup>.

La actividad fúngica depende de la estructura celular, fisiología celular, metabolismo o grado de contacto [82]. La alta mesoporosidad, en ese sentido, permitiría una interacción más íntima y efectiva. Las nps de CuO generan una citotoxicidad potente dañando el ADN y células epiteliales (HEp-2) de las vías respiratorias por estrés oxidativo [98- 99]. Se puede atribuir la citotoxicidad de las nps de CuO a la solubilidad por lixiviación, relativamente alta en medios biológicos [100], siendo probable el contacto y la interacción con fluidos biológicos.

Las nps de CuO liberan cantidades suficientemente tóxicas de cobre soluble en el medio biológico. Acreditamos que se desarrolla el mecanismo tipo *Caballo de Troya* en el que las nps de CuO penetran en la membrana celular seguida por la disolución intracelular en iones de cobre redox activos [101]. La liberación de iones cobre genera toxicidad altamente favorecida por el tamaño nanométrico [102]. Los iones de cobre libres Cu<sup>x+</sup> (x = 1,2) son especies altamente redox activas capaces de producir radical hidroxilo por la reacción de tipo Fenton como se muestra a continuación [101]:



El ciclo redox entre Cu<sup>2+</sup> y Cu<sup>+</sup> puede catalizar la producción de radicales hidroxilos, lo que a su vez puede contribuir a una actividad biocida superior. La actividad combinada de iones cuprosos y cúpricos proporciona una mayor actividad citocida que cualquiera de los dos estados de oxidación [103].

El desarrollo de estrés oxidativo como causa de la actividad fungicida está de acuerdo con el resultado del test oxidante, donde se observa la capacidad oxidante de las nps de CuO.

Es importante mencionar que en un ambiente biológico los factores de pH, fuerza iónica, materia orgánica disuelta y biodisposición de ligandos moleculares desempeñarían un papel importante en la toxicidad debido a la lixiviación de las nps de cobre [101]. Dichos factores merecen ser estudiado en trabajos futuros.

## 6. CONCLUSIONES

Se desarrolló con éxito el estudio de parámetros para la síntesis de nps de CuO. Se obtuvo el menor tamaño de partículas a concentraciones de 8 mM para el Cu(Ac)<sub>2</sub> y 5 mM para la urea, y a un pH = 5,6. Por las condiciones de la síntesis y el equipo utilizado para dicho fin se afirma que la metodología de síntesis resultó simple y económica en relación otras como electrospining, spray-pirólisis, sonoquímicos, entre otros.

La síntesis fue realizada con éxito, siendo las técnicas usadas en la caracterización las que demostraron la presencia de óxido de cobre II y forma estructural tipo tenorita. Se demostró también, la presencia de grupos carbonilos presentes en la superficie de las nps de CuO.

Se obtuvieron partículas esféricas de aproximadamente 20 nm de diámetro, dichas nps se juntaron formando estructuras mayores en forma de rosetas de aproximadamente 400 nm. Este tamaño determinaría un área superficial de aproximadamente 10 m<sup>2</sup>/g mayor a las del bulk.

Las nps de CuO mostraron tener una actividad oxidante generando ERO's en presencia del precursor oxidante y en ausencia de este. Este comportamiento sugiere una actividad fungicida a través de un mecanismo por estrés oxidativo frente a la especie fúngica.

Las nps de CuO presentaron actividad fúngicida a 100 ppm para la especie fúngica *Cladosporium herbarum*. Esta actividad fue superior a la registrada por fluconazol, antibiótico de uso comercial.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hussain Beevi, S. Vignesh, T. Pandiyarajan, P. Jegatheesan, R. Arthur James, N.V. Giridharan and B. Karthikeyan. (2012). Synthesis and antifungal studies on CuO nanostructures. *M. Advanced Materials Research* Vol 488-489, pp 666-670.
- [2] Qiaobao Zhang, Kaili Zhang, Daguo Xu, Guangcheng Yang, Hui Huang, Fude Nie, Chenmin Liu, Shihe Yang (2014). CuO nanostructures: Synthesis, characterization, growth mechanisms, fundamental properties, and applications. *Progress in Materials Science* Vol 60, pp 208-337.
- [3] Chen X, Mao S (2007). Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chem Rev* Vol 107, pp 959-2891.
- [4] Park J, Joo J, Kwon SG, Jang Y, Hyeon T (2007). Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals. *Angew Chem Int Ed* Vol 46, pp 4630-4660.
- [5] Zheng H, Ou JZ, Strano MS, Kaner RB, Mitchell A, Kalantar-zadeh K. (2011) Nanostructured tungsten oxide - properties, synthesis, and applications. *Adv Funct Mater* Vol 21, pp 2175- 2196.
- [6] Solmaz Maleki Dizaj, Farzaneh Lotfipour, Mohammad Baezegar-Jalali, Mohammad Hossein Zarrintan, Khosro Adibkia (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering* Vol 44, pp 278-284.
- [7] Ya-Nan Chang, Mingyi Zhang, Lin Xia, Jun Zhang and Gengmei Xing (2012). The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials* Vol 5, pp 2850-2871.
- [8] Clarendon. A.P. Moura, L.S. Cavalcante, J.C. Sczancoski, D.G. Stroppa, E.C. Paris, A.J. Ramirez, J.A. Varela, E. Longo (2010). *Advanced Powder Technology* Vol 21, pp 197-202.
- [9] Nuengruethai Ekthammathata, Titipun Thongtema, Somchai Thongtem (2013). Antimicrobial activities of CuO films deposite on Cu foils by solution chemistry. *Applied Surface Science* Vol 277, pp 211–217.
- [10] Stoimenov PK (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* Vol 18, pp 6679-6686.
- [11] Cava, R.J (1990). Structural chemistry and the local charge picture of copper oxide superconductors. *Science* Vol 247, pp 656–662.
- [12] Tranquada J.M, Sternlieb B.J, Axe J.D, Nakamura Y, Uchida S (1995). Evidence for stripe correlations of spins and holes in copper oxide superconductors. *Nature* Vol 375, pp 561–563.

- [13] Hernández Battez A, González R, Viesca J.L, Fernández J.E, Díaz Fernández J.M, Machado A, Chou R, Riba J (2008). CuO, ZrO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles as antiwear additive in oil lubricants. *Wear* Vol 265, pp 422–428.
- [14] Hernández Battez A, Viesca J.L, González R, Blanco D, Asedegbega E, Osorio A. (2010). Friction reduction properties of a CuO nanolubricant used as lubricant for a NiCrBSi coating. *Wear* Vol 268, pp 325-328.
- [15] Pan X, Redding J.E, Wiley P.A, Wen L, McConnell J.S, Zhang B (2010). Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay. *Chemosphere* Vol 79, pp 113-116.
- [16] Stoimenov P.K, Klinger R.L, Marchin G.L, Klabunde K.J (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* Vol 18, pp 6679–6686.
- [17] Ren G, Hu D, Cheng E.W.C, Vargas Reus, M.A Reip, P Allaker R.P (2009). Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int. J. Antimicrob Agents* Vol 33, pp 587–590.
- [18] Galhardi C.M, Diniz Y.S, Rodrigues H.G, Faine L.A, Burneiko R.C, Ribas B.O, Novelli E.L.B (2005). Beneficial effects of dietary copper supplementation on serum lipids and antioxidant defenses in rats. *Ann. Nutr. Metab.* Vol 49, pp 283-288.
- [19] Naomi Fukagawa (1987). Essentiality of copper in humans. *Nutrition Review* Vol 45, pp 176-180.
- [20] Karlsson, H.L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J.; Möller, L (2008). Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol* Vol 21, pp 1726-1732.
- [21] Wang, Z.; Li, N.; Zhao, J.; White, J.C.; Qu, P.; Xing, B (2012). CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: Cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* Vol 25, pp 1512–1521.
- [22] Fahmy, B.; Cormier, S.A (2009). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol. In Vitro* Vol 23, pp 1365-1371.
- [23] Li J, Quabius E.S, Wendelaar Bonga S.E, Flik G, Lock R.A.C (1998). Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquat. Toxicol.* Vol 43, pp 1–11.
- [24] Aruoja, V.; Dubourguier, H.-C.; Kasemets, K.; Kahru, A (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.* Vol 407, pp 1461-1468.

- [25] Shi, J, Abid A.D, Kennedy I.M, Hristova K.R, Silk W.K (2011). To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. *Environ. Pollut.* Vol 159, pp 1277–1282.
- [26] Simon V. Avery, Niall G. Howlett and Stefania Radice (1996). Copper toxicity towards *saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology* Vol 62, pp 3960-3966.
- [27] Yan, L.; Zhao, F.; Li, S.; Hu, Z.; Zhao, Y (2011). Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes. *Nanoscale* Vol 3, pp 362–382.
- [28] Hund-Rinke, K.; Simon, M (2006). Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) on algae and Daphnids. *Environ. Sci. Pollut. Res.* Vol 13, pp 225-232.
- [29] Mayer A, Vadon M, Rinner B, Novak A, Wintersteiger R, Fröhlich E (2009). The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology* Vol 258, pp 139-147.
- [30] Sarlo K, Blackburn K.L, Clark E.D, Grothaus J, Chaney J, Neu S, Flood J, Abbott D, Bohne C, Casey K (2009). Tissue distribution of 20 nm, 100 nm and 1000 nm fluorescent polystyrene latex nanospheres following acute systemic or acute and repeat airway exposure in the rat. *Toxicology* Vol 263, pp 117–126.
- [31] Asli S, Neumann P.M (2009). Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant Cell Environ.* Vol 32, pp 577–584.
- [32] Brunner T.J, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass R. N, Limbach L. K, Bruinink A, Stark W.J (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* Vol 40, pp 4374–4381.
- [33] Borm P, Klaessig F.C, Landry T.D, Moudgil B, Pauluhn J, Thomas K, Trottier R, Wood S (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part V: Role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicol. Sci.* Vol 90, pp 23–32.
- [34] Blinova I, Ivask A, Heinlaan M, Mortimer M, Kahru A (2010). Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environ. Pollut.* Vol 158, pp 41–47.
- [35] Palmer D.A, Bénézech P, Simonson J.M (2005). Solubility of copper oxides in water and steam. In *Water, Steam and Aqueous Solutions for Electric Power: Advances in Science and Technology*, Proceedings of the 14th International Conference on the

Properties of Water and Steam, Kyoto, Japan, 29 August –3 September (2005). Maruzen Company: Tokyo, Japan, pp. 491–496.

[36] Wang Z, Li N, Zhao J, White J.C, Qu P, Xing B (2012). CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: Cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* Vol 25, pp 1512–1521.

[37] Chatterjee T, Chakraborti S, Joshi P, Singh S P, Gupta V, Chakrabarti P (2010). The effect of zinc oxide nanoparticles on the structure of the periplasmic domain of the *Vibrio cholerae* ToxR protein. *FEBS J.* Vol 277, pp 4184–4194.

[38] Toduka Y, Toyooka T, Ibuki Y (2012). Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and reactive oxygen species- Mediated fluorescence - Correlation with genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* Vol 46, pp 7629–7636.

[39] Nohl H, Gille L (2005). Lysosomal ROS formation. *Redox Rep.* Vol 10, pp 199–205.

[40] Zhang D.X, Gutterman, D.D (2007). Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am. J. P. Hear.* Vol 292, pp H2023–H2031.

[41] Yang H, Liu C, Yang D.F, Zhang H.S, Xi, Z (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol* Vol 29, pp 69–78.

[42] Xia T, Kovochich M, Liong M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, Yeh I, Zink J.I, Nel .E (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* Vol 2, pp 2121–2134.

[43] Singh N, Manshian B, Jenkins G.J.S, Griffiths S.M, Williams P.M, Maffei T.G.G, Wright C.J, Doak S.H (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* Vol 30, pp 3891–3914.

[44] Dudev T, Lim C (2008). Metal binding affinity and selectivity in metalloproteins: Insights from computational studies. *Ann. Rev. Biophys.* Vol 37, pp 97–116.

[45] Alcaraz L.A, Gomez J, Ramirez P, Calvente J.J, Andreu R, Donaire A (2007). Folding and unfolding in the blue copper protein rusticyanin: Role of the oxidation state. *Bioinorg. Chem. Appl.* Vol 2007, pp 54232–54240.

[46] Rao L, Cui Q, Xu X (2010). Electronic properties and desolvation penalties of metal ions plus protein electrostatics dictate the metal binding affinity and selectivity in the copper efflux regulator. *J. Am. Chem. Soc.* Vol 132, pp 18092–18102.

- [47] Galhardi C.M, Diniz Y.S, Rodrigues H.G, Faine L.A, Burneiko R.C, Ribas B.O, Novelli E.L.B (2005). Beneficial effects of dietary copper supplementation on serum lipids and antioxidant defenses in rats. *Ann. Nutr. Metab.* Vol 49, pp 283–288.
- [48] Kasemets K, Ivask A, Dubourguier HC, Kahru A (2009). Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol. In Vitro* Vol 23, pp 1116–1122.
- [49] C Jeffrey Brinker, George W. Scherer (1990). *Sol-Gel Science. The physics and chemistry of sol-Gel processing.* London-UK, Academic Press INC.
- [50] A. E. Danks, S. R. Hall and Z. Schnepp (2016). The evolution of ‘sol–gel’ chemistry as a technique for materials synthesis. *Materials Horizons* Vol 3, pp 91-96.
- [51] Babak Samiey, Chil-Hung Cheng and Jiangning Wu (2014). Organic-Inorganic Hybrid Polymers as Adsorbents for Removal of Heavy Metal Ions from Solutions: A Review. *Materials* Vol 7, pp 673-726.
- [52] Pierre, Alain C (1998). *Introduction to Sol-Gel Processing.* New York-USA, Springer Science+Business Media.
- [53] Cleocir José Dalmaschio, Caue Ribeiro and Edson Roberto Leite (2010). Impact of the colloidal state on the oriented attachment growth mechanism. *Nanoscale* Vol 2, pp 2336-2345
- [54] H. Goesmann and C. Feldmann (2010). Nanoparticulate Functional Materials. London UK. *Angew Chem., Int. Ed.* pp 1362–1395.
- [55] G. Wulff, Z (1901). Bioavailability of nutrients for animals amino acids, minerals, and Vitamin. *Kristallogr. Mineral*, Vol 34, pp 449-480.
- [56] W. Kossel (1943). *Zur Energetik von Oberflächenvorgängen.* Berlin, Alemania. *Ann. Phys*, pp 457–480.
- [57] J.-H. Zhang, Y. Zhang, Y.-H. Wen and Z.-Z. Zhu (2010). Comparative study of Cu<sub>13</sub> and Co<sub>13</sub> clusters deposition and diffusion on the Cu (0 0 1) Surface. *Comput. Mater. Sci.*, Vol 48, pp 250–257.
- [58] H. Cölfen and M. Antonietti (2008). *Mesocrystals and Nonclassical Crystallization.* New York, Wiley pp I6-I10.
- [59] Lydia Bahrig, Stephen G. Hickey and Alexander Eychmüller (2014). Mesocrystalline materials and the involvement of oriented attachment. *CrystEngComm* Vol 16, pp 9408–9424.



- [60] M. Niederberger and H. Cölfen (2006). Oriented attachment and mesocrystals: Non-classical crystallization mechanisms based on nanoparticle assembly. *Phys. Chem Vol 8*, pp 3271–3287
- [61] Suzana Tasic Natasa Miladinovic Tasic (2007). *Cladosporium spp*: Cause of opportunistic mycoses. *Acta fac med naiss Vol 24 (1)*, pp 15-19.
- [62] Kumari Manisha, Nirmal Panwar (2012). Morpho-Pathological Effects of Isolated Fungal Species on Human Population. Vol 1, pp 1-6.
- [63] Public Health Image Library (PHIL) (2016). *Cladosporium, spp*. Centers for Disease Control and Prevention, Office of the Associate Director for Communications, Division of Public Affairs. Recuperado en <https://phil.cdc.gov/phil/quicksearch.asp>, 12 marzo 2017.
- [64] Anastassia N. Alexandrova and William L. Jorgensen (2007). Why Urea Eliminates Ammonia Rather Than Hydrolyzes in Aqueous Solution. *J Phys Chem B. Vol 111(4)*, pp 720–730.
- [65] Jia W, Reitz E, Shimpi P, Rodriguez EG, Gao P-X, Lei Y (2009). Spherical CuO synthesized by a simple hydrothermal reaction: concentration-dependent size and its electrocatalytic application. *Mater Res Bull Vol 44*, pp 1681–1686.
- [66] Vaseem M, Umar A, Kim SH, Hahn Y-B (2008). Low-temperature synthesis of flower-shaped CuO nanostructures by solution process: formation mechanism and structural properties. *J Phys Chem C Vol 112*, pp 5729–5735.
- [67] Guan X, Li L, Li G, Fu Z, Zheng J, Yan T (2011). Hierarchical CuO hollow microspheres: controlled synthesis for enhanced lithium storage performance. *J Alloys Compd Vol 509*, pp 3367- 3374.
- [68] Webb P.A, Orr C, Camp R. W, Olivier J.P, Yunes S, (1997). Analytical methods in fine particle technology. USA Norcross: Micromeritics, chapter 3.
- [69] Espósito, B.P.; Breuer, W.; Sirankapracha, P.; Pootrakul, P.; Hershko, C. E Cabantchik, Z. I. (2003). Labile Plasma Iron In Iron Overload: Redox Activity And Susceptibility To Chelation. *Blood Vol 102*, pp 2670-2677.
- [70] Espósito, B.P.; Breuer, W.; Slotki, I. E Cabantchik, Z. I (2002). Labile Iron In Parenteral Iron Formulations And Its Potential For Generating Plasma Nontransferrin-Bound Iron In Dialysis Patients. *Eur. J. Clin. Invest. Vol 32*, pp 42-49.

- [71] Portas, A. D. S., Miguel, D. C., Jenicer, K. U. Y. Y., Uliana, S. R. B. & Espósito, B. P (2012). Increasing the activity of copper(II) complexes against Leishmania through lipophilicity and pro-oxidant ability. *J. Biol. Inorg. Chem.* Vol 17, pp 107–112.
- [72] Franklin R. Cockerill, Matthew A. Wikler, et. al. (2003). *Nccls/Clsi National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition (M7-A6)*. Wayne, PA, USA, 2003. Ed OPAS.
- [73] Alain C. Pierre (1998). *Introduction to Sol-Gel processing*. Kluger Academic Publishers. Massachusetts, USA, pp 160-161.
- [74] Jorge-Alejandro Reyes-Esqueda, Rodolfo Zanella, Amado Bautista Salvador (2008). Size Control of Au Nanoparticles on TiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by DP Urea: Optical Absorption and Electron Microscopy as Control Probes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* Vol 8, pp 1–8.
- [75] Hengzhong Zhang, Bin Chen, and Jillian F. Banfield (2010). Particle Size and pH Effects on Nanoparticle Dissolution. *J. Phys. Chem.* Vol 114, pp 14876–14884.
- [76] Luciano Sandoval Yoal, Leticia Montellano Palacios, Martín Piña Soberanis y Laura Olivia Sánchez Guzmán (2010). Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer. *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua* Vol 1, pp 1-15.
- [77] Kajal Kumar Dey, Ashutosh Kumar, Rishi Shanker, Alok Dhawan, Meher Wan, Raja Ram Yadav and Avanish Kumar Srivastava (2012). Growth morphologies, phase formation, optical & biological responses of nanostructures of CuO and their application as cooling fluid in high energy density devices. *The Royal Society of Chemistry*, Vol 2, pp 1387–1403.
- [78] S.V. Pérez (1979). *Química de las Disoluciones: Diagramas y Cálculos Gráficos*, Madrid- España. Alhambra Ed.
- [79] Nuengruethai Ekthammathat, Titipun Thongtem, Somchai Thongtem (2013). Antimicrobial activities of CuO films deposited on Cu foils by solution chemistry. *Applied Surface Science* Vol 277, pp 211–217.
- [80] Mushtaq A. Dar & Sang H. Nam & Youn S. Kim & Won Bae Kim (2010). Synthesis, characterization, and electrochemical properties of self-assembled leaf-like CuO nanostructures. *J Solid State Electrochem* Vol 14, pp 1719–1726.
- [81] H. Hagemann, H. Bill, W. Sadowski, E. Walker, M. Fracois (1990). Raman spectra of single crystal CuO. *solid State Communications*. Vol 73, pp 447-451.

- [82] K. Mageshwari, R. Sathyamoorthy (2013). Flower-shaped CuO Nanostructures: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity. *J. Mater. Sci. Technol.*, Vol 29(10), pp 909-914.
- [83] Anita Sagadevan Ethiraj and Dae Joon Kang (2012). Synthesis and characterization of CuO nanowires by a simple wet chemical method. Vol 7, pp 70-74.
- [84] Y. Mathey, I D. R. Greig And D. F. Shriver (1982). Variable-Temperature Raman and Infrared Spectra of the Copper Acetate Dimer  $\text{Cu}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4 (\text{H}_2\text{O})_2$  and Its Derivatives. *Inorg. Chem.* Vol 21, pp 3409-3413
- [85] Sunita Jadhav, Suresh Gaikwad, Madhav Nimse, Anjali Rajbhoj. (2011). Copper Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Their Antibacterial Activity. *J Clust Sci* Vol 22, pp 121-129.
- [86] Variable-Temperature Raman and Infrared Spectra of the Copper Acetate Dimer  $\text{Cu}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4 (\text{H}_2\text{O})_2$  and Its Derivatives. Y. Mathey, D. R. Greig And D. F. Shriver. *Inorg. Chem.* 1982, 21, 3409-3413.
- [87] D.P. Volanti, D. Keyson, L.S. Cavalcante, A.Z. Simoes, M.R. Joya, E. Longo, J.A. Varela, P.S. Pizani, A.G. Souza (2008). Synthesis and characterization of CuO flower-nanostructure processing by a domestic hydrothermal microwave. *Journal of Alloys and Compounds*, Vol 459, pp 537–542
- [88] Anthony Musumeci, Ray L (2007). A spectroscopic and thermoanalytical study of the mineral hoganite. *Frost. Spectrochimica Acta Part A* 67, pp 48–57.
- [89] S. Todorovaa, A. Naydenov, H. Kolev, J.P. Holgado, G. Ivanov, G. Kadinov, A. Caballero (2012). Mechanism of complete n-hexane oxidation on silica supported cobalt and manganese catalysts. *Applied Catalysis A: General* Vol 413, pp 43–51.
- [90] Lyu Y Y, Yi S H, Shon J K, et al (2004). Highly stable mesoporous metal oxides using nano-propping hybrid gemini surfactants. *J Am Chem Soc*, Vol 126, pp 2310-2311.
- [91] Mario M. Hurtado Cotillo, Gino Picasso Escobar (2016). Catalizadores basados en óxidos mixtos de Niquel (II) y Hierro (III) soportados sobre  $\text{TiO}_2$  y  $\text{Y-Al}_2\text{O}_3$  para la deshidrogenación oxidativa del etano a etileno (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú.
- [92] Wang Li, Zhao Bin, Yuan Zhongyong, Zhang Xuejun, Wu Qingduan, Chang Lixian, Zheng Wenjun (2007). Syntheses of CuO nanostructures in ionic liquids. *Sci China Ser B-Chem* Vol. 50, pp 63-69.

- [93] K. S. W. Sing, D.H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniowska (1985). Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure Appl. Chem.*, Vol 57, pp 603-619.
- [94] Chunhua Ma, Liping Lin, Yanyan Du, Liang-Bi Chen, Feng Luoc And Xi Chen (2013). Fluorescence Quenching Determination Of Iron(III) Using Rhodamine 6g Hydrazide Derivative. *Anal. Methods* Vol 5, pp 1843-1847.
- [95] Espósito, B.P.; Breuer, W.; Sirankapracha, P.; Pootrakul, P.; Hershko, C. E Cabantchik, Z. I (2003). Labile Plasma Iron In Iron Overload: Redox Activity And Susceptibility To Chelation. *Blood* Vol 102, pp 2670-2677.
- [96] Portas, A. D. S., Miguel, D. C., Jenicer, K. U. Y. Y., Uliana, S. R. B. & Espósito, B. P (2012). Increasing the activity of copper(II) complexes against Leishmania through lipophilicity and pro-oxidant ability. *J. Biol. Inorg. Chem.* Vol 17, pp 107–112.
- [97] Andressa dos Santos Portas, Danilo Ciccone Miguel, Jenicer K. U. Yokoyama-Yasunaka, Silvia Reni Bortolin Uliana, Breno Pannia Espósito (2012). Increasing the activity of copper(II) complexes against Leishmania through lipophilicity and pro-oxidant ability. *J Biol Inorg Chem* Vol 16:120 -134.
- [98] Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Moller L (2008). Copper Oxide Nanoparticles are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. *Chem Res Toxicol.* Vol 21, pp1726-1732.
- [99]Fahmy B, Cormier SA (2009). Copper Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Cytotoxicity in Airway Epithelial Cells. *Toxicol in Vitro.* Vol 23, pp 1365–1371.
- [100] Iris S. Weitz, Michal Maoz, Daniel Panitz, Sigal Eichler, Ester Segal (2015). Combination of CuO nanoparticles and fluconazole: preparation, characterization, and antifungal activity against *Candida albicans*. *J Nanopart Res* Vol 17, pp 342-356.
- [101] Zhongying Wang, Annette von dem Bussche, Pranita K. Kabadi, Agnes B. Kane, and Robert H Hurt (2013). Biological and Environmental Transformations of Copper-Based Nanomaterials. *ACS Nano*, Vol 7, pp 8715–8727.
- [102] Klara Midander, Pontus Cronholm, Hanna L. Karlsson, Karine Elihn, Lennart Mo`ller, Christofer Leygraf and Inger Odnevall Wallinder (2009). Surface Characteristics, Copper Release, and Toxicity of Nano- and Micrometer-Sized Copper and Copper(II) Oxide Particles: A Cross-Disciplinary Study. *Small* Vol 5, pp 389–399.
- [103] Gadi Borkow (2014). Using Copper to Improve the Well-Being of the Skin. *Curr Chem Biol.*, Vol 8, pp 89-102.