



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS MATERIALES

ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE COMPÓSITOS CON PROPIEDADES  
ANTIMICROBIALES Y *ANTIFOULING* FORMADOS POR UNA MATRIZ POLIMÉRICA  
Y NANOPARTÍCULAS A BASE DE COBRE

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA, MENCIÓN  
CIENCIA DE LOS MATERIALES

KATHERINE ANDREA DELGADO VARGAS

PROFESOR GUÍA:

Dr. RAÚL QUIJADA ABARCA

PROFESOR CO-GUÍA:

Dr. HUMBERTO PALZA CORDERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

Dr. BÁRBARA ANDREWS FARROW

Dr. LUIS CIFUENTES SEVES

Dr. MARÍA DEL VALLE DE LA CORTINA

Dr. FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

Dr. RODRIGO PALMA HILLERNS

SANTIAGO DE CHILE

2013

RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL  
GRADO DE: Doctor en Ciencias de la Ingeniería  
Mención Ciencias de los Materiales  
POR: Katherine Delgado Vargas  
FECHA: 12/08/2013  
PROF. GUÍA: Raúl Quijada Abarca

## **ESTUDIO DE LA OBTENCIÓN DE COMPÓSITOS CON PROPIEDADES ANTIMICROBIALES Y *ANTIFOULING* FORMADOS POR UNA MATRIZ POLIMÉRICA Y NANOPARTÍCULAS A BASE DE COBRE**

La contaminación de microorganismos produce serios problemas asociados a la transmisión de enfermedades o al deterioro de las superficies a las cuales éstos se adhieren. Las infecciones intrahospitalarias (IIH) generan altas tasas de mortandad y elevados costos para los pacientes. Además, cuando las superficies se exponen a ambientes húmedos, se facilita la adhesión de microorganismos que provocan su ensuciamiento y deterioro, lo que se conoce como *biofouling*. Mallas plásticas para cultivos acuícolas se ven gravemente afectadas por el *biofouling* marino, generando altos costos asociados a su remoción. En base a lo anterior, existe una alta demanda de nuevos materiales con actividad antimicrobial y *antifouling*, en particular los polímeros son de gran interés debido a su fácil procesamiento, y a que pueden sustituir desde superficies hospitalarias a mallas acuícolas.

El objetivo del trabajo es desarrollar compósitos poliméricos antimicrobiales y *antifouling* con la incorporación de diferentes tipos de partículas a base de cobre mediante el método de mezcla en fundido. Se usaron nanopartículas de cobre metálico (NPsCu) y de cobre oxidado (NPsCuO), además de micropartículas de cobre metálico (MPsCu). Se estudió además la dispersión del cobre al ser incorporado soportado o recubierto. Para ello se sintetizaron dos tipos de partículas híbridas: cobre soportado en sílice nanométrica (NPsCu/Si) y cobre funcionalizado superficialmente con cadenas orgánicas (NP Func).

La actividad antimicrobial de Polipropileno (PP) fue estudiada en función de la cantidad de nanopartículas y el tiempo de contacto. PP con 5, 10 y 20 %v/v de NPsCu eliminaron en 99,9% de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* en menos de 240 min. Los resultados mostraron que la actividad antimicrobial depende del tipo de bacteria e incrementa con el contenido de cobre. La actividad *antifouling* de PP fue estudiada en función del tipo y cantidad de nanopartículas. PP con 1 a 20%v/v de NPsCu disminuyeron hasta en un 90% el biofouling después de dos meses en el mar, mientras que PP con 1 a 5%v/v de NPsCuO lo redujeron hasta en un 30% en el mismo tiempo. La actividad antimicrobiana y antifouling se relacionó con la capacidad de liberar iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ). PP con NPsCu logró mayor liberación que con NPsCuO, en las mismas condiciones.

Las partículas de cobre funcionalizado con cadenas orgánicas (NP Func) exhibieron buena dispersión en la matriz polimérica, no así las partículas de cobre soportadas (NPsCu/Si). Ambas partículas, puras o embebidas en PP, tienen alta liberación de cobre. La capacidad de liberación de las partículas en base a cobre se incrementa en el siguiente orden: NPsCuO, NPsCu, NPsCu/Si y NP Func. Además, la disminución del tamaño del relleno y el uso de matrices poliméricas hidrófilas o con baja cristalinidad favorecen la liberación.

Estos resultados muestran que partículas en base a cobre le confieren propiedades antimicrobiales y *antifouling* a matrices poliméricas. Estos nuevos materiales tienen la potencialidad de aplicados en superficies hospitalarias como medida complementaria en la prevención de las IHH. También emergen como materiales de reemplazo en la fabricación de mallas acuícolas o estructuras plásticas afectadas por el *biofouling* marino.

## ABSTRACT

The contamination by microorganisms is the reason of serious problems associated with the transmission of diseases and the deterioration of the surfaces to which they adhere. Hospitals acquired infections (HAI) are very common; it is increasing the rate of mortality and costs to patients. Moreover, when the surfaces are exposed to hydrated environments, adherence of microorganisms cause its deterioration and contamination, a phenomenon known as *biofouling*. Plastic nettings for aquaculture are seriously affected by marine *biofouling*, generating high costs associated with its removal. Based on the above mentioned , there is a demand for novel materials with antimicrobial and *antifouling* properties, particularly polymers are of great interest due to their ease of processing and because they can replace many other materials, from the hospital surfaces to aquaculture nets.

The goal of this research is to develop novel polymer composites with antimicrobial and *antifouling* activity by adding different type of copper based particles by the melt mixing method. Metallic copper (NPsCu) or copper oxide nanoparticles (NPsCuO) were used, also metallic copper microparticles (MPsCu). Additionally, the dispersion of copper supported or coated in the polymer matrix was studied. For this purpose two types of hybrid particles were synthesized: copper supported on nanometric silica (NPsCu/Si) and copper functionalized with organic chains in its surface (NP Func).

Antimicrobial activity of Polypropylene with NPsCu was studied as a function of the amount of nanoparticles and contact time. PP with 5, 10 and 20% v/v of NsPCu are able to kill more than 99.9 % of *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* after contact times less than 240 minutes. The results show that antimicrobial activity depends on the type of bacteria and increases with the copper content. Antifouling activity of PP was studied as a function of the type and amount of nanoparticles. PP with 1% to 20% v/v of NPsCu are able to decrease the *biofouling* by up to 90% after two months in the sea. PP with 1% to 5% v/v of NPsCuO exhibited up to 30% of reduction in the same time. Antimicrobial and *antifouling* activity is related to the release of cupric ions ( $\text{Cu}^{2+}$ ) from the samples, which as a function of type and amount of nanoparticles .PP with NPsCu presents higher ion release than PP with NPsCuO in the same conditions.

Unlike supported copper particles (NPsCu/Si), functionalized copper particles with organic chains (NP Func) exhibited good dispersion in the polymer matrix. Both type of particles, pure or embedded in PP, show high ion release. Release ability of copper based particles increases in the following order: NPsCuO, NPsCu, NPsCu/Si and NP Func. Moreover, the decreases size filler and uses hydrophilic matrices with low crystallinity favour the cupric ions release.

These results show that copper-based particles confer antimicrobial and antifouling properties to polymer matrix. These novels materials open up new applications in hospitals surfaces for the prevention of HAI and they are alternatives or replacements for plastic nettings for aquaculture affected by marine *biofouling*.

*Dedico este trabajo a todas las personas que de una u otra forma han contribuido a su realización.*

*En especial a mi familia y amigos, quienes me han acompañado y apoyado siempre.*

*y a mí.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de mi trabajo.

Quedo especialmente agradecida con mis dos guías de tesis. Al profesor Raúl Quijada, por su aceptarme a realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Por su apoyo y su compañía en mi formación como profesional e investigadora. Al profesor Humberto Palza, por su importante aporte y participación en esta tesis. Su confianza en mi trabajo, su dedicación de tiempo y sus comentarios.

A todos los miembros del laboratorio por su colaboración, compañía y buenos momentos compartidos. En especial, a Juan Benavides que me ha acompañado en mi desarrollo como persona y profesional.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia de mi familia y amigos.

A todos ellos, Muchas Gracias. K.D.

## PUBLICACIONES

- 2012 Controlling the Antimicrobial Behavior of Polypropylene with Embedded Copper Nanoparticles. *Current Applied Physics*. R. Quijada, K. Delgado, H. Palza (enviado).
- 2012 Controlling the release of antimicrobial metal ions from copper nanoparticles embedded in a polypropylene matrix by optimizing its dispersion. *Polymers for Advanced Technologies*. H. Palza, K. Delgado, I. Pinochet (enviado).
- 2011 Polypropylene with embedded Copper Metal or Copper Oxide Nanoparticles as a Novel Plastic Antimicrobial Agent. *Letters in Applied Microbiology* 53(1): 50-4. K. Delgado, R. Quijada, R. Palma, H. Palza.
- 2010 Toward Tailor-made Biocide Materials Based on Polypropylene/Copper Nanoparticles. *Macromolecular Rapid Communication* 31(6): 563-7. H. Palza, S. Gutiérrez, O. Salazar, V. Fuenzalida, J. Avila, G. Figueroa, R. Quijada.

# TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.- ANTECEDENTES GENERALES</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2.- OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
1.2.1.- Objetivo general .....	4
1.2.2.- Objetivos específicos .....	4
<b>CAPÍTULO 2: EL COBRE</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1.- PROPIEDADES</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.- EL COBRE COMO AGENTE ANTIMICROBIAL</b> .....	<b>6</b>
2.2.1.- El cobre y las infecciones intrahospitalarias (IIH) .....	8
2.2.2.- El cobre como micronutriente .....	12
2.2.3.- Mecanismos antimicrobiales del cobre .....	13
<b>2.2.3.1.- Peroxidación lipídica o formación de radicales libres</b> .....	<b>15</b>
2.2.4.- Factores que afectan la actividad antimicrobial del cobre .....	20
2.2.5.- Actividad antimicrobial de nanopartículas de cobre .....	21
<b>2.2.5.1.- Nanopartículas de cobre en estado metálico y en estado oxidado</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.5.2.- Nanopartículas de cobre soportadas en sílice</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2.5.3.- Nanopartículas de cobre modificadas superficialmente por tioles</b> .....	<b>25</b>
2.2.6.- Nanopartículas de cobre <i>versus</i> nanopartículas de plata .....	26
<b>2.3.- EL COBRE COMO AGENTE ANTIFOULING</b> .....	<b>27</b>
2.3.1.- Aspectos básicos del <i>biofouling</i> .....	27
<b>2.3.1.1.- Mecanismo de formación del biofilm</b> .....	<b>27</b>
<b>2.3.1.2.- Mecanismo de formación del biofouling</b> .....	<b>30</b>
2.3.2.- Propiedad <i>antifouling</i> del cobre .....	32
<b>2.3.2.1.- Actividad antibacterial del cobre en ambientes acuosos</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3.2.2.- Normativa de concentración de cobre en el mar</b> .....	<b>35</b>
2.3.3.- Corrosión del cobre .....	35
<b>2.3.3.1.- Aspectos generales</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3.3.2.- Corrosión del cobre en ambientes acuosos</b> .....	<b>36</b>



2.3.3.3.- Corrosión del cobre en el mar .....	40
2.3.3.4.- Corrosión del cobre en agua fresca .....	43
2.3.3.5.- Corrosión de nanopartículas de cobre en agua .....	43

## **CAPÍTULO 3: NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS**

### **ANTIMICROBIALES ..... 45**

#### **3.1.- POLÍMEROS .....45**

3.1.1.- Polipropileno (PP) .....46

3.1.2.- Polietileno (PE) .....47

3.1.2.1.- Polietileno de Baja Densidad .....47

3.1.2.2.- Polietileno de Alta Densidad .....47

3.1.3.- Poliamida 6 o policaprolactana (PA 6) .....48

#### **3.2.- NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS .....49**

#### **3.3.- NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS ANTIMICROBIALES CON NANOPARTÍCULAS DE COBRE .....50**

#### **3.4.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS 51**

3.4.1.- Polimerización *in situ* .....51

3.4.2.- Polimerización en solución .....51

3.4.3.- Mezclado en fundido .....52

## **CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS ..... 53**

#### **4.1.- SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE .....53**

4.1.1.- Síntesis de nanopartículas en base a cobre soportadas en sílice (NPsCu/Si) .....53

4.1.1.1.- Materiales .....53

4.1.1.2.- Procedimiento experimental .....53

4.1.2.- Síntesis de nanopartículas de cobre funcionalizadas superficialmente (NPFunc) .....54

4.1.2.1.- Materiales .....54

4.1.2.2.- Procedimiento experimental .....54

4.1.3.- Caracterización .....55

#### **4.2.- OBTENCIÓN DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS .....55**

4.2.2.- Procedimiento experimental .....57

4.2.3.- Caracterización .....	57
<b>4.3.- CUANTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE IONES CÚPRICOS .....</b>	<b>57</b>
4.3.1.- Materiales .....	58
4.3.2.- Procedimiento experimental .....	58
<b>4.4.- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIALES Y ANTIFOULING .....</b>	<b>59</b>
4.4.1.- Estudio de las propiedades antimicrobiales .....	59
<b>4.4.1.1.- Crecimiento microbiano en medio sólido [49] .....</b>	<b>59</b>
<b>4.4.1.2.- Conteo de Unidades Formadoras de Colonias en medio solido (placa) .....</b>	<b>61</b>
<b>4.4.1.3.- Microorganismos estudiados .....</b>	<b>62</b>
<b>4.4.1.4.-Procedimiento experimental .....</b>	<b>62</b>
4.4.2.- Estudio de las propiedades <i>antifouling</i> .....	66
<b>4.4.2.1.- Procedimiento experimental .....</b>	<b>66</b>
<b>4.4.2.2.- Caracterización .....</b>	<b>66</b>
<b>4.5.- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES TÉRMICAS Y REOLÓGICAS .....</b>	<b>66</b>
4.5.1.- Estudio de las propiedades térmicas .....	67
4.5.2.- Estudio de las propiedades reológicas .....	67
<b>4.5.2.1.- Reometría rotacional de placas paralelas .....</b>	<b>67</b>
<b>4.5.2.2.- Reometría extensional .....</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO 5: ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL .....</b>	<b>69</b>
<b>5.1.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL DE LOS NANOCOMPÓSITOS .....</b>	<b>69</b>
5.1.1.- Caracterización de las nanopartículas comerciales .....	69
5.1.2.- Caracterización de los nanocompósitos poliméricos .....	72
5.1.3.-. Estudio de las propiedades antimicrobiales .....	79
<b>5.1.3.1.- Efecto del tipo de nanopartícula .....</b>	<b>86</b>
5.1.4.-. Estudio de la liberación de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) .....	86
<b>5.1.4.1.-Liberación de iones desde Polipropileno (PP) con nanopartículas de cobre metálico (NPsCu) .....</b>	<b>87</b>
<b>5.1.4.2.-Liberación de iones desde Polipropileno (PP) con nanopartículas de óxido de cobre (NPsCuO) .....</b>	<b>93</b>

<b>5.2.- EFECTO DEL TAMAÑO DE RELLENO Y EL TIPO DE MATRIZ POLIMÉRICA ..</b>	<b>96</b>
.....	
5.2.1.-. Efecto del tamaño del relleno .....	97
5.2.1.1.-Caracterización de las partículas .....	97
5.2.1.2.-Estudio de la liberación de iones desde las partículas .....	98
5.2.1.3.-Caracterización de los procesos de corrosión .....	101
5.2.1.4.- Estudio de la liberación de iones cúpricos desde los compósitos .....	103
5.2.1.5- Estudio de las propiedades antimicrobiales .....	105
5.2.2.-. Efecto del tipo de matriz polimérica .....	108
5.2.2.1.-Matrices poliméricas .....	109
5.2.2.1.-Estudio de la cristalinidad .....	110
5.2.2.2.- Estudio de la liberación de iones cúpricos .....	111
<b>CAPÍTULO 6: ACTIVIDAD ANTIFOULING .....</b>	<b>114</b>
6.1.- ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE IONES .....	115
6.2.- ESTUDIO DE LA CORROSIÓN MARINA .....	119
6.3.- EFECTO DE LA TEMPERATURA .....	124
6.4.- EFECTO DE LA SALINIDAD .....	126
6.5.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD <i>ANTIFOULING</i> .....	128
<b>CAPÍTULO 7: ESTUDIOS TÉRMICOS Y REOLÓGICOS .</b>	<b>134</b>
.....	
7.1.- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES TÉRMICAS .....	134
7.2.- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS EN FUNDIDO .....	139
7.2.1.-Reología de platos paralelos .....	139
7.2.2.-Reología extensional .....	147
<b>CAPÍTULO 8: MATERIALES HÍBRIDOS .....</b>	<b>151</b>
8.1.- NANOPARTÍCULAS EN BASE A COBRE SOPORTADAS EN SÍLICE (NPSCU/SI) .	
.....	151
8.1.1.-. Caracterización .....	151
8.1.2.-Estudio de la liberación de iones desde las partículas .....	159

8.1.3.-Estudio de la liberación de iones desde los compósitos .....	161
<b>8.2.- NANOPARTÍCULAS DE COBRE FUNCIONALIZADAS SUPERFICIALMENTE (NP FUNC) .....</b>	<b>165</b>
8.2.1.-. Caracterización .....	165
8.2.2.- Estudio de la liberación desde las partículas .....	171
8.2.3.- Estudio de la liberación desde los compósitos .....	172
<b>CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES .....</b>	<b>174</b>
<b>CAPÍTULO 10: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>176</b>
<b>CAPÍTULO 11: ANEXOS .....</b>	<b>191</b>
<b>ANEXO A: FUNDAMENTOS DEL PROCESO SOL-GEL .....</b>	<b>191</b>
<b>ANEXO B: FUNDAMENTOS DE LAS ESPECTROFOTOMETRÍA .....</b>	<b>194</b>
<b>ANEXO C: CURVAS DE CALIBRACIÓN .....</b>	<b>195</b>

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABS	:	Acrilonitrilo Butadieno Estireno
ADN	:	Ácido Desoxirribonucleico
AI	:	Antiinflamatorios
BRS	:	Bacterias Reductoras de Sulfato
CMB	:	Concentración Mínima Bactericida
CMI	:	Concentración Mínima Inhibitoria
CIM	:	Corrosión Influenciada Microbiológicamente
DAPI	:	Diamidino-fenil-indol
DIU	:	Dispositivos Intrauterinos
DL50	:	Dosis Letal
DRX	:	Difracción de Rayos X
DSC	:	Calorimetría Diferencial de Barrido
EPS	:	Exopolisacáridos
EPR	:	Elastómero etileno-propileno
HR	:	Humedad Relativa
HT	:	Hexanotiol
I	:	Intensidad
ICP	:	Plasma Acoplado Inductivamente
IIH	:	Infecciones Intrahospitalarias o Nosocomiales
MO	:	Microscopio Óptico o Microcopia Óptica
MWCNT	:	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NADPH	:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NPsCu	:	Nanopartículas de cobre metálico
NPsCuO	:	Nanopartículas de óxido de cobre
NPsCu/Si	:	Cobre nanométrico soportado en sílice.
NP Func	:	Cobre funcionalizado superficialmente por tioles.
OD	:	Oxígeno Disuelto
PA6	:	Nylon 6 o Poliamida6
PA66	:	Nylon 66 o Poliamida66
PE	:	Polietileno.
PEAD	:	Polietileno de Alta Densidad
PEBD	:	Polietileno de Baja Densidad
PMMA	:	Polimetilmetacrilato
PP	:	Polipropileno.
PPC18	:	Copolímero de Polipropileno -1-octadeceno
PP-g-AM	:	Polipropileno injertado con anhídrido maleico
PP-Met	:	Polipropileno metalocénico isotáctico
PS	:	Poliestireno
PVMK	:	Polivinil metil cetona
SPE	:	Sustancias Poliméricas Extracelulares
SOD	:	Enzima superóxido dismutasa
TEM	:	Microscopio Electrónico de Transmisión
UFC	:	Unidad Formadora de Colonia
XPS	:	Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X
% v/v	:	Porcentaje en volumen
% p/p	:	Porcentaje en volumen

$T_f$	:	Temperatura de fusión [ $^{\circ}\text{C}$ ]
$T_c$	:	Temperatura de cristalización [ $^{\circ}\text{C}$ ]
$\Delta H_f$	:	Entalpía de fusión [J/g]
$\Delta H_f^{\circ}$	:	Entalpía de fusión de un polímero 100% cristalino [J/g]
$\Delta H_c$	:	Entalpía de cristalización [J/g]
$\Delta H_1$	:	Entalpía de fusión observada [J/g]
$\Delta H_2$	:	Entalpía de fusión esperada [J/g]
$\chi_c$	:	Porcentaje de cristalinidad
ppb	:	Partes por billón [ $\mu\text{g/L}$ ]
ppm	:	Partes por millón [ $\mu\text{g/mL}$ ] o [ $\text{mg/L}$ ]

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1.- ANTECEDENTES GENERALES

Los polímeros son materiales con una amplia gama de aplicaciones tanto en el campo industrial como de la salud, debido a sus propiedades mecánicas, resistencia química, tener baja permeabilidad para gases y líquidos, ser resistentes a la radiación y calor, y a la biocompatibilidad que exhiben algunos de ellos. Por ejemplo, en el área de salud, se emplean para la elaboración de dispositivos médicos e implantes y, en el área industrial, se utilizan en empaques de alimentos, textiles, tuberías y estructuras, entre otros usos.

Entre los polímeros, las poliolefinas constituyen una familia de polímeros de gran consumo, denominados *commodities*<sup>1</sup>, como son Polietileno (PE), Polipropileno (PP) y materiales especiales, como EPR (elastómero etileno- propileno) o poli-1-buteno. La producción mundial de poliolefinas ha sido superior a 100 millones de toneladas y se espera que la demanda siga creciendo en los próximos años (Figura 1)[1,2].

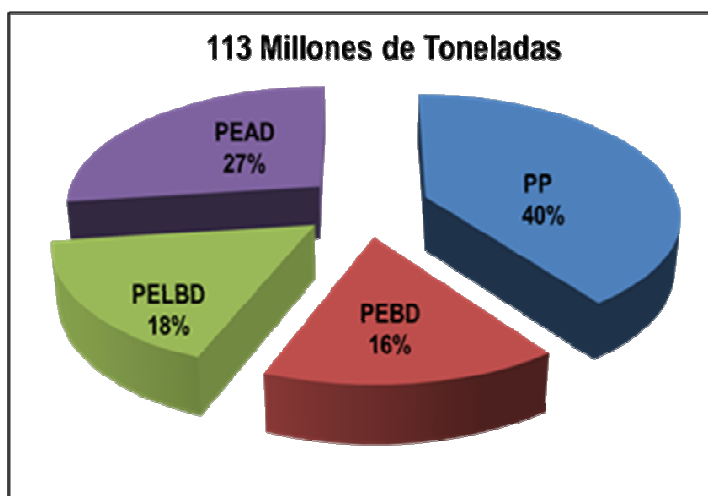


Figura 1. Consumo mundial de poliolefinas (2009): Polipropileno (PP), Polietileno de baja densidad (PEBD), Polietileno lineal de baja densidad (PELBD) y Polietileno de alta densidad (PEAD) [2].

El progresivo consumo de poliolefinas se debe fundamentalmente a la versatilidad de sus propiedades y, por tanto, de aplicaciones, y a su bajo costo de producción. Se utilizan, por ejemplo, en electrodomésticos como refrigeradoras y lavadoras, en productos sanitarios como los inodoros, en textiles (telas tejidas y no tejidas, fibras, filamentos, hilos y cuerdas) y en mobiliario doméstico, escolar y médico.

<sup>1</sup> Bien producido en grandes volúmenes y de demanda mundial.

En la actualidad, el 40% del consumo mundial de poliolefinas corresponde a Polipropileno (PP) y su uso en aplicaciones médicas ha progresado constantemente debido a sus propiedades [3]:

- Químicamente inerte
- Resistencia química
- Resistencia a la radiación
- Rigidez
- Resistencia al calor
- Alta claridad
- Buena barrera para gases y líquidos
- Resistencia al impacto
- Flexibilidad
- Moderado costo

Por ejemplo, productos de PP en el área de la salud incluyen varios dispositivos médicos, productos de embalaje y sistemas de distribución de productos farmacéuticos sólidos y líquidos [4]. Se estima que aproximadamente una cuarta parte de los instrumentos médicos desechables y un tercio de los no desechables están elaborados en PP, mientras que la tasa de crecimiento mundial para el uso de PP en aplicaciones médicas es de aproximadamente 8,7% por año [5,6].

Muchos de estos objetos están expuestos en áreas de potencial proliferación de microorganismos, por ello es de especial interés incorporar a estos materiales convencionales la capacidad antimicrobial, respondiendo así a la necesidad del hombre de alcanzar altos estándares de seguridad e higiene. Estos materiales podrían además ser utilizados como revestimientos antimicrobiales sobre una gran diversidad de superficies presentes en lugares públicos que necesitan óptimas condiciones higiénicas, como es el caso de hospitales, escuelas o establecimientos donde se manipulan alimentos.

Actualmente las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias (IIH) son un grave problema a nivel mundial. Las IIH son infecciones adquiridas durante la hospitalización, de ellas cerca del 50% a nivel mundial son atribuidas a la contaminación bacteriana de dispositivos médicos e implantes poliméricos [7]. Por ejemplo, en Estados Unidos se reportan alrededor de 2 millones de casos anuales y aproximadamente 90 mil muertes, con un costo asociado de US\$4.5 a 11 billones en gastos médicos [8], señalando a la bacteria *Escherichia coli verocitotoxigénica* como principal responsable [9]. En Chile se notifican alrededor de 70 mil IIH anuales con un costo de US\$70 millones [10].

Por otro lado, debe también tenerse presente que la adhesión de microorganismos sobre superficies sólidas produce el deterioro de éstas a causa de la excreción de sus productos metabólicos, fenómeno conocido como *biofouling*. Por ejemplo, se produce *biofouling* sobre las rocas marinas, en los cascos de los barcos, en las dentaduras con placa bacteriana o en implantes contaminados. En particular, cuando las superficies se exponen a ambientes acuosos o entornos muy hidratados, la adherencia de microorganismos es mayor, provocando un ensuciamiento, extremo deterioro [11] y posterior adherencia de



macroorganismos. Debido a estos problemas asociados al *biofouling*, es necesario buscar alternativas de materiales que disminuyan su efecto. Polímeros *antifouling* serían potenciales candidatos para su uso en tuberías de agua, revestimientos de estructuras marinas y como mallas contenedoras de cultivos acuícolas.

Para la industria salmonera chilena el *biofouling* es un problema grave. Chile ocupa el primer lugar de la producción mundial de salmón *coho*; durante el año 2008 cultivó un 81,8% de un total de 140 mil toneladas. Además, ocupa el segundo lugar en la producción de salmón atlántico con un 27,5% del total superado solo por Noruega, con un 50,5% (1467 mil toneladas cultivado el año 2008) [12]. Los salmones son cultivados en mallas de nylon o poliéster [13] que, con el paso del tiempo, se deterioran o ensucian por *biofouling*. De este modo, se produce un problema que genera costos en el orden de 5 a 10% de los costos totales de la industria, correspondientes a la mantención de estas mallas, principalmente en el lavado del *fouling* adherido y la aplicación posterior de pinturas *antifouling*. Por lo anterior, se concluye que este problema constituye una seria amenaza para la sustentabilidad de esta industria [13,14].

Desde hace muchos años es conocida la capacidad antimicrobial y *antifouling* del cobre, aleaciones de cobre y compuestos de cobre [15]. Por ello, la incorporación de cobre metálico, cobre oxidado, aleaciones de cobre o compuestos de cobre en matrices poliméricas podría ser la solución adecuada para desarrollar nuevos materiales poliméricos antimicrobiales y *antifouling*, de fácil procesamiento y versatilidad de aplicaciones. Además, desarrollar materiales en base a cobre resulta muy atractivo para nuestro país, dado que Chile es el principal productor y exportador mundial de este metal. Durante el año 2011 produjo 5,2 millones de toneladas de cobre, con un 33% de participación en el mercado [16,17].

Dado el panorama actual de las infecciones intrahospitalarias y los problemas acarreados por el *biofouling*, principalmente en la industria salmonera, la motivación de esta tesis es estudiar una metodología que permita fabricar polímeros *commodities* con propiedades antimicrobiales y *antifouling*, mediante la adición de partículas de cobre, preferentemente de tamaño nanométrico.

## 1.2.- OBJETIVOS

### 1.2.1.- Objetivo general

Obtener nanocompósitos poliméricos con propiedades antimicrobiales y *antifouling*, a partir de la incorporación a una matriz polimérica de diferentes tipos de nanopartículas a base de cobre.

### 1.2.2.- Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de cobre soportadas en sílice y nanopartículas de cobre funcionalizadas superficialmente.
- Obtener nanocompósitos poliméricos a través de la incorporación de nanopartículas de cobre comerciales o sintetizadas, por el método de mezcla en fundido.
- Estudiar las propiedades antimicrobiales y *antifouling* de los nanocompósitos poliméricos y determinar su relación con el tipo de nanopartículas y el porcentaje de carga.
- Cuantificar la liberación de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) desde los nanocompósitos poliméricos.
- Caracterizar las propiedades térmicas y reológicas de los nanocompósitos poliméricos.

# CAPÍTULO 2: EL COBRE

## 2.1.- PROPIEDADES

El cobre (Cu) es clasificado como un metal de transición en la Tabla Periódica con número atómico 29 y una masa atómica de 63,546 uma. Es el primer elemento del Grupo IB que contiene también a la plata (Ag) y al oro (Au), por lo que es considerado un metal noble. Forma complejos estables con otros elementos y tiene más de un estado de oxidación. El estado cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) es altamente inestable en soluciones acuosas y por ello se oxida fácilmente al estado cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ). Algunas de sus propiedades son:

- Brillo metálico y color rojizo.
- Estructura cristalina cúbica centrada en las caras.
- Nutriente esencial para la vida.
- Temperatura de fusión de  $1083^{\circ}\text{C}$ .
- Densidad  $8,93 \text{ g/cm}^3$ .
- Alta conductividad eléctrica y térmica.
- No magnético.
- Maleable y dúctil.

Debido a sus buenas propiedades, el cobre es el tercer metal más utilizado por el hombre, después del acero y el aluminio [16], con una demanda mundial de 20 millones de toneladas métricas durante el 2011 [17]. El cobre y sus aleaciones son utilizados en muchas aplicaciones, como cables eléctricos, tuberías, utensilios de cocina, cerraduras, picaportes, pasamanos, entre otras. Sus variados usos se deben a que sus aleaciones tienen una amplia gama de propiedades físicas y mecánicas.

Además, tempranamente en la historia del hombre, al cobre, aleaciones de cobre, óxidos de cobre y complejos de cobre se les ha atribuido las propiedades antimicrobiales (antibacterias, antihongos, antivirus, antilevaduras, antialgas) y *antifouling* (antiadherente). Los antiguos aztecas empleaban óxido de cobre y carbonato de cobre para tratar infecciones de la piel y alrededor del 400 A.C. Hipócrates prescribía compuestos de cobre para tratar enfermedades pulmonares [18]. Más reciente fue su uso durante la Segunda Guerra Mundial, cuando piezas de cobre fueron inmersas en botellas de agua para prevenir la disentería [15].

## 2.2.- EL COBRE COMO AGENTE ANTIMICROBIAL

Existen diversos agentes antimicrobiales, tanto orgánicos como inorgánicos. Entre los agentes orgánicos se usan frecuentemente compuestos clorados, pero estos materiales tienen la desventaja de ser bastante tóxicos para los seres humanos y el medio ambiente. Dentro de los agentes inorgánicos, la plata exhibe la más alta eficacia antimicrobiana en combinación con una relativamente baja toxicidad hacia el tejido humano [19]. El cobre se presenta como otra alternativa, no tan ampliamente estudiada, pero con la ventaja de ser comparativamente menos costosa que la plata [20] y que, a diferencia de la plata, es un elemento esencial para el hombre.

En el año 1983, la Dra. P.J. Kuhn descubrió que en los picaportes de bronce el crecimiento de bacterias era mínimo en comparación con su crecimiento en otros materiales, como el acero. Años después, la efectividad antimicrobial del cobre y sus aleaciones, como latones (cobre-zinc), bronce (cobre-estaño), cobre-níquel y cobre-níquel-zinc, entre otros, han sido ampliamente demostradas contra diferentes tipos de bacterias, como se resume en la Tabla 1. Estudios realizados por Michels y colaboradores [21] demostraron que las aleaciones de cobre son antimicrobiales en rangos de temperatura (22°C) y humedad relativa (50% HR) de ambientes interiores. También concluyeron que la plata es antimicrobial a temperatura elevada (35°C) y requiere una humedad ambiental extremadamente alta (90% HR), mientras que en tales condiciones las superficies de cobre continúan manteniendo su eficacia antimicrobial. En el Hospital de Calama, Chile, demostraron que las aleaciones de cobre presentan actividad antimicrobial en rangos de 5-10 % HR.

De acuerdo a los numerosos estudios, en el año 2008 la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés, “Environmental Protection Agency”) aprobó el uso de 275 aleaciones de cobre como superficies antimicrobiales. Las pruebas realizadas durante cuatro años demostraron que superficies que contienen un 90% en peso de cobre eliminaban más del 99,9% de las bacterias en un período de 2 horas. Hoy, el número de aleaciones ha aumentado a 282, todas con al menos un 60% en peso de Cu [22].

Como consecuencia de su amplio rango de efectividad antimicrobial, el cobre hoy en día es usado como purificador de agua, alguicida, funguicida, nematocida, moluscocida, antibacterial, *antifouling* y, recientemente, como agente antiviral [15]. Por otro lado, el cobre es un ingrediente activo en numerosos productos antimicrobiales, por ejemplo: sulfato de cobre, quinolato de cobre, octoato de cobre, óxido de nanocobre y arsenato de cobre amoniacal se utilizan contra hongos en cultivos, textiles y maderas. En lugares de atención de salud, se utilizan incubadoras de cobre y soluciones de cloruro de cobre como desinfectantes. Para los consumidores, el cobre es un ingrediente activo para enjuagatorios bucales, pasta de dientes y medicamentos [23].

Tabla 1. Ejemplos de bacterias susceptibles al cobre y a sus aleaciones.  
Gram negativa:  $G^-$ , Gram positiva:  $G^+$ ; valores en porcentaje en peso de cobre: §

BACTERIA	VÍA DE TRANSMISIÓN	ALEACIONES §	REFERENCIAS
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <b>G</b> <sup>-</sup>	Alimentos/agua	Bronce Si (95%); Latón rojo (93%); Latón amarillo (61%); Bronce Ni-Al (81%); Bronce Al (78%); Latón (90%, 80%,70%); Bronce (97%, 95%, 90%); Cu-Ni (90%, 80%); Cu-Ni-Zn (65%, 55%).	[24,25, 26]
<i>Listeria monocytogenes</i> <b>G</b> <sup>+</sup>	Alimentos	Latón (90%,80%,70%); Bronce (97%,95% ,70%); Cu-Ni (90%,80%); Cu-Ni-Zn (65%,55%).	[24]
<i>Salmonella entérica</i> <b>G</b> <sup>-</sup>	Alimentos	Latón (70%)	[27]
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (SARM) <b>G</b> <sup>+</sup>	Hospital	Latón (90%,80%,76%,74%, 70%); Bronce (95%,97%, 90%); Bronce fosforado (95%); Cu-Ni (90%,80%); Cu-Ni-Zn (65% ,55%).	[21,24,28, 29,30]
<i>Staphylococcus</i> resistente a la ciprofloxacina (SRC) <b>G</b> <sup>+</sup>	Hospital	Latón (76% ,74%).	[28, 31]
<i>Enterobacter aerogenes</i> <b>G</b> <sup>-</sup>	Hospital	Latón (70%); Bronce fosforado (95%); Cu-Ni (89%).	[29]
<i>Enterococcus faecalis</i> resistente a la vancomicina (ERV) <b>G</b> <sup>+</sup>	Hospital	Latón (70%, 60%); Cu-Ni-Zn (65%).	[32,33]
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <b>G</b> <sup>-</sup>	Hospital	Latón (70%).	[30]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <b>G</b> <sup>-</sup>	Hospital	Latón (70%).	[30]
<i>Enterococcus faecium</i> <b>G</b> <sup>+</sup>	Hospital	Latón (70%,65%, 60%); Bronce fosforado (95%); Cu-Ni (89%).	[33]

### 2.2.1.- El cobre y las infecciones intrahospitalarias (IIH)

El control del crecimiento microbiano y su contaminación cruzada es vital y fundamental en prácticamente todos los aspectos de la vida y en todos los ambientes, desde sectores industriales, como por ejemplo donde se procesan y consumen alimentos, hasta sectores residenciales. En el ámbito de la salud, en los hospitales son comunes las infecciones causadas por la resistencia microbiana a los antibióticos, las infecciones de los implantes biomédicos y la transmisión de infecciones de individuo a individuo.

Las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias (IIH) son las adquiridas durante la hospitalización y constituyen un problema no resuelto a nivel mundial, incrementando la morbilidad<sup>2</sup> y mortalidad de los pacientes y los costos de atención en salud. En Europa se notifican 50 mil muertes anuales producto de las IIH [34]. En Estados Unidos se reportan alrededor de 2 millones de casos anuales y 90 mil muertes [8,35], siendo la cuarta causa de muerte en el país, después de las enfermedades al corazón, cáncer y derrames cerebrales [36]. Reportes recientes estiman que ellas tienen un costo asociado de US\$4.5 a 11 billones en gastos médicos [8,37], incluyendo la sobre estancia hospitalaria. También se afirma que el número de muertes causadas por la *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) excede el número de muertes causadas por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) [38]. En Chile se notifican cerca de 70 mil IIH anuales y se estima que cada IIH prolonga la estadía hospitalaria 10 días en promedio, con un costo de US\$70 millones [10]. Los principales patógenos responsables de las IIH en Chile son *Staphylococcus aureus* (SARM), *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, siendo las infecciones más comunes las siguientes [39]:

- **Infecciones del tracto urinario:** Asociadas al uso de catéter urinario, representan el 23% del total de las IIH.
- **Infecciones de heridas operatorias:** Entre uno y tres pacientes diarios contrae infecciones luego de la operación. Esto prolonga la estadía entre 13 y 50 días.
- **Neumonías:** relacionadas con la contaminación de sondas respiratorias, representan el 12,1% de las IIH.
- **Septicemias:** principalmente debido a la contaminación de catéteres. Los pacientes infectados son 2 de cada 100 adultos, con una tasa de mortalidad del 13,3%. Esta enfermedad prolonga la estadía de los pacientes entre 7 y 64 días.

El principal mecanismo de transmisión ocurre a través de las manos del personal, los paramédicos, los pacientes y los visitantes, ya que transportan bacterias desde una superficie contaminada hasta una superficie limpia [39]. Estos microorganismos contaminan principalmente los implementos médicos enlistados a continuación (Tabla 2):

---

<sup>2</sup> Cantidad de personas o individuos considerados enfermos o víctimas de una enfermedad en un espacio y tiempo determinados.

Tabla 2. Lista parcial de la contaminación bacteriana de implementos médicos [39,40].

<b>DISPOSITIVO</b>	<b>BACTERIA</b>
Sondas respiratorias	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Suturas	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Lentes de contacto	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Catéteres urinarios	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>
Dispositivo Intrauterino (DIU)	<i>Actinomyces israelii</i>
Tubos endotraqueales	Variedad de bacterias y hongos
Catéteres Hickman	<i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Staphylococcus coagulasa negativa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Catéteres centrales venosos	<i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Staphylococcus coagulasa negativa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Válvulas mecánicas del corazón	<i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Dispositivos ortopédicos	<i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Prótesis del pene	<i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>



Figura 2. Focos infecciosos en hospitales: A) áreas administrativas; B) artículos ubicados en salas de pacientes [39].

Por otro lado, las bacterias que causan las infecciones también pueden ser encontradas en áreas administrativas o en salas de pacientes (ver Figura 2). Por esta razón existe una alta demanda de nuevos materiales capaces de reducir o eliminar las IIH. Al eliminar virus, hongos y bacterias relacionadas con las IIH, el cobre se posiciona como una alternativa y complemento importante para la prevención de infecciones en áreas de alta contaminación bacteriana y de alto riesgo para la salud humana.

Mesas, barandales de camas, porta sueros, brazos de sillas, picaportes, llaves de agua, porta toallas, dispositivos de llamado y mouse de computadora, son sólo algunas de las aplicaciones para el cobre. Recientemente, en el Hospital del Cobre de Calama, Chile, se implementaron superficies de cobre y aleaciones de cobre, para estudiar su efecto sobre la contaminación bacteriana (Figura 3).





Figura 3. Salas UCIs (Unidad de cuidados intensivos) del Hospital del Cobre de Calama, Chile [41]. Superficies cobrizadas: barandas de las camas, palanca de regulación de las camas, apoya brazos de la silla para visitas, mesa de comida, porta suero y lápiz para introducir datos en la pantalla de los computadores.

Los resultados demostraron que el uso de superficies cobrizadas produjo una reducción de la población bacteriana que en promedio superó el 80% durante los 30 días de observación, por lo que el estudio permitió concluir que en ambientes hospitalarios su uso constituye un complemento importante en las medidas de control de patógenos, teniendo un impacto positivo en la disminución de IHH en las salas UCIs (Unidad de cuidados intensivos) [39,41].

En la estación “Santiago Bueras” del Metro de Santiago de Chile, cobre y aleaciones de cobre están siendo aplicados en barandas, pasamanos y las manillas que se encuentran dentro de los trenes, disminuyendo significativamente la transferencia de patógenos entre los usuarios (ver Figura 4). Profesionales del programa de Microbiología y Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, determinaron que utilizar manillas con pequeñas incrustaciones de cobre puede reducir la concentración de bacterias en ellas en a lo menos un 80% respecto de las manillas sin cobre.

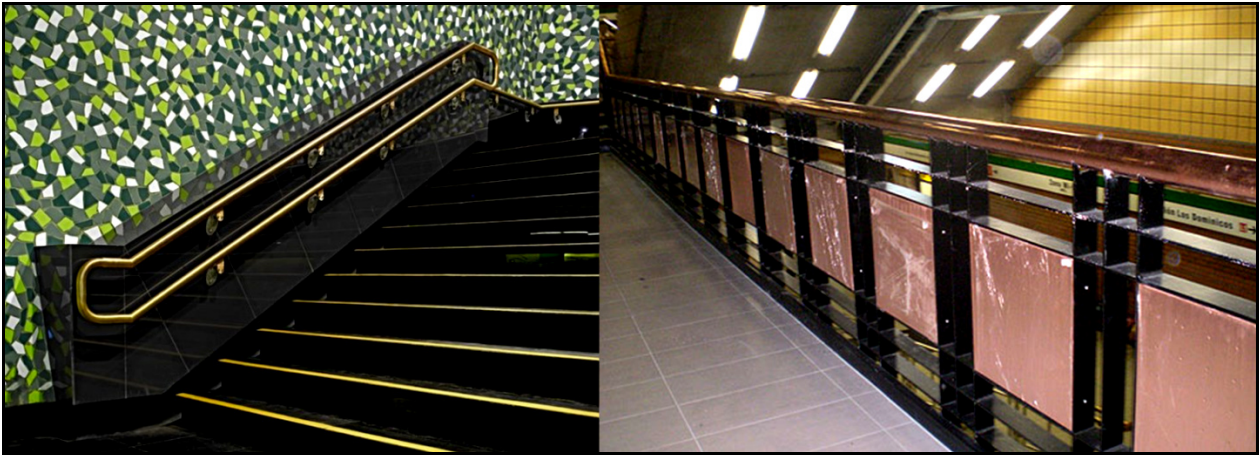


Figura 4. Barandas y pasamanos de cobre en estación “Santiago Bueras” del Metro de Santiago de Chile [41].

En conclusión, existe una significativa demanda social por prevenir las infecciones causadas por transmisión de microorganismos en lugares públicos, lo cual ha fomentado la incorporación de recubrimientos antimicrobianos, siendo las aleaciones de cobre los más utilizados.

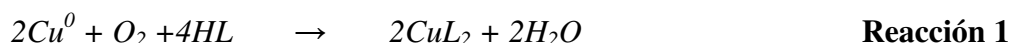
#### 2.2.2.- El cobre como micronutriente

A pesar de la toxicidad del cobre para los microorganismos, este metal, a diferencia de la plata, es un micronutriente esencial para plantas y animales, incluyendo seres humanos. El cobre está involucrado en la función de varias enzimas y proteínas necesarias para los procesos metabólicos y, cuando los requerimientos nutricionales son satisfechos, el exceso es excretado por las heces (72% de la ingesta) y la orina [15,42]. Se estima que el ser humano incorpora a través de la comida y bebida cerca de 1 mg de cobre por día y podría producir efectos tóxicos con una ingesta crónica mayor a  $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  [43]. La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos (NAS) recomienda una ingesta diaria de 0,9 mg de cobre para un adulto. Además, señala que un consumo de 3 mg por día en niños y entre 8 a 10 mg por día en adultos es considerado aceptable y no tóxico [44]. Por otra parte, se indica la administración oral de  $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$  de cobre para el tratamiento de niños con quemaduras severas, por sus efectos regenerativos en la piel [42].

Los efectos nocivos por ingesta crónica incluyen daño permanente a riñones e hígado en niños menores de un año de edad. En adultos, puede causar trastornos digestivos como vómitos, diarrea y calambres estomacales. Las personas afectadas con la enfermedad de Wilson<sup>3</sup>, un trauma genético, no pueden excretar el exceso de cobre, llegando a alcanzar peligrosos niveles de concentración que pueden causarles la muerte [43]. Una de las medidas tomadas por muchos países para evitar problemas de toxicidad a causa del cobre y otros metales, fue establecer estándares de calidad del agua potable. Para el caso de Estados Unidos, la concentración máxima de cobre permitida es de  $1,3 \text{ mg L}^{-1}$  [22], mientras que para Chile es de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  [45]. En otras palabras, asumiendo un consumo de 2 litros de agua al día, la ingesta de cobre por esta vía no excedería los  $4 \text{ mg día}^{-1}$ .

<sup>3</sup> Trastorno hereditario que hace que el cuerpo retenga cobre.

Por otra parte, la piel humana tiene baja sensibilidad al cobre, esto se ha demostrado por el prolongado uso de dispositivos intrauterinos (DIU) como la T de cobre, aleaciones dentales y porque el cobre es utilizado para tratamientos antiinflamatorios (AI) de la piel [18]. En contacto prolongado con la piel el cobre metálico es oxidado, formando sales de cobre con aminoácidos (como histidina o glicina) o con ácidos grasos presentes en el sudor. Este proceso se puede representar como sigue [18]:



Con  $Cu^0$  el cobre en su forma elemental y L el ligando endógeno del aminoácido o ácido graso. Los complejos  $CuL_2$  penetran en la piel, por ello al estado de oxidación cúprico ( $Cu^{+2}$ ) se le atribuye los efectos AI. La presencia de humedad y oxígeno son factores necesarios para la disolución del metal; en ausencia de estos no es posible la liberación de  $Cu^{+2}$  [46,47]. Por otra parte, recientemente se está investigando el uso de óxidos de cobre en apósitos o vendas; por el momento pruebas *in situ* en animales (conejos y cerdos) muestran que estos apósitos aceleran el proceso de curación y cicatrización [42].

### 2.2.3.- Mecanismos antimicrobiales del cobre

El cobre es requerido en trazas para el crecimiento de los microorganismos, es un cofactor de numerosas enzimas y es contenido en proteínas encargadas de la transferencia de electrones [15,48]. Sin embargo, a elevadas concentraciones resulta nocivo para los microorganismos. De acuerdo a la forma en que el cobre afecta la sobrevivencia del microorganismo, éste se comporta como un agente “estático” y/o “cidal”. Un agente estático inhibe el crecimiento microbiano, mientras que un agente cidal mata al microorganismo.

Los mecanismos antimicrobiales causados por las altas concentraciones de cobre son complejos y ocurren de diferentes formas. Varias investigaciones proponen principalmente dos mecanismos, ilustrados en la Figura 5:

- A. Peroxidación lipídica o formación de radicales libres.
- B. Formación de iones cúpricos ( $Cu^{+2}$ ).

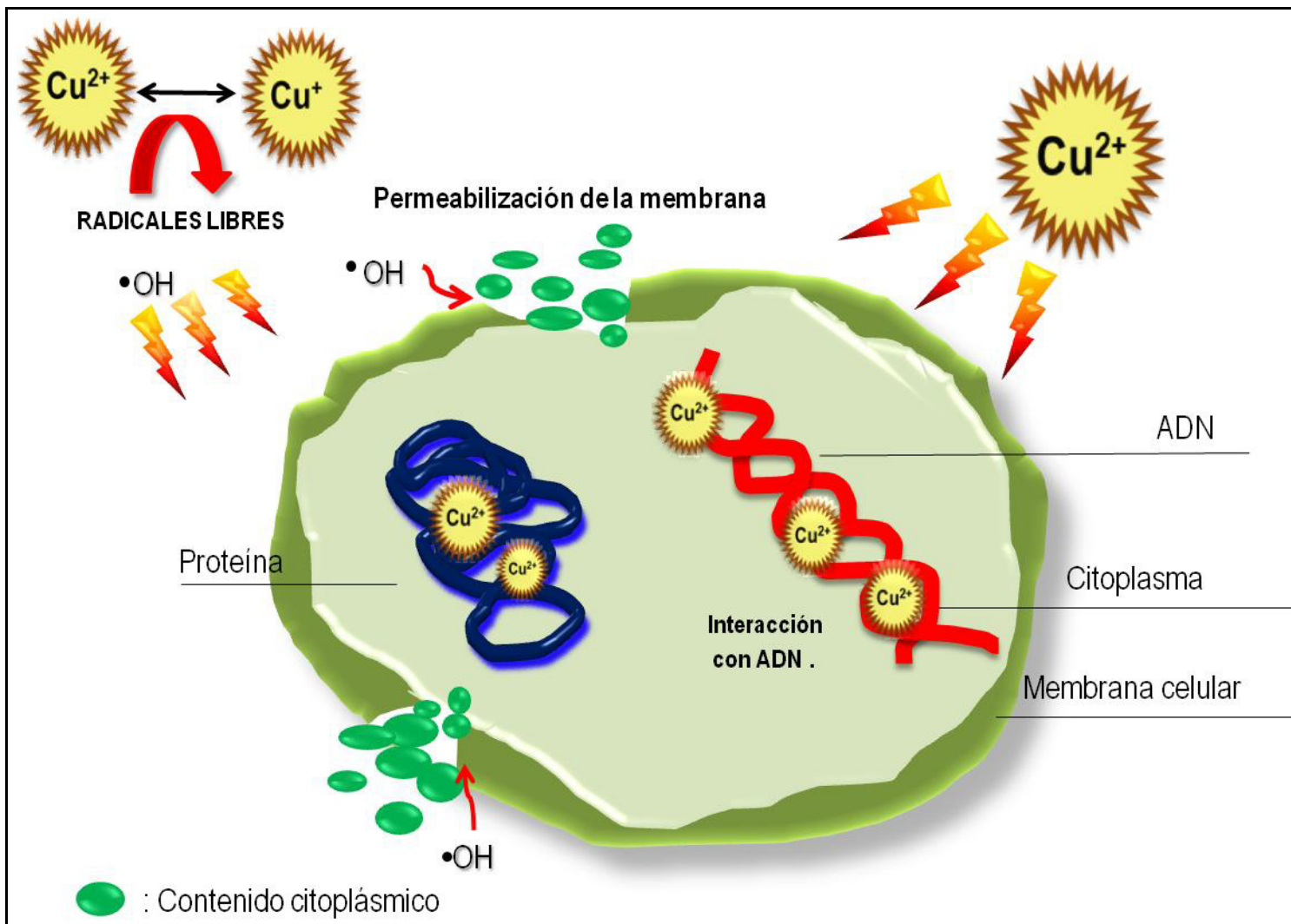


Figura 5. Mecanismos de toxicidad del cobre sobre los microorganismos.

### 2.2.3.1.- Peroxidación lipídica o formación de radicales libres

Todas las células están rodeadas por una membrana celular de aproximadamente 8 nm de espesor, la cual constituye una barrera que separa el interior de las células (el citoplasma) del exterior. La membrana celular contiene enzimas, canales, receptores y antígenos que permiten la interacción de la célula con otras células. Su estructura básica es la bicapa lipídica, como se ilustra en la Figura 6, la que funciona como barrera de permeabilidad selectiva.

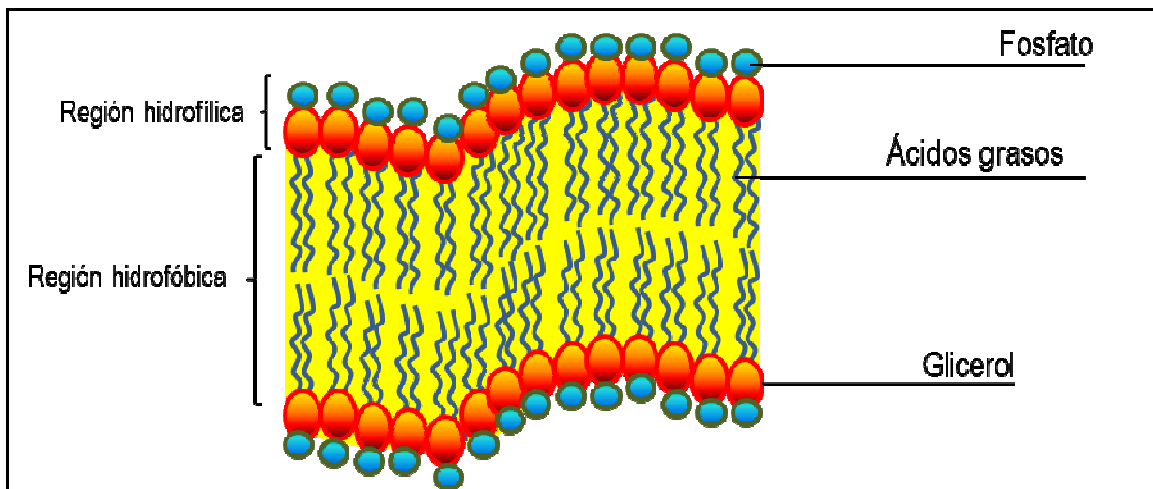


Figura 6. Estructura de la bicapa lipídica de la membrana celular [49].

Las bacterias son microorganismos que se dividen en dos grandes grupos según la estructura de su membrana o pared celular: **Gram positivas** y **Gram negativas**. La distinción inicial entre estos dos grupos se llevó a cabo gracias a un tipo de tinción diferencial denominado *tinción de Gram* (con esta tinción, las Gram positivas aparecen en color púrpura, mientras que las Gram negativas presentan color rojo), esta clasificación se respalda en claras diferencias estructurales.

Las paredes celulares son muy distintas entre ambos tipos (Figura 7). La pared celular de las Gram negativas está compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que la pared de las Gram positivas está formada fundamentalmente por un tipo de membrana y es mucho más ancha.

## Pared de bacterias Gram Positivas

La pared celular contiene una gruesa capa de péptidoglicano (20-80 nm) que constituye el 90% de la pared, además de ácidos teicoicos que son polialcoholes unidos por ésteres de fosfato (polímeros que contienen glicerolfosfato o residuos de fosfato de ribitol). Éstos aportan carga negativa a la superficie celular, lo que puede servir para el trasiego de iones a través de la pared. También algunos ácidos teicoicos (que contienen glicerol) se unen a los lípidos de la membrana (ácidos lipoteicoicos).

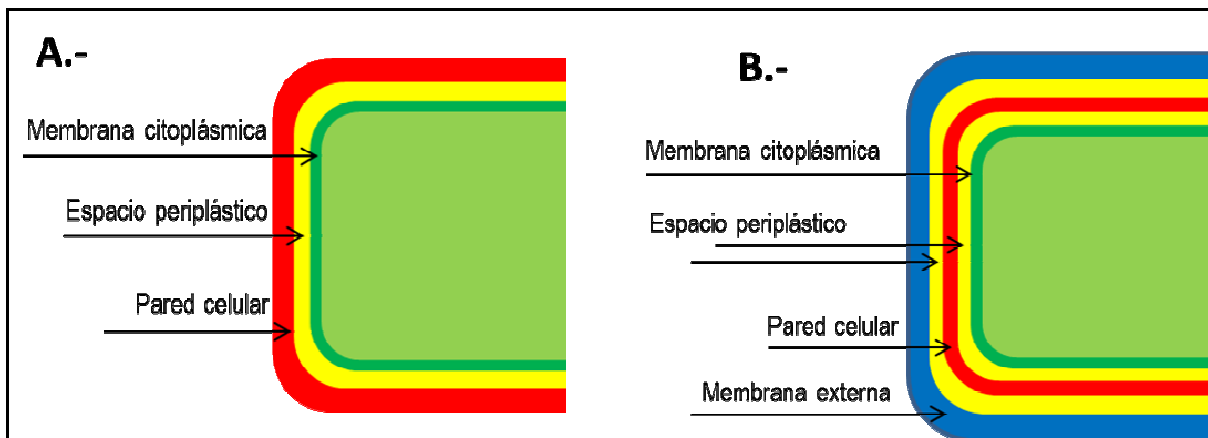


Figura 7. Esquema de la pared celular de A) Bacteria Gram Positiva; B) Bacteria Gram Negativa.

## Pared de bacterias Gram Negativas

La capa de peptidoglicano o pared celular es relativamente fina, constituye sólo alrededor del 10% de la pared y se encuentra rodeada por una segunda membrana lipídica exterior, que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas. La capa de peptidoglicano se une a la membrana externa por medio de lipoproteínas.

La membrana externa es una bicapa lipídica similar a la membrana celular, contiene lípidos y proteínas pero también lipopolisacáridos. Estos lipopolisacáridos le confieren carga negativa y repelen moléculas hidrofóbicas.

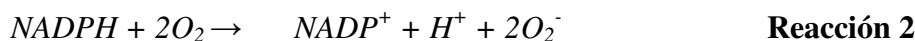
En base a lo anterior, la membrana o pared celular de todas las bacterias es rica en ácidos grasos poliinsaturados y, por lo tanto, vulnerable al ataque de radicales libres. En particular, el cobre puede producir radicales hidroxilo ( $\bullet OH$ ), los cuales son extremadamente reactivos y pueden inducir un estrés oxidativo a través de la peroxidación lipídica de las membranas celulares presentes en el microorganismo [49].

Para que el cobre produzca radicales hidroxilo ( $\bullet OH$ ), debe estar en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) fisiológico. Este compuesto es un residuo del metabolismo

celular de muchas bacterias aeróbicas y anaeróbicas y se produce intracelularmente a través de [49,50]:

**a) La producción vía enzimática del anión superóxido ( $O_2^-$ ).**

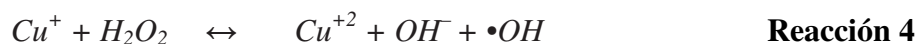
Algunas enzimas capaces de producirlo son la NADPH oxidasa<sup>4</sup>, xantina oxidasa y citocromo P450, según el siguiente mecanismo:



**b) La dismutación del superóxido espontáneamente o vía enzimática.** La enzima superóxido dismutasa (SOD), es responsable de la dismutación y, por ello, se conoce como antioxidante.



En presencia del  $H_2O_2$  fisiológico, el cobre puede comenzar un ciclo redox entre  $Cu^{+2}$  y  $Cu^{+1}$  catalizando la producción de radicales hidroxilo, según una reacción tipo Fenton [15,50]:



En consecuencia, se produce la peroxidación lipídica, debido a que los radicales hidroxilo ( $\bullet OH$ ) sustraen un hidrógeno de la cadena lateral de un ácido graso presente en la membrana celular (ver Figura 6), produciendo una reacción en cadena, según se ilustra a continuación:

---

<sup>4</sup> NADPH oxidasa: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) oxidasa.

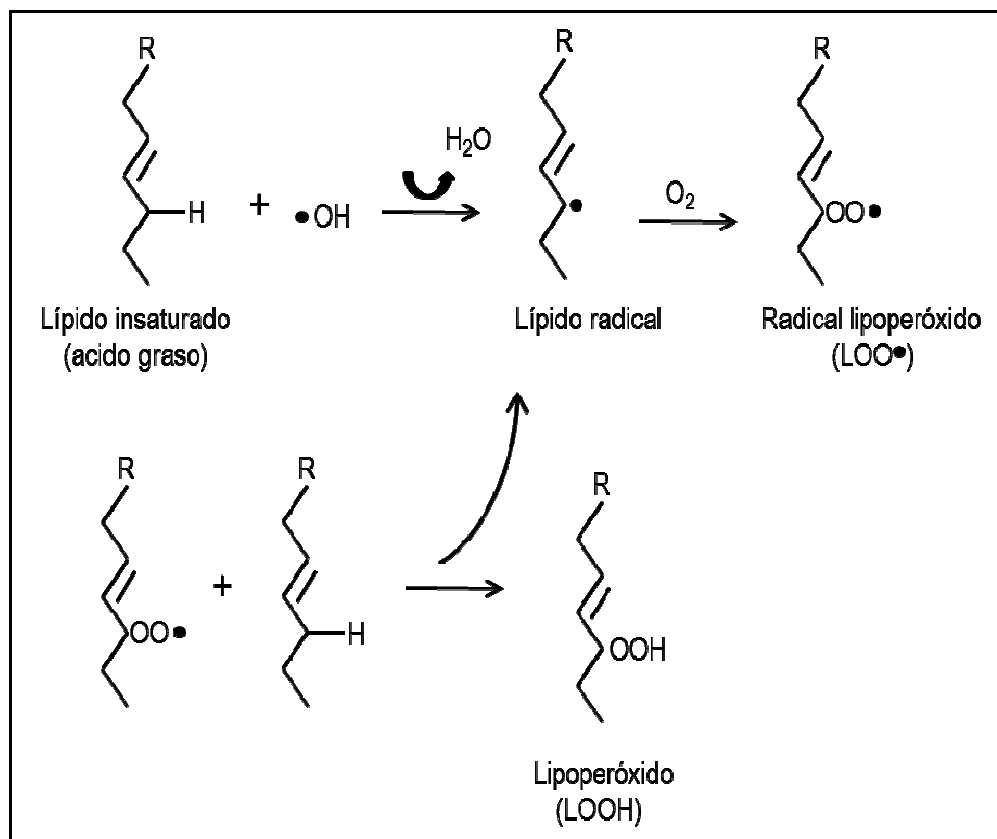


Figura 8. Mecanismo de la peroxidación lipídica.

Si la reacción no termina con rapidez, habrá daño en la membrana celular. La peroxidación lipídica puede seguir propagándose en presencia de metales de transición existentes en el plasma o que ingresan por las zonas dañadas de la membrana. Como consecuencia de la peroxidación lipídica aumenta la permeabilidad de las membranas, liberándose al medio los componentes que la integran y produciéndose la muerte celular [51].

Además, el cobre puede catalizar otra reacción redóx. Reacciona con un lipoperóxido (LOOH), produciendo radicales lipoperóxidos (LOO•) y reactivos radicales alcoxi (LO•):

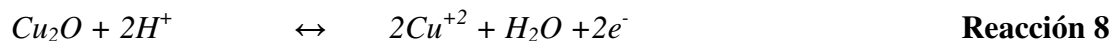
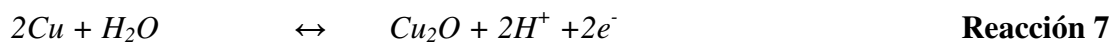


Los radicales alcoxi exacerban el estrés oxidativo de la célula, ayudando a promover la peroxidación lipídica [51,52].

#### 2.2.3.2.- Formación de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ )



Los iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) también son responsables de la actividad antimicrobial del cobre [53]. De acuerdo a lo anterior, los  $\text{Cu}^{+2}$  pueden ser producidos desde reacciones rédox, pero en ambientes acuosos el cobre también puede producir  $\text{Cu}^{+2}$  por procesos de oxidación o corrosión. En presencia de agua y oxígeno, el cobre libera iones de acuerdo a los siguientes mecanismos [11,54]:



Los iones cúpricos pueden formar complejos orgánicos con azufre-, nitrógeno- u oxígeno, reemplazando otros elementos como hierro, contenidos en los grupos funcionales presentes en los microorganismos. Esto podría causar defectos en la estructura del ácido ribonucleico (ARN) y proteínas, y producir interferencia con la fosforilación oxidativa y el balance osmótico. Por otra parte, los iones  $\text{Cu}^{+2}$  tienen afinidad con el ácido desoxirribonucleico (ADN), produciendo desórdenes en la estructura helicoidal, mutaciones o previniendo la reproducción del microorganismo [15,32,43,50,51,52].

Recientemente, los principales mecanismos antimicrobiales del cobre fueron ilustrados por Grass y sus colaboradores [55]:

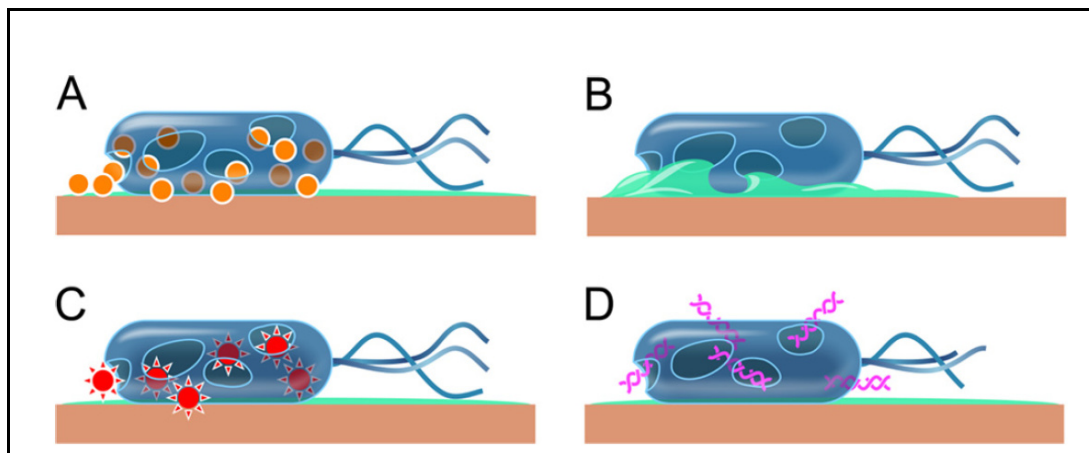


Figura 9. Mecanismos antimicrobiales tentativos del cobre: A) Cobre disuelto daña la membrana celular; B) Ruptura de la membrana, causando pérdida del contenido citoplasmático; C) Iones cobre inducen la generación de especies reactivas que dañan la célula y D) Degradación del ADN [55].

La liberación de  $\text{Cu}^{+2}$  permite que el cobre se comporte como un agente antiadherente o *antifouling* (ver Sección 2.3), siendo uno de los más utilizados aditivos en pinturas para aplicaciones *antifouling*. El cobre evita la adhesión de bacterias y diatomeas sobre superficies inmersas en el mar [11,14,15,54,56].

#### 2.2.4.- Factores que afectan la actividad antimicrobial del cobre

La efectividad antimicrobial del cobre es influenciada por diferentes factores:

##### A. Biológicos

La sensibilidad del microorganismo depende de la etapa de crecimiento en que se encuentre, estado nutricional, preexistencia de daño celular, capacidad de adaptación fisiológica-genética y concentración celular. Se ha demostrado que una cepa *Escherichia coli* resistente es capaz de crecer en presencia de 20mM de cobre, mientras que una cepa sensible soporta 6mM. En contraste, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* es muy susceptible al cobre, su cepa resistente es inhibida con 1,6mM de cobre y su cepa sensible con 0,4 mM [48].

##### B. Físico-Químicos

El pH, potencial rédox (Eh), aeración, humedad, temperatura, intensidad de la luz, enlaces del cobre con otros constituyentes e interacciones con otros iones afectan su toxicidad frente a los microorganismos. La estabilidad de varios complejos de Cu (inorgánicos y orgánicos) es pH dependiente, influenciando en la forma y, por lo tanto, en la toxicidad del Cu.

### **C. Tamaño y forma de la partícula de cobre**

Varios estudios confirman que las nanopartículas de cobre tiene mayor eficacia antimicrobial que el cobre de tamaño micro o macrométrico. Esto es debido a que las nanopartículas tienen una alta razón superficie/volumen (área específica) y gran energía superficial [57-58]. Estas propiedades permiten que las nanopartículas muestren un buen desempeño en los procesos de liberación de iones  $\text{Cu}^{+2}$  en periodos de tiempo cortos. Algunas investigaciones sugieren que la buena eficacia antimicrobiana de las nanopartículas de cobre se debe a su estrecha interacción con las membranas celulares [57], debido a su pequeño tamaño.

S. Pal y colaboradores [59] estudiaron el efecto de forma de nanopartículas de plata con igual superficie específica testeadas con la bacteria *Escherichia coli*. Se reportó un mejor efecto de nanopartículas triangulares en contraste con nanopartículas esféricas o en forma de barras, debido a que su plano basal corresponde la familia de planos {111}. Se ha demostrado que la reactividad se ve favorecida por la alta densidad atómica de algunos planos [60].

#### **2.2.5.- Actividad antimicrobial de nanopartículas de cobre**

Las características antimicrobiales han sido recientemente extendidas a nanopartículas de cobre en estado metálico y en estado oxidado. También nanopartículas de cobre soportadas en varios materiales, como sílice, zeolita, arcilla o carbón activado, o modificadas superficialmente, por ejemplo con sílice o tioles, han exhibido propiedades antimicrobiales.

##### ***2.2.5.1.- Nanopartículas de cobre en estado metálico y en estado oxidado***

La efectividad antimicrobial de nanopartículas de cobre metálico y nanopartículas de óxidos de cobre fue demostrada contra numerosas bacterias involucradas en las infecciones intrahospitalarias, como se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración Mínima Bactericida (CMB) de nanopartículas en estado metálico y en estado oxidado [57].

Cepa	CMB [ug/mL]				
	Ag	ZnO	Cu <sub>2</sub> O	CuO	Cu
EMRSA-16 <sup>(*)</sup>	100	5000	2500	1000	250
EMRSA-15	100	5000	2500	250	250
MRSA 252	100	>5000	2500	1000	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> (Golden)	100	2500	2500	2500	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> (Oxford)	100	5000	2500	100	250
<i>Staphylococcus epidermidis</i> SE-51	100	2500	2500	2500	500
<i>Staphylococcus epidermidis</i> SE-4	100	2500	2500	2500	1000
<i>Escherichia coli</i> NCTC 9001	100	>5000	500	250	250
<i>Proteus</i> spp.	100	>5000	5000	5000	2500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAOI	100	>5000	2500	5000	2500

(\*) EMRSA: epidemic meticillin-resistant *S. aureus*; MRSA: meticillin-resistant *S. aureus*.  
Concentración inicial  $\approx 5 \times 10^7$  [CFU/mL] (CFU: unidades formadoras de colonias)

La Tabla 3 muestra la Concentración Mínima Bactericida (CMB), que se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (en este caso 24 horas). Los resultados corresponden al estudio realizado por Ren y colaboradores [57], que concluyen que las nanopartículas de plata (Ag) son las más efectivas, previniendo la proliferación de los patógenos estudiados, seguido de las nanopartículas de cobre y sus óxidos. El tamaño de las nanopartículas consideradas se encontró en un intervalo de 22-95 nm.

También se ha señalado que las nanopartículas de cobre tienen especificidad en inhibir o matar a ciertos microorganismos. Por ejemplo, un estudio comparó la eficiencia antimicrobiana de nanopartículas de plata (3 nm) y nanopartículas de cobre (10 nm) contra varios microorganismos responsables de las IHH, según se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de nanopartículas de plata y nanopartículas de cobre sobre diferentes microorganismos [67]

Bacteria	Cepa	CMI [ug/mL]		CMB [ug/mL]	
		Ag	Cu	Ag	Cu
<i>Escherichia coli</i>	MTCC 443	40	140	60	160
<i>Escherichia coli</i>	MTCC 739	180	220	220	260
<i>Escherichia coli</i>	MTCC 1302	120	200	160	220
<i>Escherichia coli</i>	MTCC 1687	140	280	180	300
<i>Bacillus subtilis</i>	MTCC 441	40	20	60	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCIM 2079	120	140	160	160
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCIM 5021	120	140	160	160
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCIM 5022	120	140	160	160

En la tabla anterior se cuantificó la CMB y la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria); esta última se define como la mínima concentración del antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de un periodo determinado. En este caso, ambas concentraciones se determinaron después de 24 horas. El estudio mostró que la bacteria *Bacillus subtilis* es más sensible a las nanopartículas de cobre y que todas las cepas de *Staphylococcus aureus* exhiben idéntica sensibilidad frente a nanopartículas de cobre o plata. Sin embargo, no todos los estudios concuerdan. Yoon y colaboradores [61] reportaron que nanopartículas de cobre (100nm) comparadas con nanopartículas de plata (40nm) tienen mejor efecto bactericida sobre *Escherichia coli* y un efecto similar sobre *Bacillus subtilis*. Ellos estimaron que para obtener una eficiencia antimicrobial del 90% contra *Escherichia coli* es necesario el doble de la concentración de nanopartículas de plata que de cobre.

#### 2.2.5.2.- Nanopartículas de cobre soportadas en sílice

La sílice (SiO<sub>2</sub>) sintetizada a través del proceso de sol- gel (Anexo A) constituye un buen material para ser empleado como soporte de nanopartículas de cobre, al presentar grupos terminales hidroxilo (-OH), los cuales constituyen sitios de anclaje para el crecimiento de partículas metálicas.

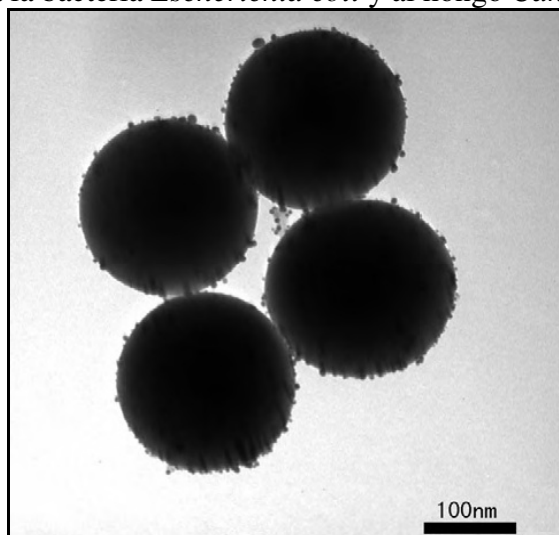
Las investigaciones acerca de nanopartículas de cobre soportadas en sílice son escasas. Kim y colaboradores [121] obtuvieron nanopartículas híbridas de SiO<sub>2</sub>/Cu, sintetizando en primer lugar las nanopartículas de SiO<sub>2</sub> (88nm) por el método sol-gel, y luego anclando nanopartículas de Cu (10nm) en la superficie de la sílice tras la reducción de CuCl<sub>2</sub> (Figura 10). La actividad antimicrobial fue examinada por el método de disco de

difusión<sup>5</sup> con *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans* y *Penicillium citrinum* como bacterias indicadoras, mostrando actividad antimicrobial.



Figura 10. Imagen TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) de nanopartículas de cobre de 10 nm soportadas en sílice de 88 nm [121].

Recientemente, Zhang y colaboradores [62] sintetizaron esferas de sílice (200 nm) por el método Stöber y posteriormente soportaron nanopartículas de cobre (25 nm) por la reducción de  $\text{CuSO}_4$  en presencia de Fe. Demostraron mediante el test de disco de difusión que el híbrido elimina a la bacteria *Escherichia coli* y al hongo *Candida albicans*.



<sup>5</sup> Método de disco de difusión: Técnica cualitativa. El microorganismo se inocula en placas agar y sobre su superficie se disponen discos con una cantidad conocida de antimicrobiano. Después de 16-24 horas a 35°C se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor del disco y se compara con las referencias publicadas en el NCCLS (siglas en inglés para "National Committee for Clinical Laboratory Standards") para clasificar al microorganismo en Sensible, Resistente o Intermedio (S,R o I).

Figura 11. Imagen TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) de nanopartículas de cobre (25 nm) soportadas en sílice (200 nm) [62].

Trabajos relacionados con nanopartículas de plata soportadas en sílice son más numerosos. Xu y colaboradores [63] sintetizaron nanopartículas con un núcleo esférico de Ag (14-16 nm) y una cáscara amorfa de SiO<sub>2</sub> (15-28 nm). Por Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) concluyeron que exhibían excelente actividad antimicrobial sobre *Escherichia coli*. Por su parte, el grupo de Jeon [64] preparó películas delgadas de sílice (0,7 μm) con nanopartículas de plata (15-23 nm). Las películas tenían buena eficiencia antimicrobial contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Akhavan y Ghaderi [65] obtuvieron películas de sílice con alta concentración de nanopartículas plata (35-80 nm) en la superficie. Por conteo de colonias bacterianas en placa (detalles de la técnica en sección 4.4.1) se determinó su actividad bactericida contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

### 2.2.5.3.- Nanopartículas de cobre modificadas superficialmente por tioles

La modificación superficial orgánica (funcionalización) de nanopartículas es una de las estrategias usadas para evitar la agregación de éstas una vez añadidas a alguna matriz polimérica. Por ejemplo, Gelves y colaboradores [66] estudiaron la dispersión de nanoalambres de cobre (25 nm×1,29 μm) funcionalizados superficialmente con alcanotioles (R-SH, con R grupo alcano) e incorporados en una matriz de poliestireno. Observaron una mejora en la dispersión al decrecer la tensión superficial entre las fases nanopartículas y polímero (ver Figura 12).

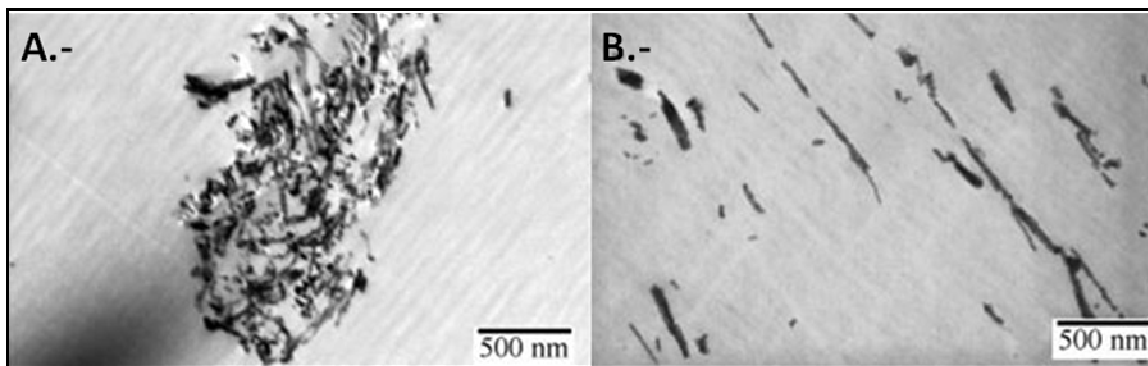


Figura 12 . Poliestireno con A) Nanoalambres de cobre y B) Nanoalambres de cobre funcionalizados con octanotiol (C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>SH).

Además, las nanopartículas de cobre funcionalizadas han demostrado exhibir propiedades antimicrobianas. K. Anyaogu y colaboradores [136] incorporaron nanopartículas de cobre funcionalizadas con hexanotioles a una matriz acrílica, encontrando que el material exhibía actividad contra microorganismos comunes en

*biofouling*: alga verde (*Chlamydomonas*), cianobacterias (*Synechocystis* y *Synechococcus*) y una diatomea (*Phaeodactylum tricornutum*).

## 2.2.6.- Nanopartículas de cobre *versus* nanopartículas de plata

Las nanopartículas de cobre y plata han ganado gran importancia como agentes antimicrobiales debido a su efectividad contra un amplio rango de microorganismos, incluidos los multi-resistentes. Sin embargo, las nanopartículas de plata han sido las más estudiadas.

El extendido uso de la plata se explica por su fuerte acción tóxica contra organismos procariontes (todo tipo de bacterias), pero es mucho menos tóxica sobre organismos eucariontes (como hongos) [120]. En este aspecto, el cobre ha sido usado por siglos como efectivo fungicida. Otra consecuencia es que la plata no es considerada comúnmente como agente de prevención del *fouling* marino, debido a la diversidad de microorganismos eucariontes y procariontes que se encuentran en el mar.

Como agentes antimicrobiales, se ha demostrado que las nanopartículas de cobre tienen cierta especificidad contra las bacterias *Bacillus subtilis* [61,67] y *Escherichia coli* [61], que las nanopartículas de plata no poseen.

A nivel biológico, el cobre es elemento esencial para la vida, mientras que la plata es altamente tóxica al ser consumida, lo que limita su rango de aplicaciones. En el aspecto económico, según la Comisión Chilena del Cobre (Cochilco), la libra de plata vale US \$ 318,08, mientras que la de cobre sólo US \$ 3,17<sup>6</sup> [68]. Esta diferencia se extrapola a los precios de nanopartículas comerciales. Nanopartículas de cobre de 25 nm se comercian en US \$374/100g, mientras que nanopartículas de plata de 35 nm tienen un precio de US \$753/100g [69,70]. Todo lo anterior se sintetiza en la siguiente tabla:

Tabla 5. Comparación de las nanopartículas de cobre y las nanopartículas de plata.

NANOPARTÍCULAS DE COBRE	NANOPARTÍCULAS DE PLATA
Antimicrobial <i>Antifouling</i>	Antibacterial
Especificidad antibacterial contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Escherichia coli</i>	No determinado
Elemento esencial para la vida	Altamente tóxico al ser consumido
Buena relación costo efectividad antimicrobial	Alto costo

<sup>6</sup> Consulta: 01 de agosto de 2013.



## 2.3.- EL COBRE COMO AGENTE ANTIFOULING

La deposición es un proceso que ocurre sobre superficies expuestas a un ambiente biológico o químico activo. En general, cuando la deposición deteriora la superficie es llamado *fouling* [11]. Tanto el *fouling* inorgánico como el *fouling* orgánico (*biofouling*) son posibles.

El *biofouling* marino es la adhesión de especies marinas cuando un material sólido es inmerso en el mar. Este proceso se desarrolla en varias etapas de manera secuencial: en el momento de la inmersión empieza la adhesión de glicoproteínas y otros compuestos a la superficie sumergida, seguida del asentamiento de bacterias, diatomeas y protozoos (*microfouling*), los cuales acondicionan la superficie para el posterior asentamiento de esporas de algas y larvas de invertebrados, que a su vez crecen y se desarrollan sobre la superficie inmersa (*macrofouling*) [71]. El proceso del *biofouling* obedece a la necesidad que tienen muchos organismos de asentarse sobre una superficie como parte de su ciclo de vida y, si bien se da naturalmente y en muchos casos es deseable, se ha convertido en un problema para la industria naval y petrolera principalmente, ya que las embarcaciones, plataformas y demás estructuras sumergidas se van deteriorando de manera gradual, requiriendo extensos, complejos y costosos procesos de limpieza. Para disminuir el asentamiento de organismos sobre superficies sumergidas se están utilizando pinturas y recubrimientos denominados *antifouling*, tales como el tributilestaño (TBT) y algunos derivados de cobre, que si bien disminuyen el *biofouling*, también generan grandes problemas ambientales debido a su toxicidad y bioacumulación [56], por lo que su uso está regulado y, en algunos casos, prohibido. Por ello, la Organización Marítima Internacional (IMO) prohibió el uso de TBT a partir de año el 2008 [72].

Se estima que el *biofouling* marino causa pérdidas económicas de más de \$5,7 billones de dólares por año en el mundo entero, derivadas de su prevención y control [73]. Uno de los principales problemas que puede causar es el aumento del peso de embarcaciones marinas, lo que genera un incremento del consumo de combustible de hasta un 40% y un aumento en los costos de viaje de hasta un 77% [74].

### 2.3.1.- Aspectos básicos del *biofouling*

#### 2.3.1.1.- Mecanismo de formación del biofilm

La etapa primaria de formación del *biofouling* marino corresponde a la formación de un biofilm. Un biofilm se forma tras la adhesión de grupos de células microbianas a una superficie y se produce en todos los medios donde existan bacterias. Solo necesitan de ambiente hidratado y una mínima presencia de nutrientes y pueden desarrollarse en superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas<sup>7</sup> [75]. Por ejemplo, se forman

---

<sup>7</sup> Biótico: hace referencia a aquello que resulta característico de los organismos vivos o que mantiene un vínculo con ellos.

biofilms sobre las rocas marinas y los cascos de los barcos, en tuberías, en la flora intestinal de los animales, en la placa dental, o contaminando dispositivos médicos como catéteres y marcapasos. En los últimos años, se ha demostrado que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente en una forma planctónica o libre, sino que la mayoría se encuentran formando parte de los biofilms [77].

El biofilm se compone principalmente de agua, llegando a representar hasta el 97% del biofilm. Los microorganismos como bacterias, hongos, algas y protozoos, pueden llegar a representar el 15%-20% del volumen. Además, el biofilm está formado por exopolisacáridos (EPS), producidos por los propios microorganismos. En menor cantidad, se encuentran sustancias poliméricas extracelulares (SPE) como polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas. También se compone de nutrientes absorbidos, metabolitos, productos de la lisis celular y sustancias inorgánicas (por ejemplo, cristales de sales minerales, partículas de corrosión, sedimentos) [76,77]. Los EPS pueden estar asociados con iones metálicos y cationes bivalentes, pueden tener carga neutra o aniónica. Los biofilms pueden ser aniónicos debido a la presencia de ácidos urónicos (por ejemplo, D-glucurónico, D-galacturónico y ácido manurónico) o ácido pirúvico [76].

El biofilm no es sólido, tiene forma tridimensional, espacios intersticiales huecos que permiten el flujo de agua, la difusión de nutrientes y oxígeno al interior y la expulsión de desecho metabólico. La formación de un biofilm es un proceso dinámico que puede ser dividido en 4 etapas, según se ilustra en la Figura 13 [11, 75,77,78, 79]. Las etapas involucradas en la formación de un biofilm se describen a continuación:

**(1) Film acondicionado:** la superficie es cubierta con una monocapa de material flotante. Ésta se compone de sustancias inorgánicas y compuestos orgánicos, como glicoproteínas, polisacáridos y proteínas, que proveen de una superficie pegajosa para la adhesión de microorganismos.

**(2) Adsorción reversible:** las bacterias tienen quimiorreceptores (fimbrias, flagelos o *pili*) que les permiten fijarse sobre los compuestos orgánicos presentes en el film de acondicionamiento. Debido a que se encuentran débilmente unidas a la superficie, logran moverse (movimiento browniano) y fácilmente pueden ser removidas.

**(3) Adsorción irreversible:** las bacterias adsorbidas comienzan a dividirse formando microcolonias, y secretan exopolisacáridos (EPS) que constituyen la matriz del biofilm. Éste comienza a desplegarse a formación tridimensional, generando estructuras similares a setas.

**(4) Desprendimiento:** luego que el biofilm ha alcanzado la madurez, algunas células se liberan para poder colonizar nuevas superficies. Los mecanismos para generar desprendimiento por interacción con el ambiente son erosión (remoción de pequeñas partes), separación (remoción rápida y masiva) y abrasión (liberación por colisión de partículas del líquido circundante con el biofilm).

---

*Abiótico: se refiere al entorno en el que no puede desarrollarse la vida.*

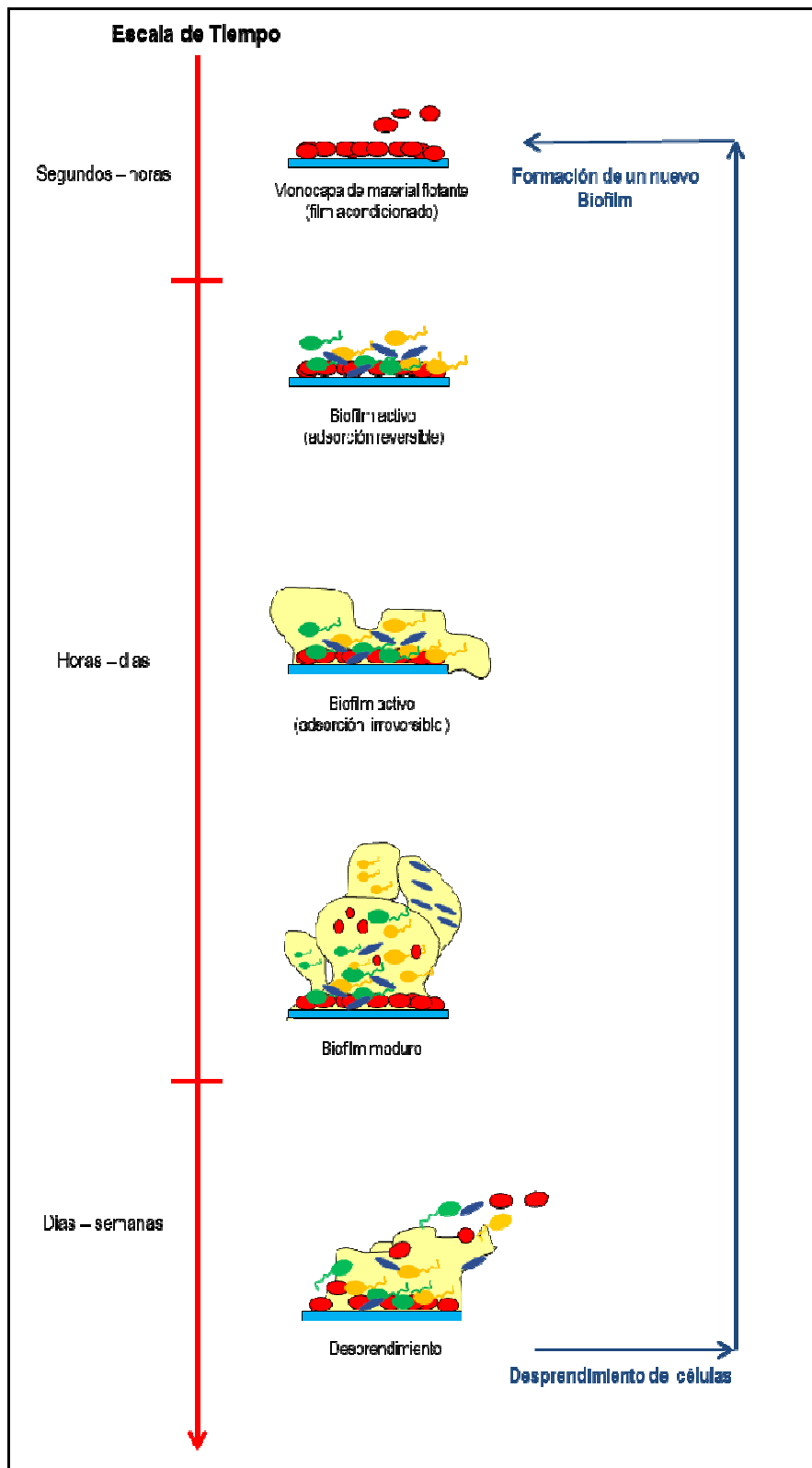


Figura 13. Diagrama esquemático de las etapas que involucran la formación de un biofilm. Rajbir y colaboradores, 2006 [75].

### 2.3.1.2.- Mecanismo de formación del biofouling

Los organismos causantes del *biofouling* son principalmente formas sésiles<sup>8</sup> que están naturalmente en el mar [11,77,78,79]. Todos estos seres viven asentados sobre una superficie o sustrato, ya sea natural o artificial. En este sentido, los cascos de los barcos, la maquinaria submarina, los sensores oceanográficos y, en general, cualquier estructura o superficie sumergida constituyen para estos organismos una plataforma ideal sobre la cual asentarse. Se han reportado más de 4.000 organismos responsables del *biofouling*, desde microscópicas bacterias marinas a moluscos, artrópodos y macroalgas [14].

El *biofouling* marino es un proceso que se puede describir en 3 etapas, formación de un film de acondicionamiento, *microfouling* y *macrofouling*, según se ilustra en la Figura 14. Costerton y colaboradores [80] estudiaron la formación del *microfouling* sobre superficies metálicas. Ellos observaron que una vez que las primeras bacterias colonizan la superficie, producen los exopolisacáridos (EPS); determinando que el crecimiento y desarrollo del biofilm dependerá de la temperatura, pH, velocidad del agua y rugosidad superficial [81]. Cuando el biofilm madura, es decir, crece y engrosa, observaron que las bacterias aeróbicas consumen el oxígeno cercano a la interface metal-biofilm y el resto de ellas se ubica en las capas exteriores, donde el oxígeno logra penetrar, mientras que las bacterias anaeróbicas se ubican en las capas internas del biofilm. La colonización secundaria ocurre una vez que una efectiva microcolonia se forma.

---

<sup>8</sup> Forma sésil: crecen adheridas a una superficie. Forma planctónica: crecen nadando libremente en el medio líquido.

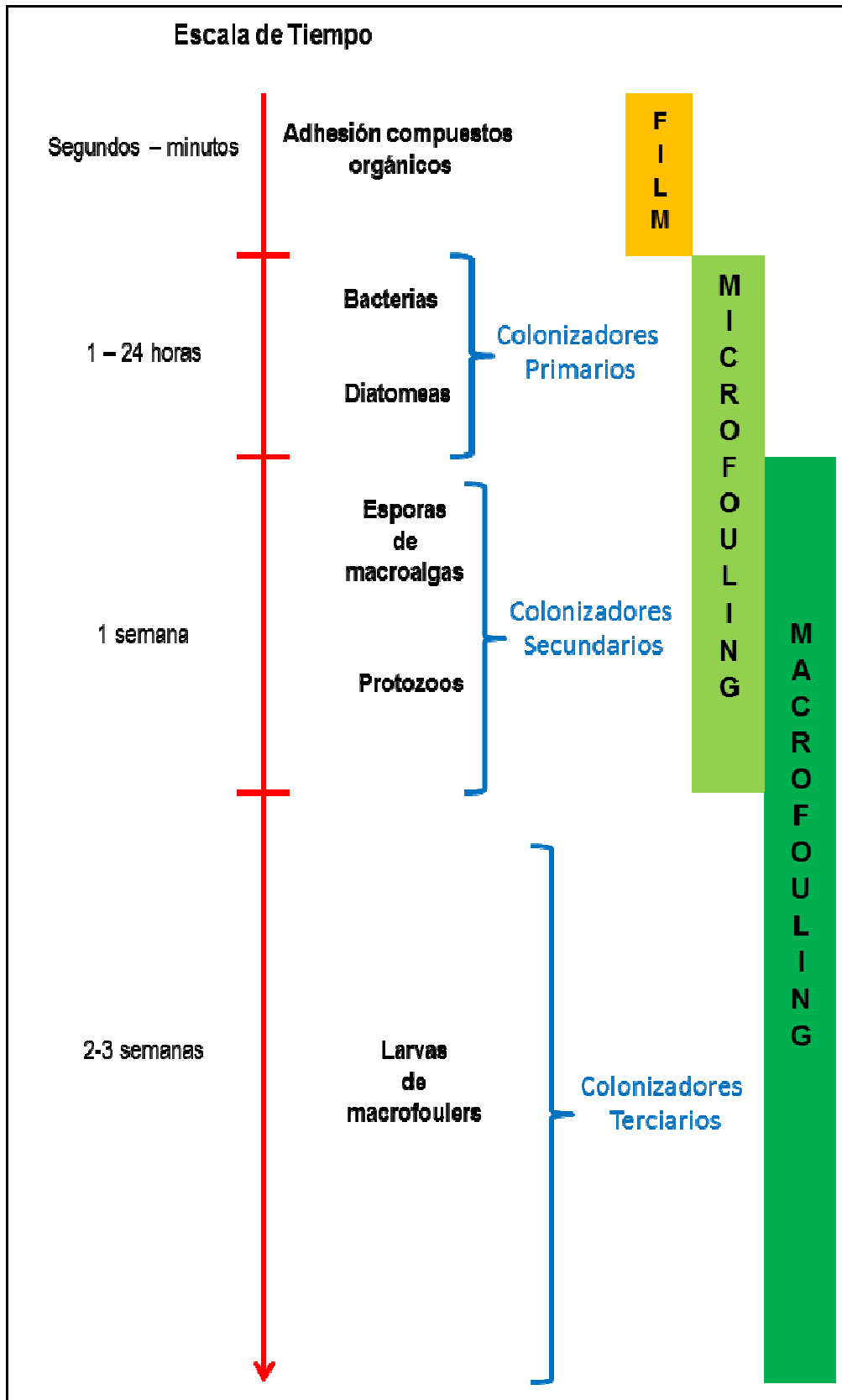


Figura 14. Etapas de formación del *Biofouling*. Yebra y colaboradores, 2004[74].

### 2.3.2.- Propiedad *antifouling* del cobre

Las propiedades *antifouling* del cobre y sus aleaciones son ampliamente utilizadas para el diseño de equipamiento marino. El cobre tiene un efecto tóxico sobre muchos organismos marinos, debido a que en ambientes acuosos puede liberar iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ). En presencia de agua y oxígeno, el cobre libera  $\text{Cu}^{+2}$  de acuerdo al mecanismo expuesto en la Sección 2.2.3.2. [11,54].

La efectividad *antifouling* del cobre es influenciada por muchos parámetros, como condición y edad del organismo, composición química del agua y concentración de iones de cobre. Pocas investigaciones son capaces de monitorear *in situ* la velocidad de liberación de cobre en condiciones reales. Estas mediciones son difíciles de realizar con resultados reproducibles debido, por ejemplo, a discrepancias en los parámetros antes mencionados, diferencias en la formación del biofilm y el efecto del movimiento del agua. Por ello, en la literatura han sido reportados diferentes valores para la velocidad mínima de corrosión de cobre capaz de evitar el *fouling* marino.

El investigador Efir y sus colaboradores [82] expusieron al mar cobre puro y aleaciones de cobre- níquel (90/10 y 70/30) durante un período de 5 años. Sus resultados mostraron que después de 9 meses el cobre puro sólo presenta una película verde de hidroxloruro de cobre ( $\text{Cu}_2\text{Cl}[\text{OH}]_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ), luego de 36 meses comenzó a mostrar adherencia de organismos marinos y recién a los 60 meses, el 60% de su superficie se encontraba cubierta de *fouling* marino. Las aleaciones mostraron una apariencia similar al cobre puro luego de 60 meses, pues un 70% de su superficie fue cubierta por *fouling*. Aunque reportaron que la velocidad de corrosión de las aleaciones fue un tercio de la velocidad del cobre puro, la resistencia al *fouling* fue la misma. Finalmente, concluyeron que la velocidad de corrosión de las aleaciones fue suficiente para suprimir el *fouling* durante un periodo menor a 60 meses, esta velocidad se registró entre  $2,5 - 5 \text{ ug cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ . Posteriormente, Efir [83] reportó que después de 14 años la resistencia al *fouling* del cobre y sus aleaciones continuó, debido a que la capa de óxido de cobre formada en su superficie también es tóxica para los microorganismos marinos. Después de que las superficies se cubrieron con una capa de  $\text{Cu}_2\text{Cl}[\text{OH}]_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$  durante los primeros meses, esta capa se desprendió con facilidad al ser pobremente adherente, quedando óxido de cobre expuesto.

Por otra parte, Lennox y colaboradores [84] encontraron que la mínima velocidad de corrosión de  $5 \text{ ug/cm}^2\text{día}$  es suficiente para evitar el *fouling*, mientras que Swain y sus colaboradores [85] señalaron que se necesita una velocidad de  $10 \text{ ug cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ . Más específicos fueron los valores encontrados por Banfield y colaboradores [86]: ellos reportaron una tasa de  $10 \text{ ug cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$  para evitar la adherencia de moluscos, mientras que una tasa de  $20 \text{ ug cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$  es efectiva contra las diatomeas.

Es importante notar que la resistencia a la corrosión de las aleaciones de cobre dependerá de su composición y, por ello, sólo algunas se utilizan en equipamiento marino, según se resume en la

Tabla 6:

Tabla 6. Resistencia a la corrosión del cobre y sus aleaciones [87].

CLASIFICACIÓN	COMPOSICIÓN	RESISTENCIA A LA CORROSIÓN
Cobre	>94% de cobre	Baja resistencia a la corrosión marina Evita el <i>biofouling</i>
Latones (Cu-Zn)	≥ 15% de zinc	Baja resistencia en soluciones acuosas. Evita el <i>biofouling</i> .
Bronces al fósforo (Cu-Tin)	Todas	Buena resistencia a la corrosión marina.
Bronces al aluminio (Cu-Al)	Todas	Muy buena resistencia en soluciones acuosas a alta temperatura.
Cobre- Níquel (Cu-Ni)	Todas	Excelente resistencia a la corrosión en soluciones acuosas.

### 2.3.2.1.- Actividad antibacterial del cobre en ambientes acuosos

La efectividad *antifouling* del cobre y sus aleaciones, ha sido estudiada contra diferentes tipos de bacterias en ambientes con abundante agua. Se testaron cañerías de cobre y tres tipos de plásticos con agua de suministro sin cloro y con presencia de *Escherichia coli*. Según se reportó, la cañería de cobre reduce drásticamente el número de bacterias, mientras que en los polímeros la reducción es pequeña, como se observa en la Tabla 7 [88]:

Tabla 7. Reducción de *Escherichia coli* sobre diferentes cañerías. PVC: Policloruro de vinilo.

Tiempo	Reducción de <i>Escherichia coli</i>			
	[%]			
[h]	PVC	PVC reticulado	Polibutileno	Cobre
5	32	11	7	99
24	25	1	8	100

También se han estudiado los efectos de cañerías de vidrio, PVC (Policloruro de vinilo) y cobre sobre la supervivencia de *Legionella pneumophila* en agua de suministro. Se observó que el cobre reduce en un 100% en número de bacterias después de 24 horas, efecto que perduró por 6 meses [88].

Para la protección contra el *biofouling*, comercialmente se ha desarrollado un producto con matriz elastomérica que protege soportes estructurales, travesaños y tuberías. Consiste en un recubrimiento de 3 mm de espesor, con una matriz de policloropropeno y pequeñas barras de cobre-níquel como relleno. Cerca del 30% del relleno está expuesto sobre la superficie y se reporta que es suficiente para evitar el *biofouling* [89,169].



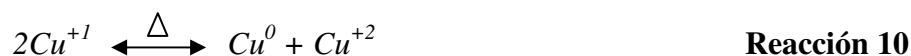
### 2.3.2.2.- Normativa de concentración de cobre en el mar

Para proteger a los organismos marinos y la vida de animales no acuáticos que forman parte de los paisajes marítimos, algunos países establecieron criterios de concentraciones de cobre permitidas. En Reino Unido, la Calidad Estándar Medioambiental actual para el cobre en el mar es  $5 \text{ ug L}^{-1}$  (expresado como promedio anual) [90]. Por otro lado, la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos ha derivado un criterio de calidad del agua salada para organismos acuáticos (WQC) [91], el límite de concentración para la toxicidad crónica es de  $3,1 \text{ ug L}^{-1}$  de cobre total y la toxicidad aguda se alcanza con  $4,8 \text{ ug L}^{-1}$ .

### 2.3.3.- Corrosión del cobre

#### 2.3.3.1.- Aspectos generales

El cobre es un metal de transición con número atómico 29, siendo su configuración electrónica  $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$ . El electrón desapareado de la capa externa 4s y los electrones de la capa 3d participan en el enlace metálico, por ello el Cu tiene más de un estado de oxidación. Sus estados de oxidación son cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) y cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) que tiene una configuración  $3d^9$  al haber perdido al electrón de la capa s y a un electrón de la capa d, mientras que estados de oxidación mayores son muy difíciles. Gracias a la labilidad de los electrones externos de los orbitales 3d y 4s, los niveles de energía se superponen, permitiendo al elemento cambiar fácilmente de monovalente a divalente, por ejemplo:



El equilibrio puede ser fácilmente desplazado en cualquier dirección y la transición requiere un mínimo de energía de activación. Debido a los posibles cambios de oxidación del cobre, es susceptible a procesos de corrosión tanto seca (oxidación a alta temperatura) como húmeda (electroquímica). Esta última corresponde a un proceso electroquímico que envuelve el movimiento de electrones desde un área anódica a una catódica. Para metales puros y aleaciones expuestas al medio ambiente, la principal reacción es la oxidación a la forma iónica y la liberación de electrones (reacción anódica):



Y la reducción obligada del oxígeno presente para formar agua (reacción catódica):



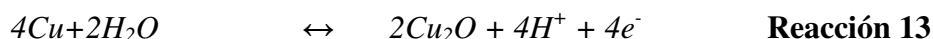
### 2.3.3.2.- Corrosión del cobre en ambientes acuosos

La corrosión del cobre y sus aleaciones depende de los diferentes ambientes en que son utilizados. Según se observa en la Tabla 8 las mayores tasas de corrosión electroquímica se tienen en ambientes acuosos, como agua potable y agua de mar:

Tabla 8. Corrosión del cobre y sus aleaciones bajo diferentes ambientes de aplicación [92].

APLICACIÓN	CORROSIÓN [μm/año]
Construcción	~0,5-2,5
Agua potable	~10
Marina	~50
Industrial	Variable
Eléctrica	Variable

La corrosión en medios acuosos es la disolución física más o menos uniforme de la superficie de un metal a causa del movimiento de electrones desde un área anódica a una catódica. La velocidad a la cual ocurre varía con el pH, la temperatura, el oxígeno disuelto (OD) y la presencia de iones agresivos como haluros, sulfuros, entre otros. Cuando el cobre se corroe, ocurren dos procesos, uno es la disolución del metal (reacción anódica):



Esta podría estar balanceada por una reacción catódica. Si la disolución ocurre en soluciones que contienen oxígeno disuelto (OD), la principal reacción catódica es la reducción de OD:



En consecuencia, la reacción global es:



En otras ocasiones, menos frecuentes, la reacción catódica es la reducción de iones hidrógeno a gas hidrógeno:



Generalmente, la velocidad de la reacción anódica (disolución del metal) decrece gradualmente con el tiempo porque los productos de la oxidación (productos de la corrosión) se adhieren a la superficie formando una capa protectora que actúa como barrera a la difusión. Este fenómeno se conoce como pasivación. Este fenómeno se produce porque una delgada capa de óxido cuproso ( $Cu_2O$ ) se forma en la superficie del cobre y actúa como barrera a los procesos de difusión y, por tanto, reduce la corrosión. Esta capa se origina por

transporte de masa de los iones  $\text{Cu}^+$  y de los electrones en dirección normal a la superficie vía vacancias. Posteriormente, existe una segunda etapa de oxidación, la formación de  $\text{CuO}$  desde  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Este proceso es lento y se produce únicamente por la difusión de oxígeno [93]. En estos mecanismos de corrosión se asume que la solución acuosa no contiene cloro u otros compuestos capaces de formar compuestos solubles con el cobre.

Existen diversos factores que aceleran o retardan los procesos corrosivos del cobre, los cuales se resumen a continuación:

### A. Físicoquímicos

Factores ambientales determinan la cinética del proceso de corrosión metálica, tales como: tiempo, concentración del ión cloruro, pH, temperatura y oxígeno disuelto (OD).

La corrosión frecuentemente se incrementa con la conductividad eléctrica del electrólito, pues la alta conductividad normalmente es causada por la presencia de iones agresivos que dañan la superficie metálica, como son el cloruro, ácidos fuertes o bases fuertes. Valores típicos de la conductividad en diferentes ambientes acuosos se observan en la Tabla 9.

Tabla 9. Conductividad eléctrica de diferentes ambientes acuosos.

AMBIENTE ACUOSO	CONDUCTIVIDAD [ $\mu\text{S cm}^{-1}$ ]
Agua desionizada	0,055
Agua destilada	0,5 – 2
Agua potable	50-1500
Agua de mar	40000

A esto se debe que anteriormente se haya señalado que las corrosiones más agresivas se producen en ambientes marinos (ver Tabla 8).

Una serie de estudios investigan el comportamiento del cobre en soluciones con diferentes concentraciones del ión cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), pues se le considera como el ión más agresivo. El cobre forma complejos con el  $\text{Cl}^-$ , que forman capas no adherentes en la superficie del metal. Braun y colaboradores [94] encontraron que  $\text{CuCl}_3^{-2}$  es el principal producto en soluciones con altas concentraciones de  $\text{Cl}^-$ , mientras que  $\text{CuCl}_2^-$  predomina en soluciones con concentraciones menores a 0,7 M. En soluciones muy diluidas, el  $\text{Cu}^{+2}$  aparece como producto de la corrosión [95]. Klein y colaboradores [96] observaron que la aleación Cu-Ni (70/30) en agua de mar exhibe resistencia a la corrosión con concentraciones de 1 ppm de  $\text{Cl}^-$ , mientras que a 90 ppm la velocidad de corrosión incrementa significativamente.

Por otro lado, dependiendo del pH, el cobre se disuelve o forma una capa de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (capa de pasivación). La formación de la capa incrementa con la acidez, especialmente a bajas temperaturas. Feng y colaboradores [97] investigaron la corrosión del cobre en agua potable artificial en un amplio rango de pH, como se observa en la

Tabla 10.

Tabla 10. Productos y mecanismos que controlan la corrosión del cobre en soluciones acuosas a varios pH [97].

pH	COMPOSICIÓN CAPA	MORFOLOGÍA PRODUCTOS	MECANISMO DE CONTROL	VELOCIDAD DE CORROSIÓN
3	Cu <sub>2</sub> O	Porosos	Difusión en solución.	↑↑
4-5	Cu <sub>2</sub> O	Cúbico, forma una capa protectora que actúa como barrera a la disolución.	Mezcla de difusión en la solución y entre la capa protectora.	↑
6-9	Cu <sub>2</sub> O	Cúbico, forma una capa protectora que actúa como barrera a la disolución.	Difusión en la capa protectora.	Constante
10	Cu <sub>2</sub> O	Cúbico, capa delgada y compacta que decrece drásticamente la disolución.	Pasivación	↓
12-13	CuO	Capa monoclinica protectora	Difusión en la capa protectora.	↓↓

El efecto de la temperatura es poco claro, ya que cuando la temperatura incrementa la velocidad de corrosión no cambia drásticamente. Si bien la cinética de corrosión es más rápida a temperaturas mayores, simultáneamente se produce una reducción en la concentración de oxígeno disuelto (OD) que podría disminuir la reacción catódica. Melchers [98] observó la relación entre la velocidad de corrosión y temperatura de la aleación Cu-Ni (90/10) inmersa en agua de mar, encontrando que las mayores velocidades de corrosión ocurren entre 18-28°C.

## B. Biológicos

Cuando materiales metálicos se exponen a ambientes biológicamente activos, se forma un biocapa sobre su superficie. Éste puede afectar la cinética de las reacciones catódicas y/o anódicas de la corrosión metálica y modificar la estructura química de la capa protectora formado por los productos de corrosión, consecuentemente la corrosión se puede ver acelerada o inhibida.

El deterioro del metal a causa de la actividad microbiológica de la biocapa o biofilm se conoce como biocorrosión o corrosión influenciada microbiológicamente (CIM). Esta se produce porque las bacterias metabolizan compuestos químicos que aceleran la corrosión localizada, como por ejemplo CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>, ácidos orgánicos e inorgánicos, entre otros [99]. Además, la CIM también se ve favorecida por los exopolisacáridos (EPS) que forman parte del biofilm. Los EPS poseen grupos funcionales aniónicos (por ejemplo, carboxilo, fosfato, sulfato, glicerato, piruvato y succinato), que interaccionan formando enlaces con los iones obtenidos de la disolución metálica. En particular, la afinidad de ligandos aniónicos multidentados con cationes multivalentes, como Ca<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> y Fe<sup>+3</sup>, puede

ser muy fuerte [100]. La Figura 15 representa un esquema simplificado de las reacciones de biocorrosión entre el cobre y los EPS en un biofilm oxigenado.

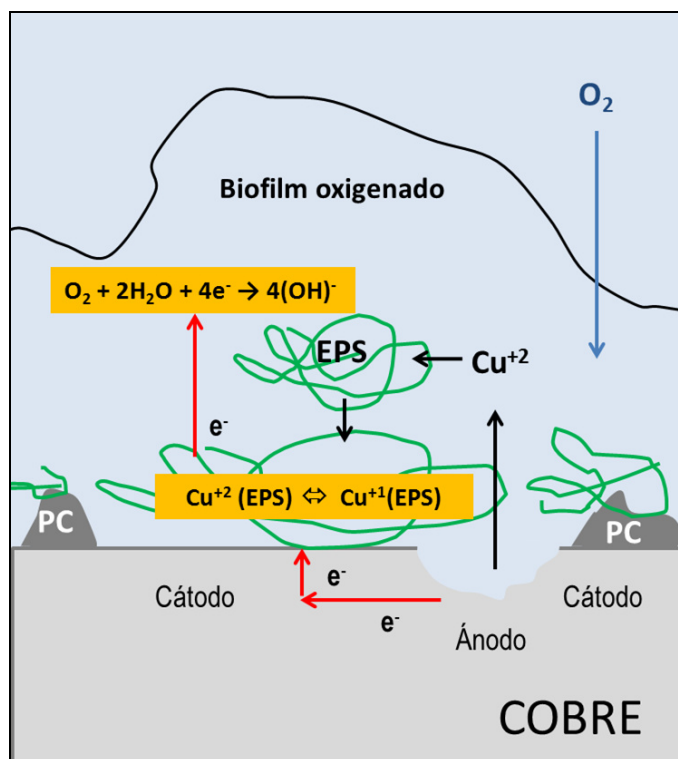


Figura 15. Reacciones de biocorrosión del cobre en presencia de un biofilm oxigenado. PC: productos de corrosión. Beech y colaboradores, 2004[100].

Para el caso del cobre (Figura 15) el ión  $\text{Cu}^{+2}$ , obtenido como resultado de la disolución del metal, forma un complejo  $\text{Cu}^{+2}$ -EPS que se deposita en la superficie del metal. Los electrones involucrados se transfieren desde la zona anódica hasta el complejo  $\text{Cu}^{+2}$ -EPS, reduciendo el  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ . Sin embargo, en presencia de oxígeno el  $\text{Cu}^{+1}$  es oxidado nuevamente a  $\text{Cu}^{+2}$  catalizando un ciclo redox que incrementa la corrosión.

### C. Especiación del cobre [101]

El ión cuproso ( $\text{Cu}^{+}$ ) es inestable en solución, tendiendo a oxidarse a cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) y solamente los compuestos cuprosos insolubles son estables en agua, como son  $\text{Cu}_2\text{S}$ ,  $\text{CuCN}$  y  $\text{CuF}$ , mientras que el  $\text{Cu}^{+2}$  puede formar complejos estables con  $\text{NH}_3$ ,  $\text{Cl}^{-}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$  y  $-\text{OH}$  presentes en el medio.

Las principales especies solubles de cobre encontradas en agua de mar y agua fresca son  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cu}(\text{HCO}_3)^{+}$  y  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . La concentración del cobre disuelto dependerá de la presencia de cationes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ) que compiten, aniones de sales cúpricas insolubles ( $\text{OH}^{-}$ ,  $\text{S}_2^{-}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{CO}_3^{-2}$ ) y agentes inorgánicos y orgánicos. Si la concentración de algún anión es suficiente para exceder la solubilidad de una sal de cobre, ocurre la precipitación de la sal. Los precipitados más importantes formados en agua natural son: malaquita [ $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ ], espertinita [ $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ], tenorita ( $\text{CuO}$ ) y azurita [ $\text{Cu}_3(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2$ ].

### 2.3.3.3.- Corrosión del cobre en el mar

El agua de mar contiene normalmente cerca de  $19 \text{ g L}^{-1}$  de cloruro, pero esta concentración puede variar desde  $5$  a  $35 \text{ g L}^{-1}$ . El pH está usualmente entre  $7,5$  y  $8$  [102] y, en general, el oxígeno contenido en el ambiente marino es un importante factor en la corrosión del cobre. En ambientes marinos aeróbicos, la principal reacción catódica en la corrosión del cobre es la reducción de oxígeno, mientras que en ambientes anaeróbicos la actividad microbiológica puede causar la corrosión [102]. La velocidad de corrosión reportada para cobre puro a temperatura ambiente va desde  $15$  a  $40 \mu\text{m año}^{-1}$  y, generalmente, es mayor que la de sus aleaciones, pero no excede los  $100 \mu\text{m año}^{-1}$  bajo las más agresivas condiciones [54]. La Figura 16 muestra las posibles reacciones del cobre expuesto al mar; en ella se observa que el proceso de corrosión no siempre es uniforme y la velocidad de disolución del cobre cambia a lo largo de la superficie.

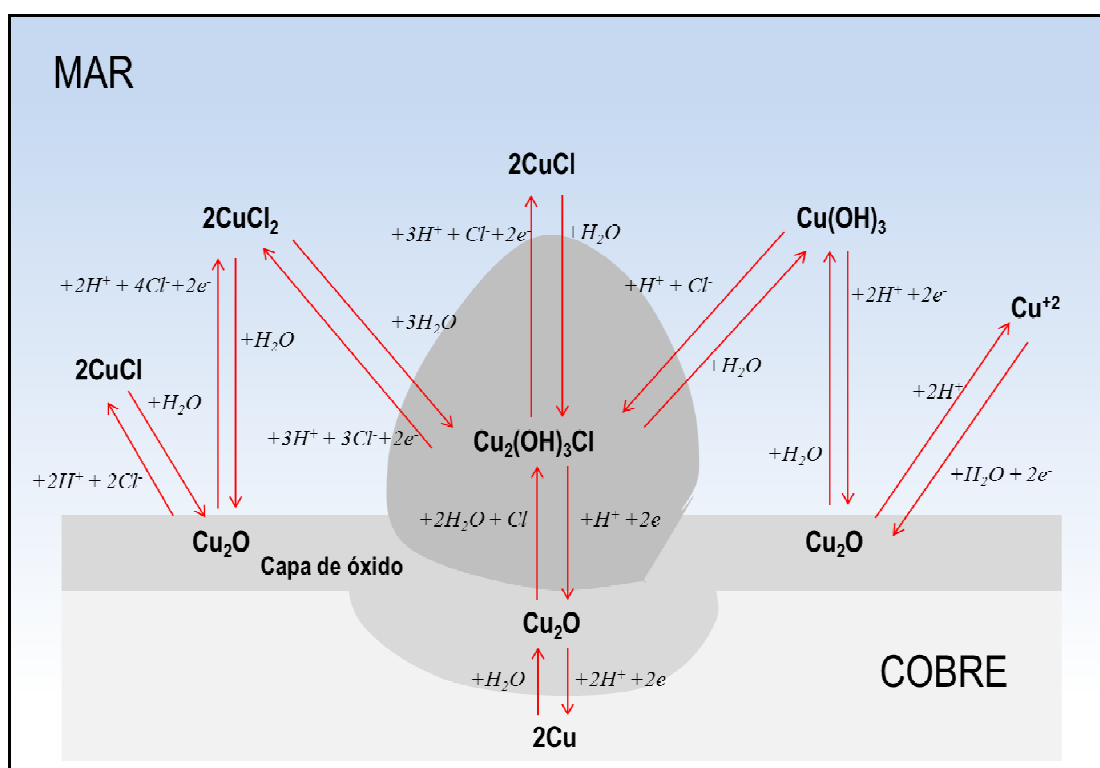


Figura 16. Reacciones de corrosión del cobre en el mar. Breur R., 2001 [11].

En forma gráfica, el diagrama de Pourbaix o diagrama potencial (Eh –pH) del cobre en agua de mar [103] permite explicar la influencia del pH en la corrosión del cobre.

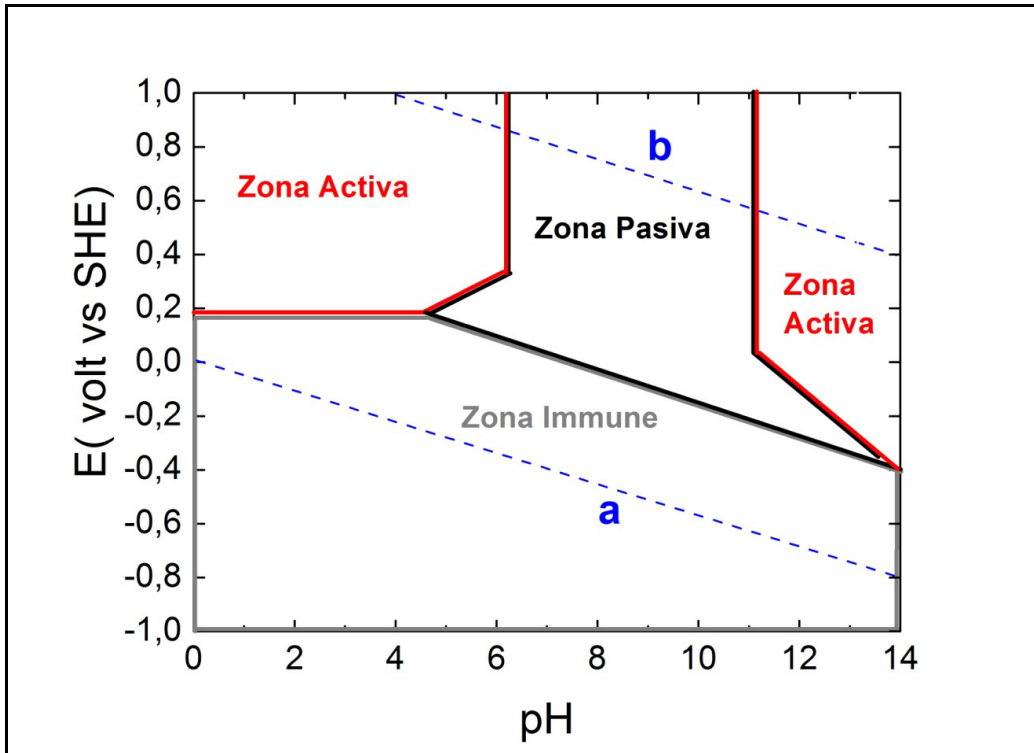


Figura 17. Diagrama de Pourbaix genérico indicando las zonas activas, pasivas e inmunes.

En la Figura 17 se muestra un diagrama de Pourbaix genérico, que señala el equilibrio termodinámico de diferentes especies en solución acuosa bajo distintas condiciones de Eh y pH. Eh es el potencial con respecto al electrodo estándar de hidrógeno (SHE) y expresa la disponibilidad de electrones, de forma que a mayor potencial, mayor poder oxidante. En el diagrama es posible reconocer diferentes zonas:

- La zona delimitada por las líneas a y b indica la región en que el agua es termodinámicamente estable. Bajo la **línea a** ( $\text{pH} < 4,3$ ) se produce la descomposición electroquímica del agua dando hidrógeno :



Sobre la **línea b** ( $\text{pH} > 4,3$ ) el agua se descompone produciendo oxígeno:



- Zona de inmunidad: zona de predominio de las reacciones de reducción, donde el metal se encuentra estable.
- Zona activa: zona de corrosión por el predominio de las reacciones de oxidación, que causan la destrucción por combinación o disolución continuada del material (zona de productos disueltos).

- Zona de pasivación: zona de corrosión, donde la fase formada constituye una película protectora, que evita el avance del proceso de corrosión (zona de productos insolubles).

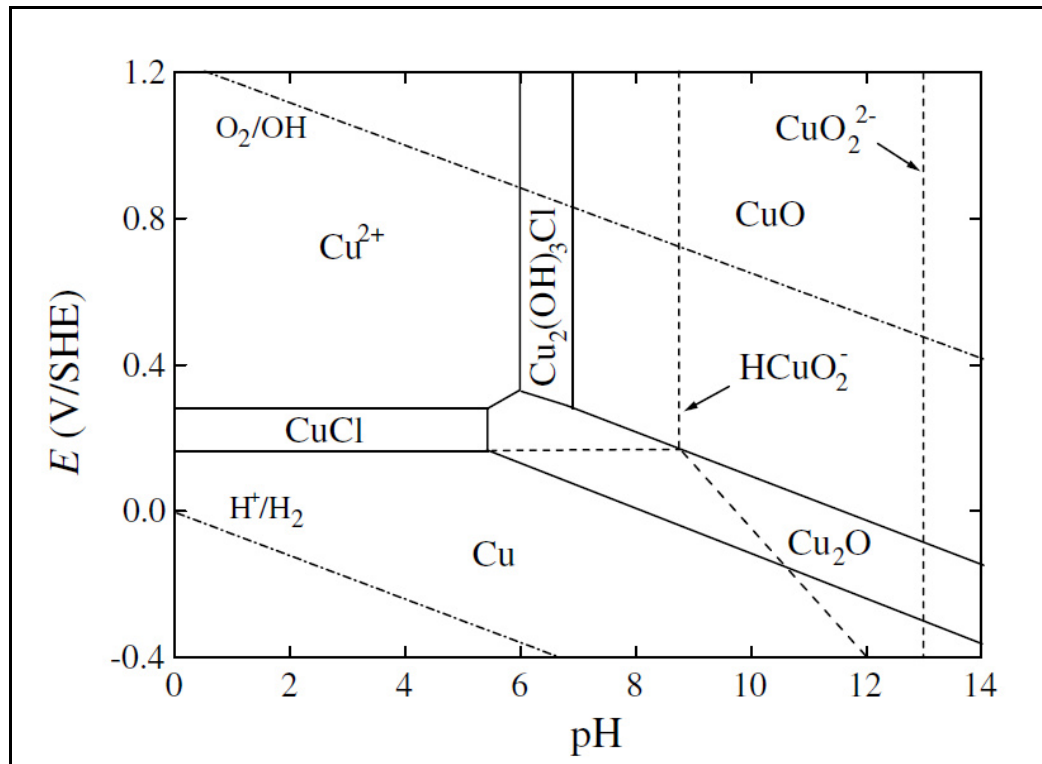


Figura 18. Diagrama de Pourbaix para cobre en agua de mar con 35‰ de salinidad indicando las especies químicas estables en cada zona (25°C y 1 atm) [103].

En la Figura 18, las zonas están etiquetadas con las especies químicas termodinámicamente más estables a 25°C y 1 atm. Considera las reacciones entre el cobre y el agua, y entre el cobre y el ión cloruro. Se observa que el ión  $\text{Cu}^{2+}$  necesita cierta acidez para estar libre en solución y potenciales mayores o iguales a 0,3 V evitándose su precipitación a óxidos o hidróxidos. Las fases sólidas son Cu,  $\text{Cu}_2\text{O}$ , CuO, CuCl y  $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ . Desde la figura se observa la estabilidad termodinámica del óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) a valores de pH alcalinos o neutros, en desmedro del cloruro de cobre (CuCl)

El  $\text{Cu}_2\text{O}$  es un producto de las reacciones de corrosión que se forma en la superficie del cobre. Esta película impide la difusión de iones que forman parte de las reacciones de corrosión. Si el cobre se recubre completamente por esta película, la corrosión ya no puede proseguir y entonces se dice que el metal está **pasivado**. Sin embargo, se ha demostrado que la estabilidad de  $\text{Cu}_2\text{O}$  es inversamente dependiente de la concentración de iones cloruro [87,93,104,105]. El aumento de la salinidad tiende a aumentar la corrosión, evitando la pasivación. En un medio acuoso clorado la corrosión de cobre es localizada y presenta una corrosión por picadura [106].

En general, diferentes compuestos de la corrosión son estables, dependiendo del pH y las especies iónicas presentes en el mar. Los principales compuestos encontrados son



depósitos de atacamita y paratacamita  $[\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3]$  de color verde azulado, sobre una capa café rojizo de cuprita ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Nantoquita gris pálida ( $\text{CuCl}$ ) fue encontrada sobre capas de atacamita, paratacamita y cuprita [107]. En ambientes anaeróbicos, las bacterias reductoras de sulfato (BRS) utilizan el oxígeno de los sulfatos ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) para reducirlos a sulfuros ( $\text{S}^{-2}$ ), produciendo calcosina ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) de color gris oscuro y pequeñas cantidades de covelina ( $\text{CuS}$ ) de color azul oscuro [107].

#### 2.3.3.4.- Corrosión del cobre en agua fresca

El agua fresca contiene menos de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de cloruro, por ello la velocidad de corrosión del cobre es menor. Las velocidades típicas van desde  $1$  a  $10 \text{ } \mu\text{m año}^{-1}$  a temperaturas que van desde  $10$  a  $60^\circ\text{C}$  [54].

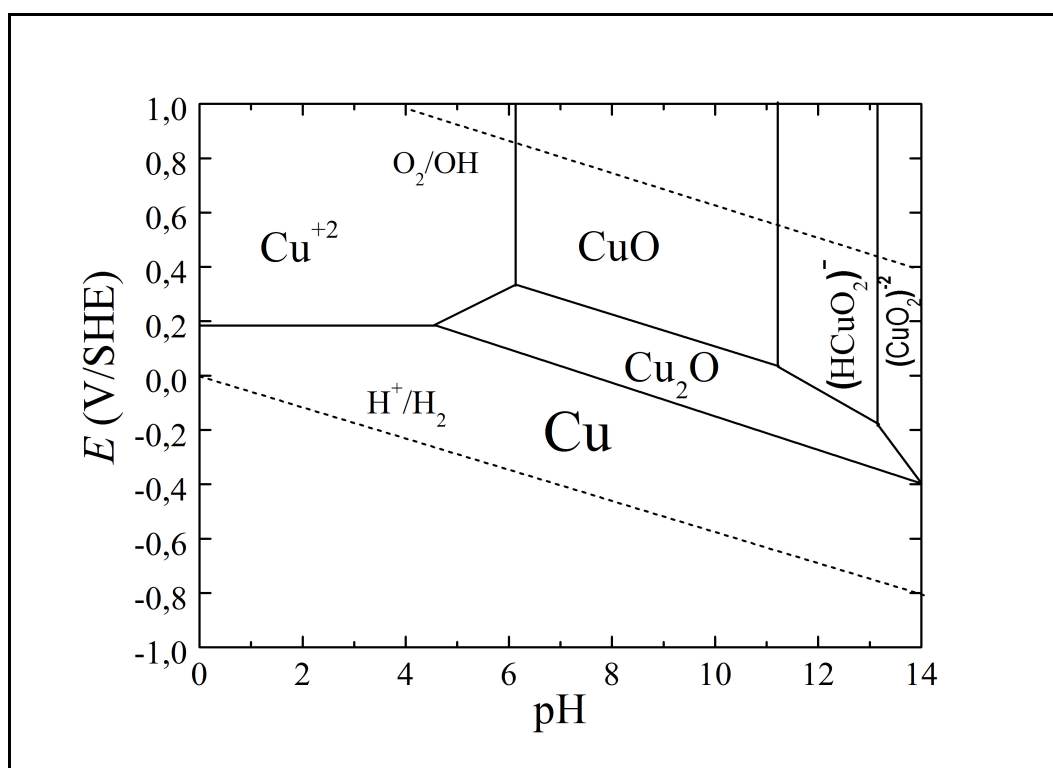


Figura 19. Diagrama de Pourbaix para cobre en agua ( $25^\circ\text{C}$  y  $1 \text{ atm}$ ) [108].

En el diagrama de Pourbaix de agua fresca, a  $25^\circ\text{C}$  y  $1 \text{ atm}$ , (Figura 19) se observa que los sólidos corresponden a  $\text{Cu}$ ,  $\text{Cu}_2\text{O}$  y  $\text{CuO}$ . Los iones  $\text{Cu}^{+2}$  necesitan pH ácidos y potenciales mayores o iguales a  $0,2 \text{ V}$ . En medio básico,  $\text{pH} \geq 11$ , existen otras especies iónicas estables producidas por la corrosión,  $(\text{HCuO}_2)^-$  y  $(\text{CuO}_2)^{2-}$ .

#### 2.3.3.5.- Corrosión de nanopartículas de cobre en agua

Habitualmente, los estudios de corrosión del cobre y sus aleaciones se enfocan a la escala macro/micrométrica, indicando los factores y medios que influyen sobre los procesos

de corrosión. Sin embargo, existen pocos estudios que analizan el comportamiento corrosivo del cobre a escala nanométrica. Xia y colaboradores [109] demostraron que la liberación de iones  $\text{Cu}^{+2}$  es mayor desde nanopartículas de cobre que desde micropartículas de cobre durante las primeras horas de inmersión en agua destilada (Figura 20). Las nanopartículas mostraron un pico de liberación en un corto período, posteriormente la liberación disminuyó con el tiempo hasta mantenerse constante. Mientras que la liberación de las micropartículas incremento lentamente con el tiempo de inmersión, hasta que finalmente se mantuvo constante. Este comportamiento se asoció a un efecto de tamaño, pues las nanopartículas (1000 veces más pequeña que las micropartículas) tendrían una mejor interacción con el agua, haciendo mucho más fácil y rápida su corrosión [57,109,110,111].

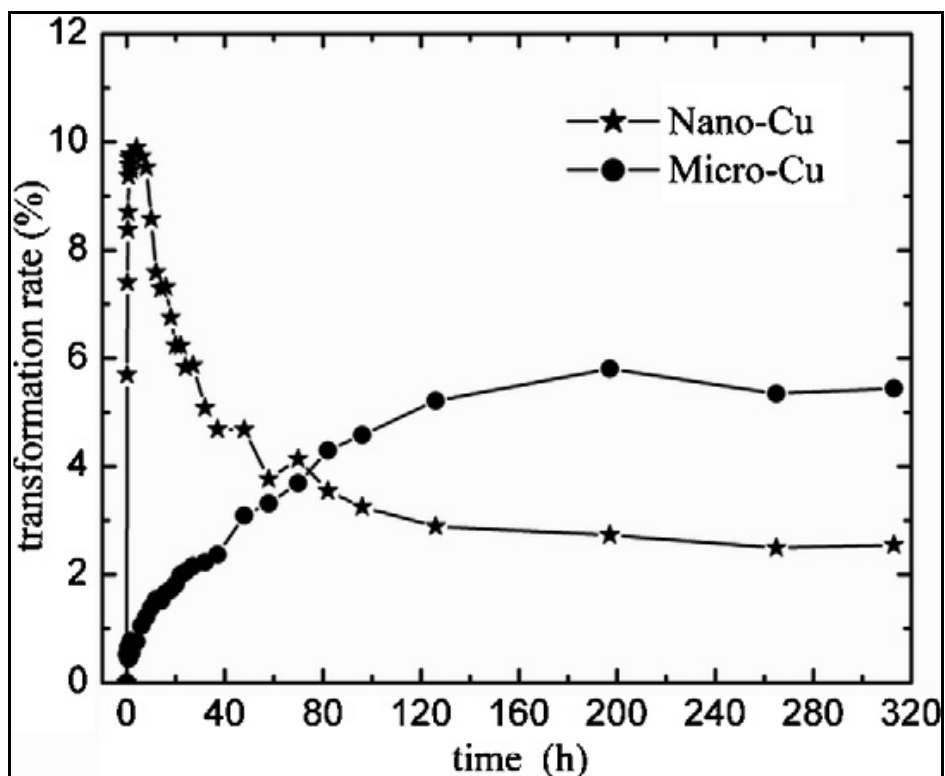


Figura 20. Velocidad de transformación de  $\text{Cu}^{+2}$  en función del tiempo desde nanopartículas (50 nm) y micropartículas de cobre (5 $\mu\text{m}$ ) inmersas en agua destilada (Se sumergieron 12 mg de cada muestra en 500 mL de agua destilada) [109].

Además observaron que la corrosión a microescala produce óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) sobre la superficie del cobre obstruyendo la liberación de iones  $\text{Cu}^{+2}$ , mientras que a nanoescala el óxido cuproso se disolvía fácilmente a  $\text{Cu}^{+2}$  debido a la mayor área específica y energía superficial [11,54,58]. Sin embargo, demostraron que el decrecimiento en la velocidad de formación de iones en las nanopartículas se debe a que sus productos de corrosión además de depositarse sobre sus superficies pasivándolas, estaban consumiendo parte del  $\text{Cu}^{+2}$  formando subproductos ( $\text{CuOH} \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}_2\text{CO}_3[\text{OH}]_2$ ).

# CAPÍTULO 3: NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS ANTIMICROBIALES

En los últimos años, la sociedad está exigiendo cierto control en el crecimiento de la población microbiana, particularmente porque algunas cepas de microorganismos patógenos están produciendo millones de muertes cada año. Sin embargo, el tratamiento se hace cada vez más difícil, debido al creciente número de cepas microbianas resistentes a los antibióticos. Por esta razón, la aplicación de superficies antimicrobiales empieza a ser una herramienta necesaria para combatir la contaminación de microorganismos, particularmente en hospitales.

Por otro lado, otro problema que requiere el control de la población microbiana es la formación de una biocapa o biofilm sobre los materiales, aunque en este caso no corre riesgo la vida del hombre, es económicamente importante, pues corroe y deteriora al material. La formación del biofilm ocurre sobre cualquier superficie, comenzando con la adhesión de bacterias platónicas. La proliferación de bacterias es acompañada por la formación de polisacáridos extracelulares (más detalles en sección 2.3.1.1). Con el paso del tiempo, las bacterias (aeróbicas y anaeróbicas) se encontrarán embebidas en la matriz de polisacáridos que las protege, siendo 1000 veces menos susceptible a los antibióticos [112]. Una vez formado el biofilm es extremadamente difícil removerlo. Una estrategia para evitar la contaminación por microorganismos patógenos y la formación de biofilms es la producción de superficies **auto-esterilizantes** (*self-sterilizing*) o **superficies antimicrobiales**.

## 3.1.- POLÍMEROS

En el mercado existe una alta demanda por materiales plásticos que cumplan no solo con los requerimientos estructurales y de procesabilidad, sino que tengan actividad antimicrobial, de tal manera que puedan ser utilizados en aplicaciones tan variadas como tuberías, filtros de aire, textiles, envases de alimentos, mobiliario hospitalario, entre otros. Lo anterior es más relevante si se trata de polímeros termoplásticos, en particular, aquellos basados en poliolefinas (Polietilenos o Polipropilenos) ya que representan más del 60% del mercado actual de plásticos. Esto equivale a 100 millones de toneladas anuales [2].

Los plásticos son resistentes, versátiles, fáciles de limpiar y esterilizar, pero inertes frente a la colonización de microorganismos. Las instalaciones hospitalarias cuentan con numerosos productos plásticos, en el mobiliario médico (camas, carros, portasueros, mesas), dispositivos médicos (jeringas, bolsas de sangre), productos sanitarios (chatas, asientos de baño), manillas, barandas, entre otros. Una de las mayores preocupaciones de los dos últimos años son las infecciones adquiridas en los hospitales (IIH). Las IIH se deben en primer lugar a la transmisión de microorganismos a través de las manos y en segundo lugar por no aplicar desinfectantes y antisépticos cuantas veces sean necesarios sobre las superficies. Las IIH pueden evitarse parcialmente gracias al uso de innovadores

plásticos con propiedades antimicrobianas, sustituyendo superficies de trabajo que albergan posibles focos de infección. Los plásticos que principalmente se utilizan en instalaciones hospitalarias son Polipropileno (PP), Polietileno de Alta Densidad (PEAD), Nylon 6 o Poliamida 6 (PA6) y Acrilonitrilo Butadieno Estireno (ABS).

Otro amplio campo de aplicación de polímeros es la acuicultura. Para el cultivo de peces la industria utiliza jaulas o redes conformadas de mallas de Poliamida 6 (PA6), Poliamida 66 (PA66), poliestireno (PS), Polipropileno (PP) o Polietileno (PE) [113]. Su uso se debe a que son livianos, fáciles de trabajar y reparar, no abrasivos a los peces y de bajo costo. Normalmente estas jaulas se apoyan sobre flotadores de PEAD y PES. Además boyas de PEAD, balizas flotantes ancladas en el mar, ayudan a la orientación de las embarcaciones [114]. Como se señaló en capítulos anteriores, el inconveniente que experimentan estos polímeros y todos los materiales inmersos en el mar, es que son cubiertos rápidamente por sustancias inorgánicas y compuestos orgánicos, la cual favorece la colonización de bacterias y organismos unicelulares, y luego el asentamiento de organismos multicelulares como macroalgas y moluscos. Este fenómeno se denomina *biofouling*. Las tecnologías actuales para evitar el *biofouling* incluyen pinturas a base de cobre y redes de aleaciones de cobre, ambas son costosas, y las aleaciones resultan pesadas y difíciles de limpiar.

Basado en los antecedentes antes señalados, para este trabajo se escogió PP en gran parte de los estudios y también se consideró el uso de PEAD y PA6 para algunas experiencias.

### 3.1.1.- Polipropileno (PP)

El Polipropileno se caracteriza porque sus cadenas están formadas únicamente por carbonos e hidrógenos, unidos por enlaces covalentes ( Figura 21). Debido a que la electronegatividad de estos átomos es similar, al PP se le considera un polímero apolar e hidrofóbico. El PP es parcialmente cristalino, con regiones cristalinas dispersas en zonas amorfas (no cristalinas).

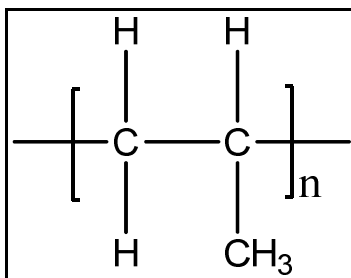


Figura 21. Estructura del Polipropileno isotáctico.

Los tipos de PP varían según la posición de su grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) con respecto a la cadena principal. En el Polipropileno isotáctico los grupos metilos se encuentran a un lado de la cadena, en el sindiotáctico su distribución es alternada y en el atáctico los grupos metilos están dispuestos al azar. En este caso particular, el PP utilizado corresponde a Polipropileno isotáctico.

El PP es uno de los polímeros *commodity* más usado, corresponde al 19% del consumo europeo de plásticos [115] y el 40% del consumo mundial de poliolefinas [2]. Presenta buenas propiedades mecánicas, flexibilidad y una buena relación costo/desempeño [3].

### 3.1.2.- Polietileno (PE)

Las cadenas están formadas por carbonos e hidrógenos, por ello su carácter es apolar e hidrofóbico ( Figura 22).

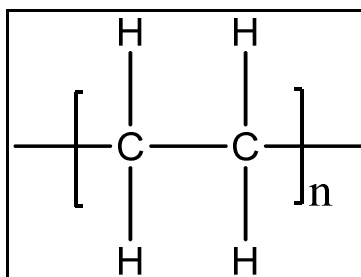


Figura 22. Estructura del Polietileno.

De los tipos de Polietilenos que existen, los fundamentales son el de baja densidad (PEBD) y el de alta densidad (PEAD). También están el Polietileno de baja densidad lineal (PELB) y el Polietileno de ultra-alto peso molecular.

#### **3.1.2.1.- Polietileno de Baja Densidad**

Su estructura es de cadenas muy ramificadas, lo cual no permite un adecuado ordenamiento de estas cadenas, por ello es suave y flexible. Se utiliza generalmente en la elaboración de bolsas y empaques de alimentos.

#### **3.1.2.2.- Polietileno de Alta Densidad**

Al ser un polímero lineal (muy pocas ramificaciones), sus cadenas tienen mayor grado de empaquetamiento, por tanto, tiene alto grado de cristalinidad y por ello es rígido. Se usa en aplicaciones donde la rigidez es importante, como tuberías. En la Figura 23 pueden verse las estructuras moleculares del PEBD y del PEAD.

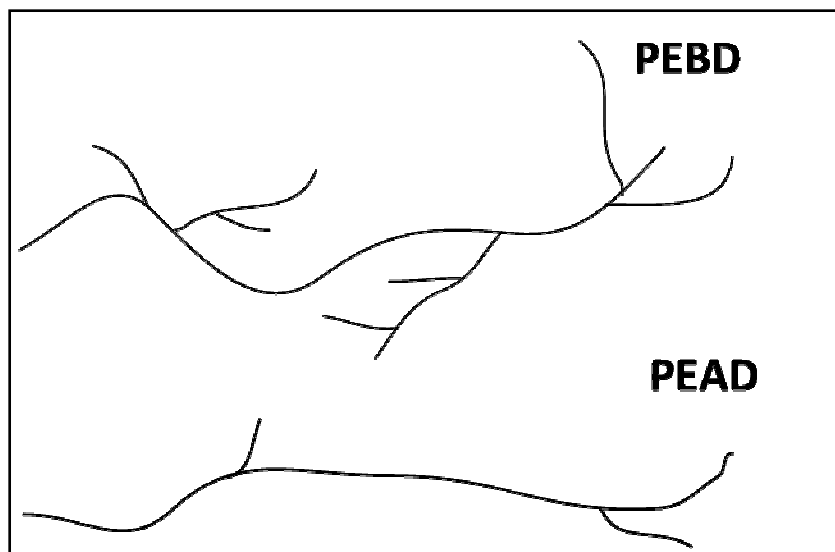


Figura 23. Tipos de Polietilenos (PEBD y PEAD) con mayor nivel de consumo mundial.

Por su alta producción mundial, 37 toneladas anuales de PEBD y 43 toneladas anuales de PEAD [2], es también el *commodity* más barato. Además, abarcan el 17% y 12% del mercado europeo, respectivamente [115].

### 3.1.3.- Poliamida 6 o policaprolactana (PA 6)

La Poliamida 6 (Figura 24) es un plástico semi-cristalino. Se caracteriza por tener grupos funcionales como los amino (-NH) y los carbonilo (-CO), ambos grupos son polares, debido a la mayor electronegatividad del N con respecto al H y del O con respecto al C. Por ello, se le considera un polímero muy polar e hidrófilo.

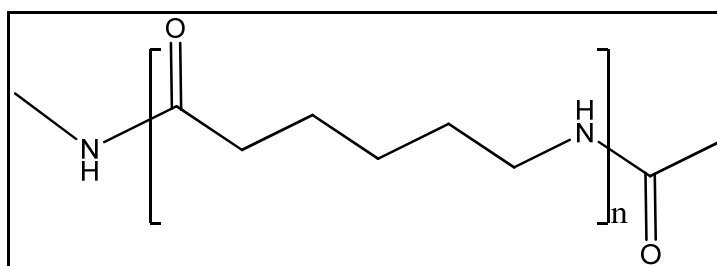


Figura 24. Estructura de la Poliamida 6 (PA 6).

Se caracteriza por una buena combinación de alta resistencia mecánica, rigidez, dureza y tenacidad, encontrándose clasificada como un material de ingeniería [116]. Esto debido a que la PA6, además de tener excelentes propiedades mecánicas, presenta buenas propiedades térmicas y químicas. La PA6 tiene alta resistencia a la abrasión, solventes, aceite, compuestos alcalinos y al desgaste, se puede utilizar con buen rendimiento hasta temperaturas de 185°C [117]. Su producción a nivel mundial es de 3 millones de toneladas al año [2] y su consumo en el mercado europeo ha aumentado un 20% [115].

Tabla 11. Principales características físicas y químicas de los polímeros [3,113,118].

	PP	PEBD	PEAD	PA6
Densidad [kg/m <sup>3</sup> ]	900-930	910-930	940-970	1130
Grado de cristalinidad %	60>	40-55	60-92	36-40
Temperatura de fusión [°C]	160-170	108-115	135-140	215-220
Elongación %	≤500	≤600	≤120	≤300
Resistencia alcalina	buena	buena	buena	buena
Resistencia ácida	buena	buena	buena	débil

### 3.2.- NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS

Los **compósitos** son materiales compuestos formados por dos o más fases donde una de ellas se denomina matriz (fase continua) y otra relleno o carga (fase dispersa). La matriz puede ser una fase orgánica, metálica o cerámica. En caso de ser orgánica puede clasificarse en matrices poliméricas o de carbono.

Los **nanocompósitos poliméricos** son materiales compuestos por una matriz polimérica y un relleno inorgánico que tiene al menos una dimensión en la escala nanométrica (<100nm). A este relleno se le denomina nanopartículas y pueden tener diferentes formas: esféricas (3 dimensiones nanométricas), tubulares (2 dimensiones nanométricas) o laminares (1 dimensión nanométrica).

En los compósitos poliméricos convencionales, cuyos rellenos tienen tamaño micro o macrométrico, las propiedades del material dependen de las fases constituyentes, que usualmente no interactúan entre ellas, mientras que en los nanocompósitos poliméricos las propiedades dependen de las interfaces que se generan entre el polímero y la carga. La diferencia radica en el tamaño del relleno, dado que las nanopartículas tienen una alta superficie específica (m<sup>2</sup>/g) y/o razón de aspecto, conllevando a que el área de interface entre la matriz y la nanocarga sea típicamente un orden de magnitud mayor que en compósitos convencionales, lo que permite modificar las propiedades del polímero con un porcentaje de carga inferior al 10% en peso, mientras que en compósitos convencionales se necesita una carga mayor al 50% en peso [119].

Los compósitos fueron desarrollados como materiales estructurales; por ejemplo, a los polímeros se les adicionaba rellenos metálicos como refuerzos para mejorar sus propiedades mecánicas, mientras que los nanocompósitos poliméricos son considerados materiales multifuncionales ,ya que las nanopartículas le añaden propiedades biocidas [120,121,122], ópticas [123], eléctricas [124], térmicas [125], magnéticas [126], catalíticas [127] y mecánicas [128], entre otras. Esta particularidad se debe a un “efecto de tamaño”, como cada nanopartícula tiene un pequeño número de átomos (~10<sup>6</sup> átomos) su energía superficial y su relación superficie/volumen es muy alta [129], y por ello se acentúan algunas de sus propiedades.

Varios estudios han comparado las propiedades de los nanocompósitos y los microcompósitos poliméricos, con igual composición (matriz, tipo y cantidad de relleno), y demostrado que superiores las propiedades de los nanocompósitos, como son mayor

rigidez [130,131], mejor resistencia a la tracción y aumento de estabilidad térmica [132], disminución de la permeabilidad del agua, gases e hidrocarburos [133,134] y mayor resistencia al fuego [135,136]. Al mismo tiempo, los rellenos micrométricos reducen la tenacidad, transparencia y la calidad superficial, e incrementan el peso y la viscosidad del fundido del polímero [137]. Generalmente, las nanopartículas, por ser incorporadas en bajas cantidades (< 10% en peso), no afectan el peso, la tenacidad ni la transparencia del polímero [137,138], además de conservar la procesabilidad por medio de los métodos tradicionales de procesamiento [173].

Debido a las ventajas de los nanocompuestos poliméricos, durante los últimos diez años se han publicado numerosos estudios acerca de ellos. Por ejemplo, se reportó que el módulo de elasticidad de una Poliamida 6 (P6) se duplica al agregar 8% en peso de montmorillonita nanoestructurada [139], mientras que con un 7% en peso se reducen a la mitad los coeficientes de expansión térmica de un Polietileno (PE) [140]. Con un 5% en peso de arcilla exfoliada nanométrica se reduce en 15 veces la permeabilidad de O<sub>2</sub> de un Polietileno tereftalato [141] y un polimetilmetacrilato (PMMA) puede exhibir actividad antibacterial al añadirle entre 1-10% en peso de nanopartículas de plata [142]. El umbral de percolación para la conductividad eléctrica de un polímero epoxi se encontró al cargar un 0,0025% en peso de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) [143] y se publicó que la conductividad de un PMMA es 13 órdenes de magnitud mayor al adicionar 10% en volumen de nanopartículas de cobre [144].

### **3.3.- NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS ANTIMICROBIALES CON NANOPARTÍCULAS DE COBRE**

La aparición de la propiedad antimicrobial en estos materiales ha sido reportada recientemente, como resultado de la adición de agentes inorgánicos nanométricos principalmente a base de cobre (Cu) o a base de plata (Ag), siendo estos últimos los más estudiados. Sin embargo, desde hace miles de años es conocida la propiedad antimicrobial de ambos metales, pues civilizaciones como la griega y la romana utilizaban estos metales para la confección de utensilios de cocina, ya que conocían su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos [15].

Si bien el cobre también posee propiedades antimicrobiales, su incorporación en polímeros no ha sido tan extensamente estudiada para estos fines, como sí lo es la plata. Por ejemplo, existen varios antecedentes de nanopartículas, óxidos y sales de plata que han sido embebidas en matrices poliméricas, proporcionándoles actividad antimicrobial [145]. Se ha reportado que nanopartículas de plata son mucho mejores aditivos antimicrobiales en una Poliamida 6, que micropartículas de plata [146]. La adición entre 0,1– 1,0 % en peso de plata en un PMMA (cemento óseo) exhibió alta actividad antibacterial y ausencia de citotoxicidad [147].

Mientras que son escasos los antecedentes de la incorporación de cobre nanométrico en matrices poliméricas. Cioffi y colaboradores [120] prepararon nanocompuestos poliméricos con propiedades antimicrobiales y antihongos incorporando



nanopartículas de cobre a diferentes matrices poliméricas como polivinil metil cetona (PVMK), polivinil cloruro (PVC) y polivinil difluoruro (PVDF), mediante mezcla en solución. El estudio demostró que, al variar la matriz y la carga de nanopartículas, es posible controlar la liberación de iones de cobre.

Zhang y colaboradores [148] utilizaron Implantación Iónica por Inmersión en Plasma (IIP) para producir una superficie de nanopartículas de cobre sobre Polietileno. Ellos concluyeron que un 3% de cobre superficial es suficiente para eliminar a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y además demostraron que los efectos antibacteriales se conservan hasta 6 semanas después.

### **3.4.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS**

Existen tres métodos para obtener nanocompósitos poliméricos: mezcla en fundido, polimerización *in situ* y procesamiento en solución [149,150]. El primero es el más utilizado, pues es comparable con los procesos con que opera la industria de materiales plásticos como son la extrusión y el moldeo por inyección, además de evitar la contaminación ambiental al no requerir manipulación de solventes [151]. A continuación, se describen estos procedimientos.

#### **3.4.1.- Polimerización *in situ***

En este método se pone directamente el relleno al reactor de polimerización, que tiene previamente una solución con monómero (monómero del polímero que actuará como matriz). Durante una fase de mezclado, los monómeros difunden entre el relleno. Después se inicia la polimerización por medio de calor o con un iniciador orgánico o fotoquímico, generando las cadenas moleculares que componen el polímero. A medida que crece la cadena del polímero, ésta irá separando el relleno hasta dispersarlo.

Normalmente este procedimiento se suele utilizar para preparar nanocompósitos poliméricos a base de polímeros polares o principalmente de resinas termoestables, ya que en este último caso lo que se hace es curar dichas resinas en presencia de las partículas de carga. No suele ser un método habitual para la preparación de nanocompósitos a base de polímeros termoplásticos.

#### **3.4.2.- Polimerización en solución**

En este proceso se diluye inicialmente el relleno (por ejemplo arcilla) en un disolvente orgánico polar, formando una estructura tipo gel. Posteriormente, el polímero diluido en un solvente similar, se añade a la solución, obteniéndose una mezcla entre el polímero y el relleno, en la que las cadenas del polímero se intercalan entre el relleno. En la última etapa, se elimina el solvente por evaporación bajo vacío y se obtiene el nanocompósito polimérico. Este método es indicado para polímeros con baja o nula polaridad.

Aunque este procedimiento parece sencillo, resulta complicado en la práctica encontrar un solvente capaz de disolver completamente el polímero y que disperse completamente el relleno. Además, el uso de disolventes orgánicos lo hace un método no amigable medioambientalmente y poco rentable económicamente.

#### 3.4.3.- Mezclado en fundido

En este proceso se mezcla el relleno con el polímero en estado fundido en un mezclador discontinuo como el Brabender o continuo como la extrusora. El relleno puede ser incorporado directamente al polímero o en un “master batch” (mezcla maestra). El “master batch” es una mezcla pre-elaborada con el relleno y algún polímero o aditivo y se utiliza cuando se tiene poco relleno o es necesario modificarlo antes de incorporarlo a la matriz.

El mezclador mecánico calienta el polímero hasta el punto de fundido, además posee unas muelas que aplican un torque a la muestra generándole fuerza de cizalla. El polímero difunde entre el relleno. Este proceso tiene grandes ventajas sobre los otros dos métodos anteriormente descritos, ya que no usa disolventes orgánicos y es compatible con los procesos industriales.

# CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS

A LO LARGO DEL CAPÍTULO SE PLANTEA LA FORMA EN QUE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN. A CONTINUACIÓN, SE DESCRIBEN LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y LA METODOLOGÍA EMPLEADA PARA LLEVARLOS A CABO.

## 4.1.- SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE

Para alcanzar el objetivo específico: “**Sintetizar y caracterizar nanopartículas de cobre soportadas en sílice y nanopartículas de cobre funcionalizadas superficialmente**”, se escogieron procedimientos experimentales previamente reportados. El motivo es que las investigaciones utilizan una metodología factible para la obtención de nanopartículas en base a cobre con propiedades antimicrobiales.

Posteriormente, se pretende incorporar estas partículas a matrices poliméricas y estudiar su comportamiento antimicrobial. En este aspecto, no existen antecedentes previos.

4.1.1.- Síntesis de nanopartículas en base a cobre soportadas en sílice (NPs<sub>Cu/Si</sub>)

### 4.1.1.1.- *Materiales*

Las principales características de los reactivos utilizados se detallan en la Tabla 12:

Tabla 12. Propiedades de los reactivos utilizados.

COMPUESTO	FÓRMULA	PROVEEDOR
TEOS	$C_8H_{20}O_4Si$	Sigma Aldrich
Amoniaco	$NH_3$	Merck
Etanol	$C_2H_6O$	Equilab
Cloruro de cobre	$CuCl_2$	Sigma Aldrich

### 4.1.1.2.- *Procedimiento experimental*

Se sintetizaron nanoesferas de sílice de acuerdo al procedimiento desarrollado en el Laboratorio de Polímeros de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile [152]. Los fundamentos teóricos se describen en el ANEXO A.

Se utilizó el **método sol-gel** para la obtención de sílice, con tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor, agua desionizada como iniciador y solución amoniacal al 25%

como catalizador básico. Como medio de reacción se empleó etanol. Se prepararon dos soluciones, en la **Solución 1** se mezclaron 292 mL de TEOS con 550,8 mL de etanol en ambiente de nitrógeno (N<sub>2</sub>), para evitar que el TEOS reaccione con la humedad de la atmósfera. En la **Solución 2** se mezclaron 94 mL de agua desionizada con 34,7 mL de amoníaco y 61,2 mL de etanol a 50°C. Ambas soluciones fueron agitadas por separado durante 30 min. Posteriormente, la **Solución 1** fue adicionada a la **Solución 2** gota a gota. Finalmente, se dejó reaccionar por 5 h.

El solvente de la solución final fue evaporado, y el polvo obtenido fue calcinado en una mufla con una rampa de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup>, hasta 450 °C durante 6 h. El producto final correspondió a nanoesferas de sílice.

Para soportar cobre sobre las nanoesferas de sílice se realizó el método propuesto por Kim y colaboradores [121]. En 100 mL de agua desionizada se adicionaron: 1,56 g de cloruro de cobre (CuCl<sub>2</sub>); 1,5 g de nanoesferas de sílice y 0,5 mL de solución amoniacal. La mezcla se agitó vigorosamente durante 6 h. La solución se filtró al vacío y las partículas se secaron al vacío a 170 °C por 3 h y molieron en un mortero de ágata.

#### 4.1.2.- Síntesis de nanopartículas de cobre funcionalizadas superficialmente (NPFunc)

##### 4.1.2.1.- Materiales

Los reactivos para la síntesis se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13. Propiedades de los reactivos utilizados.

COMPUESTO	FÓRMULA	MASA MOLAR [g/mol]	DENSIDAD [g/mL]	PUNTO EBULLICIÓN [°]	PROVEEDOR
Cloruro de cobre	CuCl <sub>2</sub>	134,45	3,84	993	Sigma Aldrich
n-Hexanotiol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> S	118,24	0,84	152	Sigma Aldrich
Borohidruro de sodio	NaBH <sub>4</sub>	37,83	0,95	500	Sigma Aldrich
Ácido acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	60,05	1,05	118-119	Merck
Alcohol metílico	CH <sub>4</sub> O	32,04	0,79	65	Equilab

##### 4.1.2.2.- Procedimiento experimental

Para la funcionalización de las nanopartículas de cobre, se utilizó como referencia el trabajo de Anyaogu y sus colaboradores [153], que desarrolla una síntesis de Brust modificada. Se siguió el mismo procedimiento, pero se escogieron concentraciones diferentes de las reportadas para lograr resultados requeridos. La Tabla 14 resume las concentraciones experimentadas.

Tabla 14. Concentraciones de los reactivos utilizados para las funcionalizaciones.

Código			SOLUCIÓN N- HEXANOTIOL		SOLUCIÓN BOROHIDRURO DE SODIO			C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> [mL]
	CuCl <sub>2</sub> [g]	CH <sub>4</sub> O [mL]	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> S [mL]	CH <sub>4</sub> O [mL]	NaBH <sub>4</sub> [g]	CH <sub>4</sub> O [mL]	Vol [mL]	
Func1	1,2	200	2,54	20	0,19	10	5	0,16
Func2	1,2	200	3,01	20	0,57	30	20	3
Func3	9,6	200	10,2	0	1,95	50	35	0

\*Vol: volumen utilizado.

Se realizó una dilución de CuCl<sub>2</sub> en metanol. Una vez homogenizada la mezcla, se le agregó otra mezcla previamente preparada de n-Hexanotiol diluido en metanol. La mezcla se mantuvo bajo atmósfera inerte de N<sub>2</sub>, con agitación vigorosa durante 30 min. Posteriormente, se le agregó ácido acético (si corresponde) y una solución 0,5M de NaBH<sub>4</sub> en agua, metanol o alcohol absoluto. La reacción se dejó agitando durante 4 h a temperatura ambiente y atmósfera de N<sub>2</sub>. Una vez terminada la reacción, se lavó tres veces con etanol, centrifugando a 8000 rpm y a temperatura ambiente durante 15 min. Luego, se secó bajo vacío en un horno a 70°C.

#### 4.1.3.- Caracterización

El tamaño y la forma de las partículas fueron determinadas por un Microscopio Electrónico de Transmisión de Alta Resolución (HTEM en sus siglas en inglés) a 80kV. Equipo FEI, modelo Tecnai ST F20.

Para determinar la composición química, las partículas fueron sometidas al análisis de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP) con un espectrofotómetro de emisión óptica (OES).

Además, se estudió la composición química y cristalográfica de las partículas mediante Difracción de rayos X (DRX) con un equipo Siemens D5000, con una longitud de onda Cu(Kα) λ=1,546 Å y un muestreo de 0,02° a temperatura ambiente.

## 4.2.- OBTENCIÓN DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS

El objetivo específico: **“Obtener nanocompósitos poliméricos a través de la incorporación de nanopartículas de cobre comerciales o sintetizadas por el método de mezcla en fundido”**, indica explícitamente el uso de la metodología de mezcla en fundido debido a su semejanza con los procesos industriales vigentes. De esta manera, se espera desarrollar nuevos materiales potencialmente antimicrobiales, tras incorporar nanopartículas a base de cobre a matrices termoplásticas.

#### 4.2.1.- Materiales

##### A. Matrices poliméricas

Para la preparación de los nanocompuestos se utilizaron diferentes matrices poliméricas, tanto comerciales como sintetizadas, según se resume en las Tabla 15 y Tabla 16.

Tabla 15. Matrices poliméricas comerciales utilizadas para la elaboración de los nanocompuestos poliméricos.

Polímero	Código	Índice de Fluidez	Densidad [g/cc]	Proveedor
Polipropileno homopolímero isotáctico (PH0320)	PP	3,3 g/10 min	0,905 ±0,005	Petroquim S.A.
Polipropileno con 1% p/p de Anhídrido Maléico (Polybond 3200)	PP-g-AM	115g/10 min	0,91	Chemtura
Polietileno de Alta Densidad	PEAD	5,0 g/10 min	0,959	n.d.*
Poliamida 6	PA6	n.d.	1,15	n.d.

\*n.d.: no determinado.

Tabla 16. Matrices poliméricas sintetizadas utilizadas para la elaboración de los nanocompuestos poliméricos.

POLÍMERO	CÓDIGO	CATALIZADOR METALOCÉNICO
Polipropileno homopolímero isotáctico	PP-Met	Me <sub>2</sub> Si(2-Me-Ind)ZrCl <sub>2</sub>
Copolímero (Polipropileno/1-Octadeceno)	PP-OD	Me <sub>2</sub> Si(2-Me-Ind)ZrCl <sub>2</sub>

##### B. Rellenos

Para las mezclas se utilizaron diferentes cargas nanométricas, tanto comerciales como sintetizadas, y por motivos comparativos también se utilizaron micropartículas de cobre. A continuación, en las Tabla 17 y

Tabla 18 se detallan los rellenos utilizados.

Tabla 17. Rellenos comerciales.

RELLENO	CÓDIGO	TAMAÑO	PROVEEDOR
Nanopartículas de cobre	NPsCu	10 nm	Versus S.A. (Chile)
Nanopartículas de óxido de cobre	NPsCuO	15-200 nm	Universidad Federal de Rio Grande do Sul (Brasil)
Micropartículas de cobre	MPsCu	45 μm	Sigma Aldrich

Tabla 18. Rellenos sintetizados.

RELLENO	CÓDIGO
Nanopartículas de cobre soportadas en sílice	NPsCu/Si
Nanopartículas de cobre funcionalizadas	NP Func

#### 4.2.2.- Procedimiento experimental

Los nanocompósitos fueron preparados en un mezclador discontinuo (proceso Batch) Brabender Plasticorder. Las temperaturas de operación variaron de acuerdo a la matriz polimérica, para la Poliamida 6 se utilizó 260°C, mientras que para el Copolímero fueron 160°C. El resto de los compósitos se elaboraron a 190°C. El procedimiento consistió en la mezcla en fundido de la matriz polimérica con la carga correspondiente a 110 rpm durante 10 min en una atmósfera inerte de N<sub>2</sub> para evitar procesos de degradación y oxidación.

Las mezclas fueron moldeadas en forma de placas de 1 mm de espesor mediante una prensa hidráulica Industria HP de 8 toneladas a la misma temperatura de mezclado y 50 bar, durante 2 min, seguido de un enfriamiento con agua de alrededor de 4 min.

#### 4.2.3.- Caracterización

Se determinó la forma y tamaño de las nanopartículas de cobre comerciales mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HTEM). El Equipo Phillips modelo Tecnai ST F20 (marca FEI) operó con rangos entre 80-120 kV. Además, por HTEM se observó la distribución de las partículas una vez incorporadas en las matrices poliméricas. Los nanocompósitos fueron cortados con un espesor aproximado de 70 nm utilizando un ultramicrotomo Reichert-Jung (Leica) Ultracut con un cuchillo de diamante, y se depositaron en una grilla de cobre de 100 mesh.

Por otra parte, el tamaño y forma de las micropartículas de cobre se analizó en un Microscopio Óptico (MO) Leica Germany modelo DM LM con zoom de hasta 50x. También por MO se estudió su distribución dentro de las matrices poliméricas. Las imágenes se tomaron con una máquina fotográfica Canon Powershot A630 de 8 megapíxeles y un zoom óptico de 4x.

Por Difracción de rayos X (DRX) se determinaron las fases de las partículas y de los nanocompósitos elaborados. Se utilizó un equipo Siemens D5000, con una longitud de onda Cu(K $\alpha$ )  $\lambda=1,546 \text{ \AA}$  y un muestreo de 0,02° a temperatura ambiente.

### 4.3.- CUANTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE IONES CÚPRICOS

Para lograr el objetivo específico: **“Cuantificar la liberación de iones cúpricos (Cu<sup>+2</sup>) desde los nanocompósitos poliméricos”**, se utilizó espectrofotometría. Esta técnica es de fácil implementación y ejecución (ver fundamentos teóricos en el ANEXO B).

Es muy importante estudiar la liberación de iones desde los nanocompósitos, pues permite seleccionar los mejores materiales antimicrobiales y predecir el comportamiento de su propiedad antimicrobial en el tiempo. A continuación se detallan los materiales y el procedimiento utilizado para cuantificar la concentración de iones de cobre.

#### 4.3.1.- Materiales

En la Tabla 19 se detallan los reactivos utilizados para cuantificar la presencia de iones de cobre en solución.

Tabla 19. Reactivos utilizados para espectrofotometría.

REACTIVO	FÓRMULA	PROVEEDOR
Hidroxilamina	NH <sub>2</sub> OH	Merck
Neocuproína	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	Merck
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Equilab
Ácido acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Merck
Acetato de sodio tri-hidratado	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Na	Merck

#### 4.3.2.- Procedimiento experimental

Para las mediciones de absorbancia se prepararon las siguientes soluciones:

**Hidroxilamina al 10%:** Se agregaron 10 g de Hidroxilamina en 100 mL de agua desionizada. La solución se sonicó durante 10 min.

**Ácido acético 0,1 M:** Se añadieron 2,86 mL de ácido acético en 500 mL de agua desionizada. La solución se agitó durante 20 min.

**Acetato de sodio 0,1M:** Se pesó 6,85 g de acetato de sodio y se mezcló con 500 mL de agua desionizada. La solución se sonicó durante 10 min.

**Solución Buffer:** Se mezclaron 93 mL de ácido acético 0,1 M con 107 mL de acetato de sodio 0,1 M. La solución se agitó durante 20 min.

**Neocuproína 1,92 × 10<sup>-3</sup>M:** Se agregó 0,04 g de Neocuproína en una mezcla de 10 mL de etanol y 90 mL de agua desionizada. La solución se sonicó durante 10 min.

Para la medición de iones liberados desde nanocompuestos, se utilizaron placas de 2 × 3 cm<sup>2</sup> y 1 mm de espesor. Por cada muestra se utilizaron dos placas, con el objetivo de tener un duplicado. Las placas fueron sumergidas en 40 mL de agua desionizada en tubos de plástico de 50 mL de capacidad. Después de un tiempo t se determinó la concentración de iones a través del siguiente procedimiento:

1. Se agregaron 3 mL de la muestra en un tubo de ensayo.
2. Se añadió 1 mL de hidroxilamina al 10% y se agitó.
3. Se añadió 1 mL de buffer y se agitó.
4. Se agregó 1 mL Neocuproína y se agitó. Las soluciones con iones cobre se tornaron amarillas.

Adicionalmente, se preparó un “blanco” con agua desionizada (0 ppm de concentración de cobre) y un “estándar” con 1 ppm de concentración de cobre, siguiendo los pasos 1,2, 3 y 4.



Se midió el “blanco”, la referencia y posteriormente el resto de las muestras. El resto del agua se desechó y las placas se sumergieron nuevamente en 40 mL de agua desionizada limpia.

Para determinar los iones de cobre liberados desde partículas o muestras en polvo, se agregaron 0,05 g en 40 mL de agua desionizada. Antes de cada medición en un tiempo t, la solución debió ser centrifugada por 15 min a 19000 rpm. Posteriormente, se siguieron los pasos 1, 2, 3,4 y 5. Finalmente, se repusieron los 3 mL de agua desionizada utilizados para las mediciones, para mantener el volumen intacto.

Para realizar la conversión entre absorbancia y concentración se elaboraron una curvas de calibración en el espectrofotómetro (UV visible modelo JENWAY 6320D) a una longitud de onda de 455 nm (ver ANEXO C).

#### **4.4.- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIALES Y ANTIFOULING**

Para conseguir el objetivo específico: **“Estudiar las propiedades antimicrobiales y antifouling de los nanocompósitos poliméricos y determinar su relación con el tipo de nanopartículas y porcentaje de carga”** se escogieron dos ensayos adecuados. Se seleccionó el método estándar de conteo en placa de Unidades Formadas de Colonias (UFC) bacterianas para determinar las propiedades antimicrobiales, porque permite estimar el número de células viables. Se escogieron las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, debido a que se consideran las principales responsables de las infecciones intrahospitalarias. Por otra parte, para establecer las propiedades *antifouling* se eligió Microscopía de Fluorescencia, ya que facilita cuantificar los microorganismos viables acuáticos adheridos a la superficie de los nanocompósitos.

##### 4.4.1.- Estudio de las propiedades antimicrobiales

Con el método de conteo en placa de Unidades Formadoras de Colonias, primero se estudió la cinética de crecimiento microbiano a fin de determinar el tiempo en que el microorganismo se encuentra en la fase exponencial u óptima de crecimiento, y en esa fase testarlo contra el agente antimicrobiano.

##### **4.4.1.1.- Crecimiento microbiano en medio sólido [49]**

El crecimiento microbiano es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Cuando se estudia el crecimiento de un único microorganismo, como una bacteria aislada, este se denomina *ciclo celular*. Es decir, el crecimiento resulta de la suma de los ciclos celulares de dicha población.

Cuando una bacteria (organismo unicelular) crece en un medio líquido o cultivo con las condiciones físicas, químicas y nutritivas para multiplicarse en forma controlada,

las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente, formándose una suspensión de células libres. Esta suspensión es inoculada en medios sólidos, así la cinética de crecimiento se puede estudiar siguiendo la evolución del número de células viables<sup>9</sup> por unidad de superficie. Se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución del crecimiento microbiano:

1. **Fase lag o de latencia:** los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.
2. **Fase exponencial:** la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a máxima velocidad.
3. **Fase estacionaria:** no incrementa el número de bacterias. Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente a las de la fase exponencial. Durante esta fase se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios<sup>10</sup>. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano.
4. **Fase de muerte:** se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo.

---

<sup>9</sup> *Célula viable: capaz de dividirse y formar una colonia (población) en el medio de cultivo.*

<sup>10</sup> *Metabolitos primarios: son moléculas de bajo peso molecular que intervienen, bien como productos finales o intermediarios, en las distintas rutas anabólicas y catabólicas. Se producen en las fases de latencia y exponencial.*

*Metabolitos secundarios: Solo los producen algunos microorganismos cuando la velocidad de crecimiento es baja, no tienen pues una función esencial en el crecimiento. Se sintetizan en la fase estacionaria.*

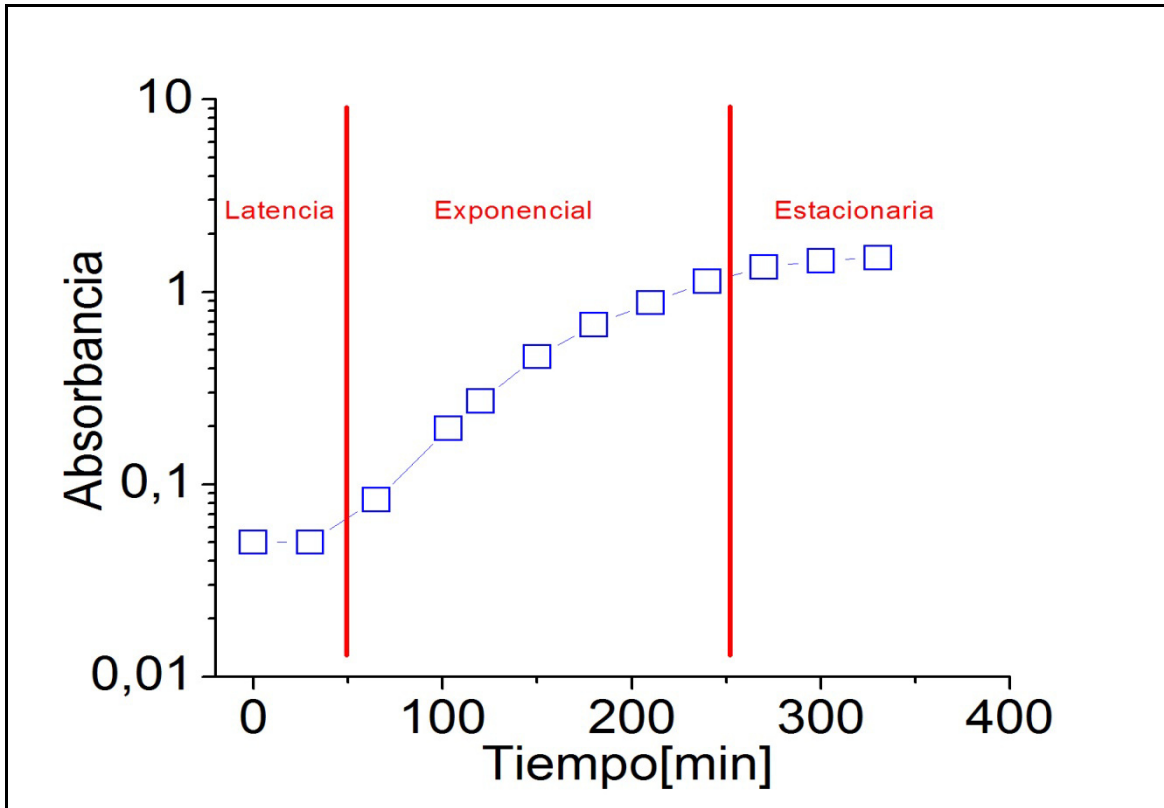


Figura 25. Curva de crecimiento de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  en cultivo agar Luria Broth

Por ejemplo, la Figura 25 muestra la curva de crecimiento obtenida experimentalmente de la bacteria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  estudiada. Como se observa, las poblaciones bacterianas crecen en forma explosiva en un periodo de tiempo muy reducido, en particular, la *Escherichia coli* crece en un factor de 100 en 4 h. En este tipo de estudios se considera que se trabaja con un **cultivo sincrónico**, es decir, todas las células se encuentran simultáneamente en la misma fase del crecimiento celular.

#### 4.4.1.2.- *Conteo de Unidades Formadoras de Colonias en medio solido (placa)*

Cuando una célula aislada e inmóvil comienza a crecer sobre un sustrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Por consiguiente, se denomina Unidad Formadora de Colonia (UFC) a una célula bacteriana viva y aislada que, si se encuentra en condiciones de sustrato y ambientales adecuadas, da lugar a la producción de una colonia en un breve lapso de tiempo. Si el número inicial de bacterias por unidad de superficie es muy alto, la confluencia de las colonias da lugar a lo que se llama un césped, cuando se realizan los cultivos en placas de laboratorio.

Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse. Como consecuencia de esta pérdida, no se produce aumento en el número de microorganismos y, por tanto, no hay crecimiento. Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduzca, por ejemplo, en

liberación de toxinas. Por otra parte, hay que considerar que la capacidad de multiplicación (crecimiento) de un microorganismo puede verse transitoriamente afectada por lesiones o por las condiciones físicas o químicas del entorno. En estos casos, se podría considerar erróneamente como muertos microorganismos que pueden reanudar su crecimiento, si las condiciones son nuevamente favorables.

### **Técnica operatoria**

La técnica consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de células viables, contando el número de colonias que se forman, puesto que cada una de estas deriva de una célula aislada. Se utilizaron los siguientes criterios para el conteo:

1. Seleccionar placas donde aparezcan de 30 a 300 colonias, pues hay menor error en el conteo.
2. Contar todas las colonias de la placa. Si el número se estima mayor de 300 y no hay diluciones subsecuentes:
  - a) 301-500 colonias se divide en dos partes y el número de colonias contadas se multiplica por 2.
  - b) 501-800 colonias se divide en cuatro partes y el número de colonias contadas se multiplica por 4.

#### **4.4.1.3.- Microorganismos estudiados**

En la siguiente Tabla 20 se resumen las principales propiedades de las bacterias testeadas.

Tabla 20: Propiedades de los cultivos bacteriológicos estudiados.

PROPIEDADES			
<i>Bacteria</i>	<i>Tinción</i>	<i>Colección Americana De Cultivos Tipo</i>	<i>Cultivo</i>
<i>Escherichia coli</i>	Gram negativa	DH 5 $\alpha$	Agar Luria Broth
<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a la Meticilina (SARM)	Gram positiva	ATCC 433000	Agar Sal y Manitol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram negativa	ATCC 27853	Agar MacConkey

#### **4.4.1.4.-Procedimiento experimental**

Previo al ensayo, se procedió a la esterilización de cada nanocompósito polimérico. Las muestras expuestas a *Escherichia coli* fueron esterilizadas en un autoclave Orthmann a una presión de 1bar, temperatura 140°C y durante 40 min de operación. Para las otras muestras se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, seguido de etanol al 70%, para luego ser expuestos en una campana de flujo laminar durante 30 minutos a luz ultravioleta, con el fin de asegurar su esterilidad (Figura 26).

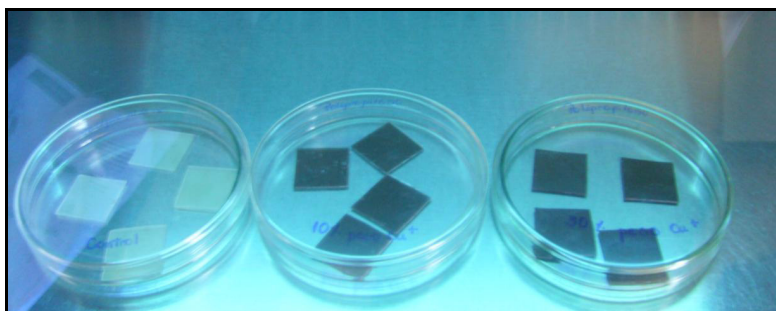


Figura 26. Nanocompuestos poliméricos expuestos a Luz Ultravioleta.

Las bacterias fueron incubadas a 37°C y 200 rpm en un adecuado medio de cultivo, por el tiempo necesario para encontrarse en su fase de crecimiento exponencial. La concentración inicial de cada bacteria fue estandarizada a  $\sim 10^8$  CFU/mL.

Un volumen de 40  $\mu$ L de la suspensión bacteriana de *Escherichia coli* fue inoculado en cada superficie (muestra de control y nanocompuestos) en forma dosificada (Figura 27) hasta completar el inóculo y cubiertas con una placa de vidrio por un periodo de 30 a 240 min a 37°C. Para las experiencias con *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* se utilizó un inóculo de 100  $\mu$ L.

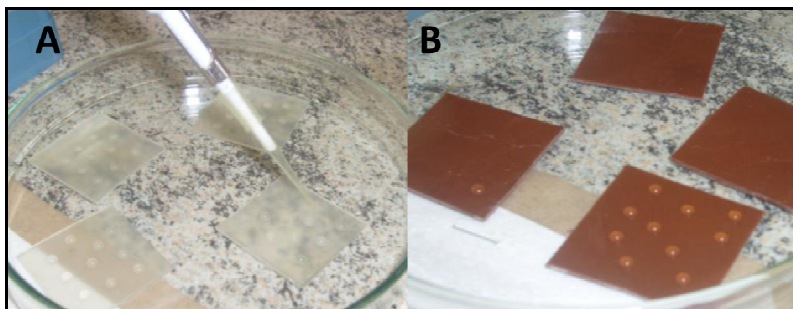


Figura 27. Inoculación bacteriana dosificada A) Muestra control (polímero sin cobre); B) Nanocompuestos.

Una vez transcurridos los diferentes tiempos de contacto, se procedió a remover las bacterias sobrevivientes. Las muestras contactadas con *Escherichia coli* se lavaron con solución de 0,88% en masa de NaCl y 1% en masa de Tween 80. Las muestras con las otras bacterias se limpiaron con una gasa previamente humedecida en 200  $\mu$ L de PBS-LT (buffer fosfato salino con lecitina y Tween 80), para luego someter la gasa al proceso de extracción bacteriana. Para desprender aquellas bacterias adheridas a la gasa post-limpieza, ésta se agregó a un tubo con 3 mL de PBS-LT para luego agitar en vórtex por un minuto.

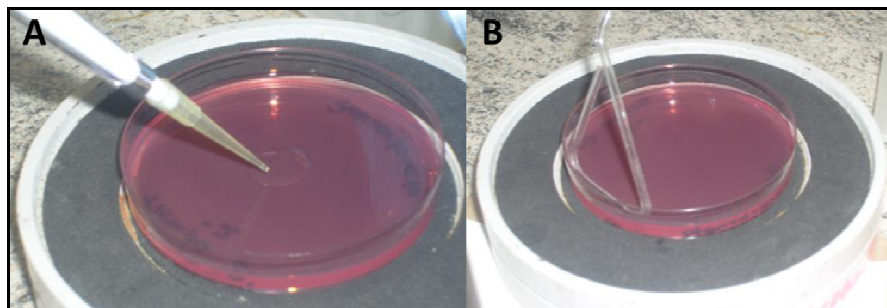


Figura 28. Inoculación y siembra en rastrillo.

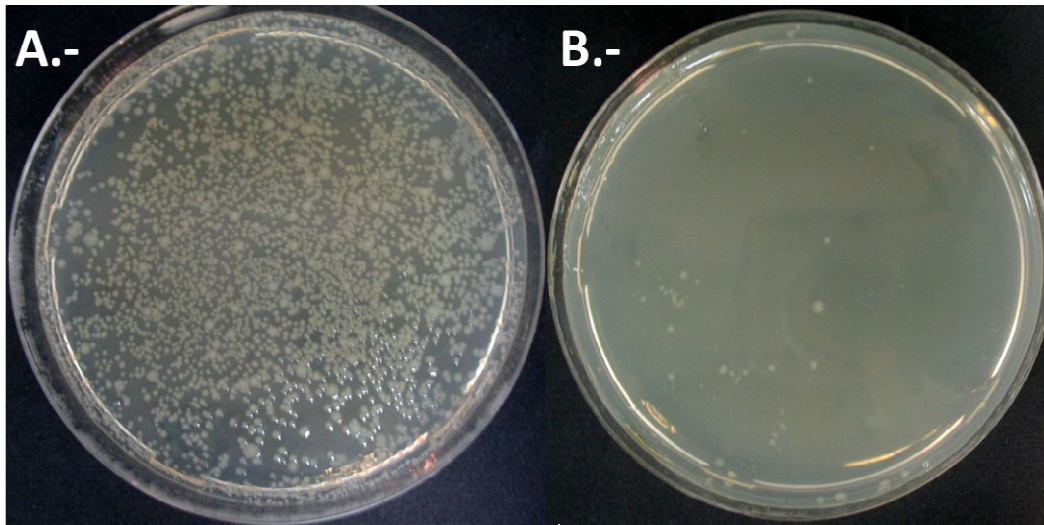


Figura 29. Colonias bacterianas de *Escherichia coli*<sup>11</sup> sobre superficie de agar. A) Placa control. B) Placa para conteo después de 120 min.

Posteriormente, de cada dilución se tomó una alícuota (de 40  $\mu\text{L}$  para la experiencia con *Escherichia coli* o de 100  $\mu\text{L}$  para las otras experiencias), que se sembró en una placa Petri con el medio de cultivo adecuado para el crecimiento bacteriano mediante la técnica de rastrillo (Figura 28). Éstas fueron incubadas a 37°C por una noche para el posterior recuento de colonias a partir de la dilución que permitió la visualización más adecuada. Conocida la dilución utilizada, se calculó el número original de células viables. La experiencia se realizó en triplicado. Finalmente, en la Figura 30 se resume la metodología utilizada.

---

<sup>11</sup> Las colonias bacterianas de *Escherichia coli* se caracterizan por su forma irregular, color blanco brillante, translúcidas, planas y de tamaño  $\sim 2$  mm.

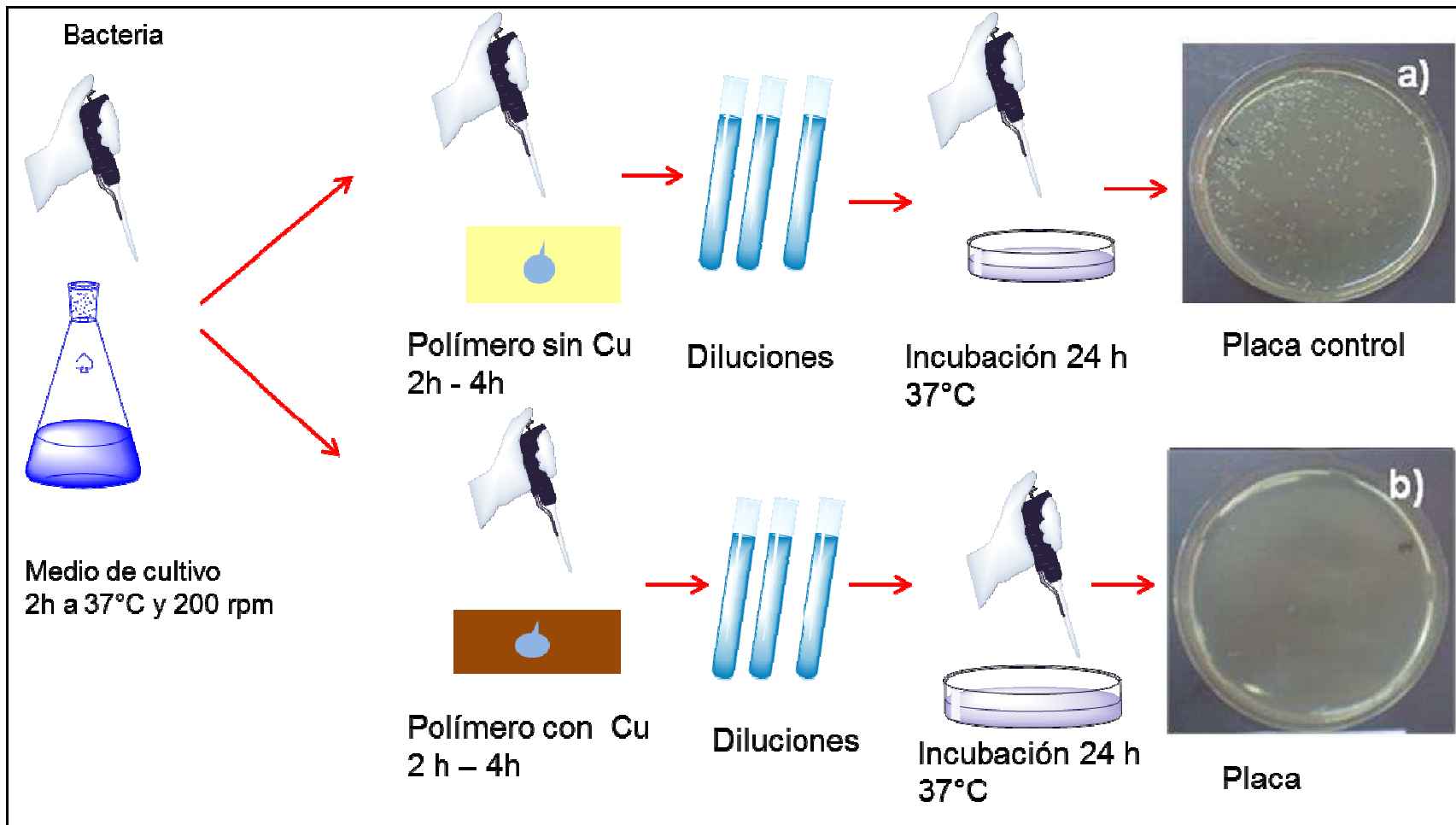


Figura 30. Esquema resumen de la metodología empleada para el estudio de las propiedades antimicrobiales.

#### 4.4.2.- Estudio de las propiedades *antifouling*

Para estudiar la actividad *antifouling*, los nanocompósitos poliméricos fueron inmersos *in situ* en el mar de la ciudad de Brest, Francia, hasta un periodo de 2 meses.

Se utilizó microscopía de fluorescencia para la cuantificación de los microorganismos viables acuáticos adheridos a las superficies de los nanocompósitos. Estos microorganismos se someten a tinción o coloración con el fluorocromo DAPI (diamidino-fenil-indol) que se une a su ADN haciéndolos fluorescentes, además este compuesto normalmente no reacciona con la materia inerte. Los microorganismos al ser iluminados con luz ultravioleta (372 nm) emiten una fluorescencia azul (456 nm), que los hace muy fáciles de ver y enumerar.

##### 4.4.2.1.- Procedimiento experimental

1. **Fijación del *biofouling*:** tras la formación del *biofouling*, los microorganismos se encuentran pobremente adheridos durante los primeros meses, ellos se fijan a la superficie de contacto mediante la adición de 5% de formaldehído (al 40%) en solución estéril. Así, el *biofouling* formado se puede conservar por varias semanas.
2. **Preparación de la muestra:** el *biofouling* se colorea en presencia de una solución de DAPI. El tiempo de contacto del fluorocromo con las muestra es de 30 min en la oscuridad.
3. **Cuantificación de bacterias:** la observación se llevó a cabo en un Microscopio de Epifluorescencia (Olympus BH2-RFC) con aumento (1000 X). El conteo se realizó en 10 áreas aleatorias.

##### 4.4.2.2.- Caracterización

A los nanocompósitos que fueron inmersos en el mar se les efectuó un seguimiento de la Conductividad, pH y concentración de O<sub>2</sub>. La conductividad fue medida por equipo portátil Mettler Toledo MC126, el pH se estimó en un equipo portable pH Meter modelo PHM201, mientras que la concentración de oxígeno disuelto se cuantificó con un HQD Meters, modelo HQ30d.

Por otra parte, fue cuantificada la liberación de Cu<sup>+2</sup> desde las muestras usando un fotómetro sensible para cobre en bajas concentraciones, HANNA Instruments. Además, se estudió el perfil de corrosión de las muestras inmersas en el mar, mediante XPS (Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X). Los análisis fueron llevados a cabo por un equipo Kratos Axis Ultra usando una fuente monocromática Al K $\alpha$  (15 mA, 14 kV). El espectrómetro fue calibrado por la señal Cu2p<sub>3/2</sub> a 932,7 eV  $\pm$ 0,1 eV.

#### 4.5.- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES TÉRMICAS Y REOLÓGICAS



El objetivo específico: **“Caracterizar las propiedades térmicas y reológicas de los nanocompuestos poliméricos”**, pretende estudiar las consecuencias de incorporar rellenos nanométricos en matrices poliméricas. En particular, se procura se evaluar los cambios en las propiedades térmicas y mediante estudios reológicos diferir las características de su procesabilidad.

#### 4.5.1.- Estudio de las propiedades térmicas

Las propiedades térmicas fueron evaluadas usando Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés). Para todos los análisis DSC se utilizó el equipo TA Instruments modelo Q200 en una atmósfera de nitrógeno.

La masa de las muestras fluctuó entre 5 y 10 mg. Para cada muestra, se realizó un primer calentamiento a 20°C/min para borrar la historia térmica del material, calentando desde 25 a 190°C y enfriando a la misma velocidad hasta 180°C. Se registró el análisis del segundo calentamiento, el cual se ejecutó en las mismas condiciones del primer calentamiento. Se estimó la temperatura y entalpía de fusión ( $T_f$  y  $\Delta H_f$ ) y la temperatura y entalpía de cristalización ( $T_c$  y  $\Delta H_c$ ). El porcentaje de cristalinidad ( $\chi_c$ ) se calculó como la razón entre la entalpía de fusión del polímero ( $\Delta H_f$ ) y la entalpía correspondiente a la fusión de un polímero 100% cristalino ( $\Delta H_f^\circ$ ):

$$\chi_c = [\Delta H_f / \Delta H_f^\circ] \times 100$$

**Ecuación 1**

#### 4.5.2.- Estudio de las propiedades reológicas

Se realizaron estudios reológicos de las muestras en estado fundido, mediante dos técnicas: reometría rotacional y reometría extensional.

##### ***4.5.2.1.- Reometría rotacional de placas paralelas***

Se utilizó un reómetro Blue Ares con geometría de placas (o platos) paralelas de 25 mm de diámetro y una distancia entre placas de 1,5 mm (ver esquema en Figura 31). Se prepararon muestras cilíndricas de 2 mm de espesor y 25 mm de diámetro en una prensa caliente a 190°C. Las propiedades viscoelásticas de los polímeros en estado fundido (viscosidad  $\eta$ , módulo elástico  $G'$  y módulo viscoso  $G''$ ) se midieron en oscilaciones de pequeña amplitud en un flujo de corte, como una función de la frecuencia a temperatura constante de 190 °C. La frecuencia o velocidad de corte ( $\omega$ ) utilizada para cada barrido osciló entre  $10^{-2}$  y  $10^2$  s<sup>-1</sup>. Todas las experiencias se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno.

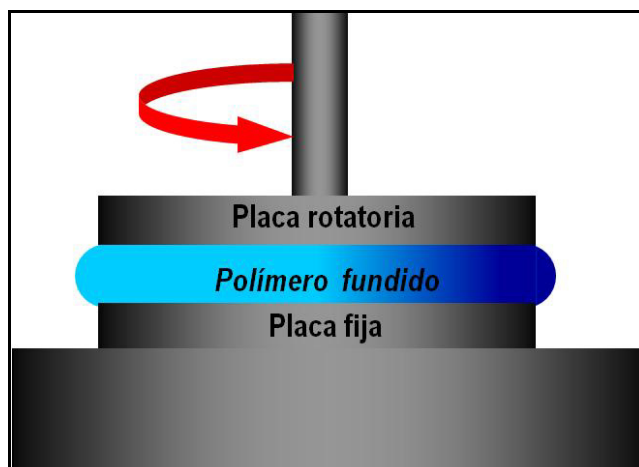


Figura 31. Esquema reómetro rotacional de placas paralelas (placa-placa).

#### 4.5.2.2.- Reometría extensional

Se utilizó un reómetro extensional Blue Ares (ver esquema en Figura 32). El polímero de geometría rectangular (20 mm de largo, 10 mm de alto y 1 mm de ancho) se situó entre los tambores en estado fundido y se sometió a diferentes velocidades de deformación de 4; 0,4 y 0,004  $s^{-1}$  a temperatura constante de 180 °C. Todas las experiencias se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno.

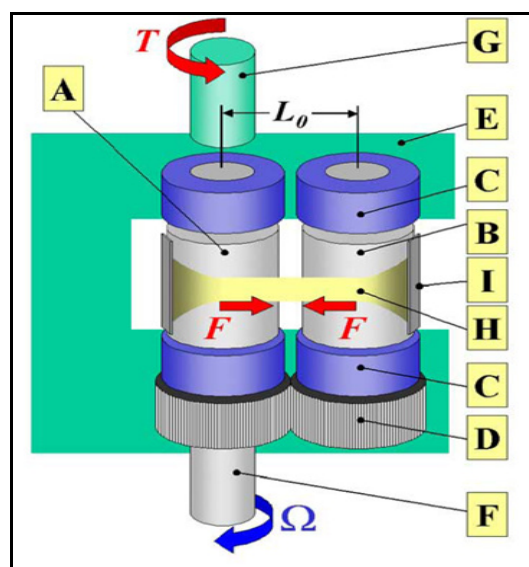


Figura 32. Esquema reómetro extensional. A: cilindro maestro; B: cilindro esclavo; C: rodamiento; D: engranajes; E: bastidor; F: árbol motor; G: árbol de torsión; H: polímero fundido; I: mordazas de sujeción.

El cilindro maestro rota y en sentido contrario rota el cilindro esclavo, enrollando la muestra fijada entre los dos cilindros.

# CAPÍTULO 5: ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL

## 5.1.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIAL DE LOS NANOCOMPÓSITOS

Las Poliolefinas, como Polietileno y Polipropileno, representan más del 60% del volumen mundial de plásticos *commodities*, siendo los polímeros más consumidos en la actualidad. Sin embargo, son materiales inertes a los microorganismos, lo que genera su uso limitado en ciertas aplicaciones en que ellos se encuentran expuestos a la acumulación de microorganismos. Una potencial solución es incorporar agentes antimicrobiales a polímeros *commodities*, presumiendo que el nuevo material adquirirá actividad antimicrobial.

Todos los mecanismos antimicrobiales del cobre involucran la formación del ión  $\text{Cu}^{+2}$ . Por ello, cualquier material capaz de liberar estos iones en forma controlada será antimicrobiano.

En la presente sección se describe y caracteriza una metodología para incorporar nanopartículas de cobre en estado metálico y oxidado a una matriz de Polipropileno. Se estudia su capacidad de liberar al ión  $\text{Cu}^{+2}$  y se relaciona con su actividad antimicrobial.

### 5.1.1.- Caracterización de las nanopartículas comerciales

Para la elaboración de los nanocompósitos se escogieron rellenos comerciales: nanopartículas de cobre metálico procedentes de Versus S.A. (Chile) y nanopartículas de óxido de cobre proporcionadas por la Universidad Federal de Rio Grande do Sul (Brasil). Ellas fueron caracterizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Difracción de rayos X (DRX). Para determinar el tamaño de los aglomerados, las imágenes TEM se analizaron con el programa JImage de libre dominio basado en lenguaje JAVA y con MATLAB.

En la Figura 33 se observa que las nanopartículas de cobre metálico (NPsCu) tienen una forma predominantemente esférica, una distribución de tamaño homogénea de alrededor de  $10 \pm 2$  nm, y que a causa de su pequeño tamaño se aglomeran formando racimos. Teóricamente, es posible calcular la superficie específica de las partículas esféricas a través de la relación:

$$S = 6/(\rho * D_m)$$

**Ecuación 2**

donde  $S$  es el área superficial,  $\rho$  la densidad del cobre ( $8,96 \text{ g cm}^{-3}$ ) y  $D_m$  el diámetro medio de las partículas (10 nm). Así, el área superficial de las partículas se estimó en  $S = 66,9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , considerando que no hay poros.

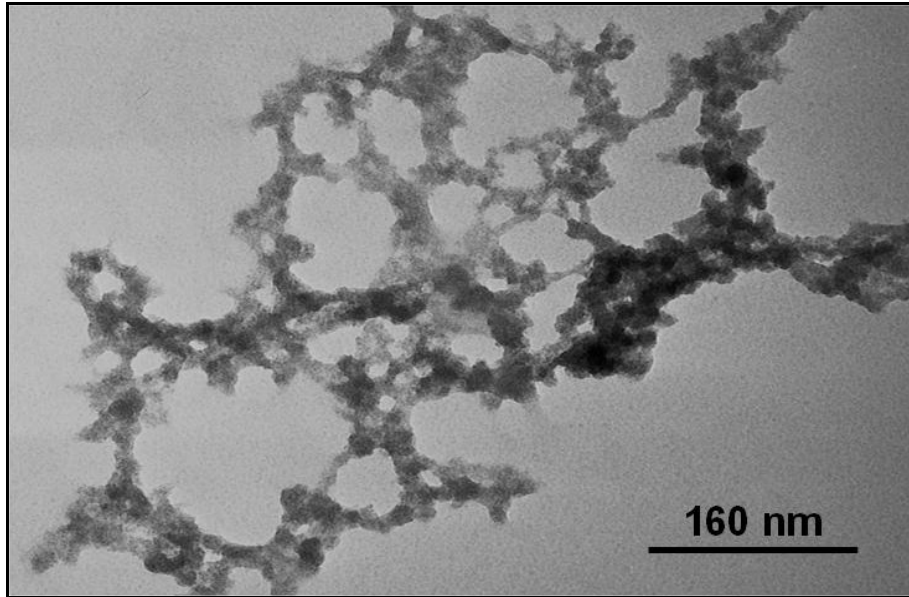


Figura 33. Imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de nanopartículas de cobre.

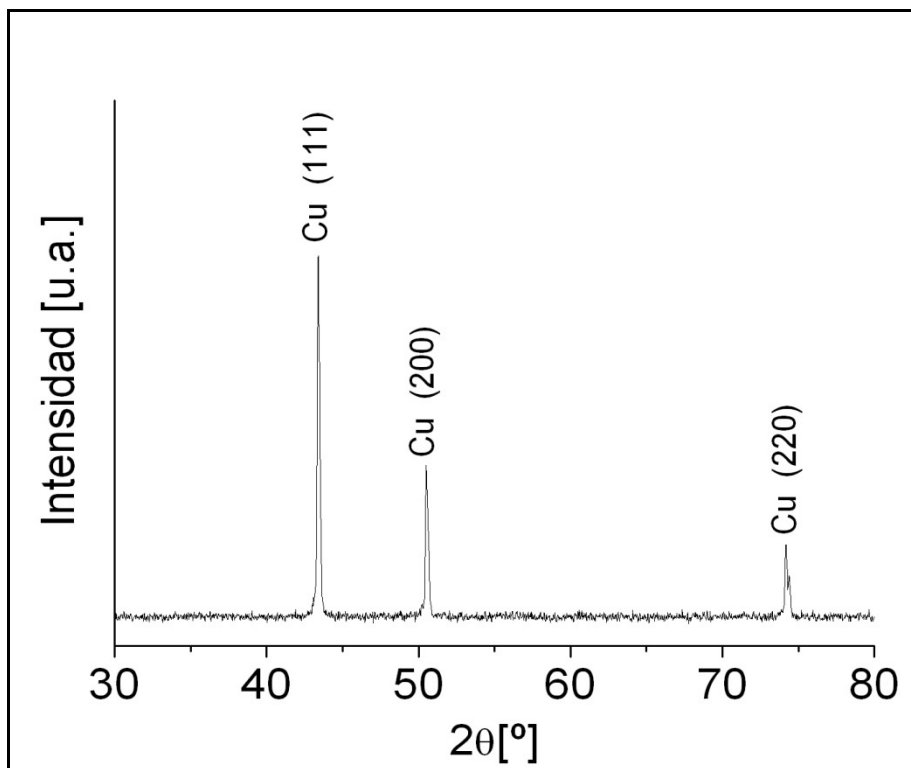


Figura 34. Difracción de rayos X de nanopartículas de cobre.

El patrón de difracción (Figura 34) muestra los picos asociados a las NPsCu. Las nanopartículas corresponden a cobre puro y metálico (estado de oxidación cero) con una estructura cristalina FCC (cúbica centrada en las caras), según lo observado en el difractograma. En la Tabla 21 se enlistan los planos de difracción y los ángulos  $2\theta$  en que difractaron.

Tabla 21. Planos de Difracción de las nanopartículas de cobre.

2 $\theta$	h	k	l
43,28	1	1	1
50,39	2	0	0
74,27	2	2	0

En el patrón no se observan reflexiones de óxidos de cobre, lo que señala que de encontrarse presentes, ellos están en cantidades menores a la resolución del difractor. El difractor no detecta fases que se encuentran en una proporción menor al 3% en peso.

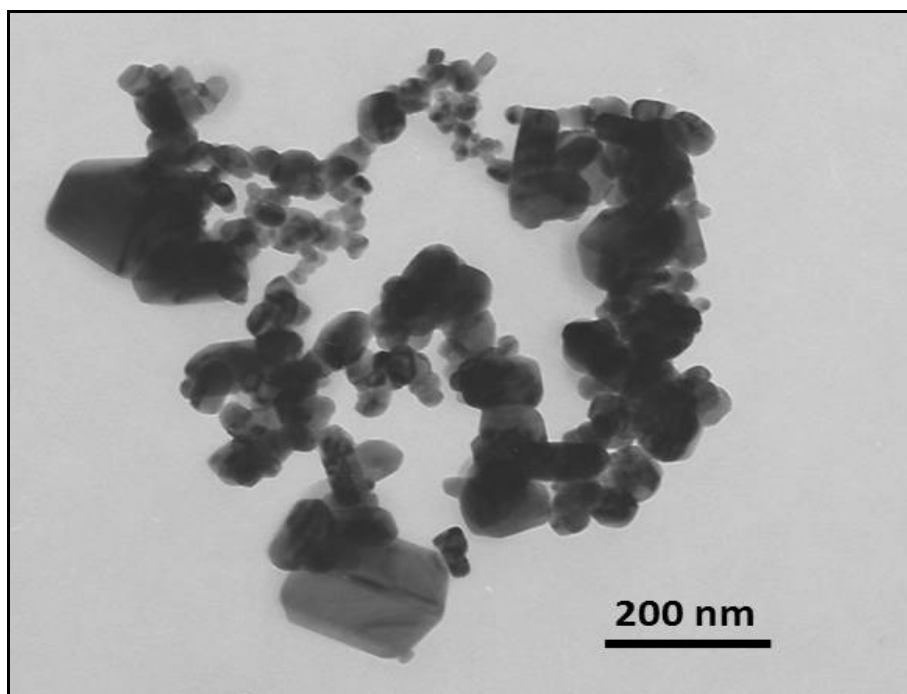


Figura 35. Imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de las nanopartículas de óxido de cobre.

Por otra parte, las nanopartículas de óxido de cobre (NPsCuO) muestran una distribución de tamaños amplia y heterogénea (Figura 35), entre 15 y 200 nm. Su forma es aproximadamente equi-distante sin exhibir contornos agudos. Se estimó un área superficial teórica  $S= 8,8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , considerando un diámetro promedio de 108 nm, una  $\rho=6,31 \text{ g cm}^{-3}$  y la inexistencia de porosidad.

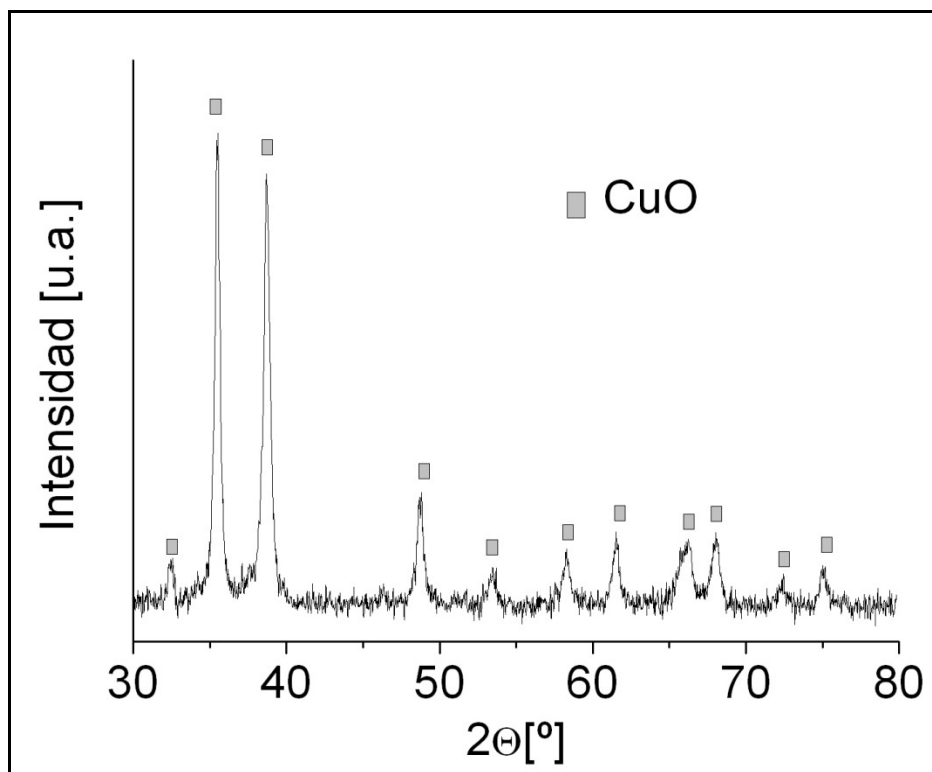


Figura 36. Difracción de rayos X de las nanopartículas de óxido de cobre.

En la Figura 36 se observa su patrón de difracción, las nanopartículas corresponden a óxido cúprico (estado de oxidación +2) que cristaliza en una estructura monoclinica centrada en las bases, sus principales picos en  $2\theta=35,53; 38,68$  y  $48,65^\circ$  corresponden a los planos (-111), (111) y (-202), pero también podrían representar las reflexiones (11-1), (111) y (20-2) de la estructura cristalina llamada Tenorita.

#### 5.1.2.- Caracterización de los nanocompuestos poliméricos

Se elaboraron nanocompuestos con diferentes porcentajes de carga de nanopartículas de cobre, según se resume en la Tabla 22.

Tabla 22. Nanocompuestos poliméricos de Polipropileno con nanopartículas de cobre y nanopartículas de óxido de cobre elaborados por mezcla en fundido.

Matriz	Relleno	
	[% v/v ]	[% p/p ]
Polipropileno comercial isotáctico PH0320 (PP)	1	10
	5	30
	10	50
	20	70

Se utilizó como matriz polimérica un Polipropileno comercial (PP) registrado comercialmente con el código PH0320. Los nanocompuestos fueron preparados por el método de mezcla en fundido, en las condiciones señaladas en la Sección 4.2.

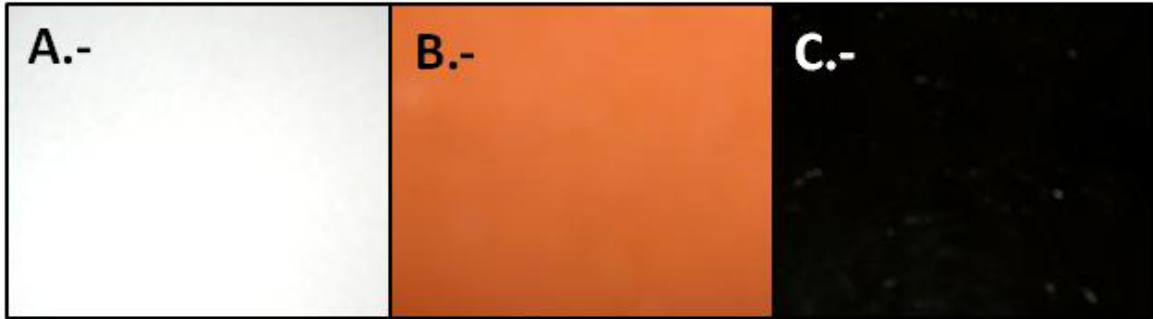


Figura 37. A) Polipropileno; B) Polipropileno con 5% en volumen de NPsCu y C) Polipropileno con 5% en volumen de de NPsCuO.

De esta manera, las correspondientes nanopartículas fueron embebidas en la matriz polimérica y, según se aprecia en la Figura 37, el Polipropileno opaco adquiere la coloración del relleno. Mediante TEM se logró apreciar que las nanopartículas forman aglomerados o clústeres irregulares según se aprecia en la Figura 38 y la Figura 39. Estas imágenes se seleccionaron por ser representativas de las muestras.

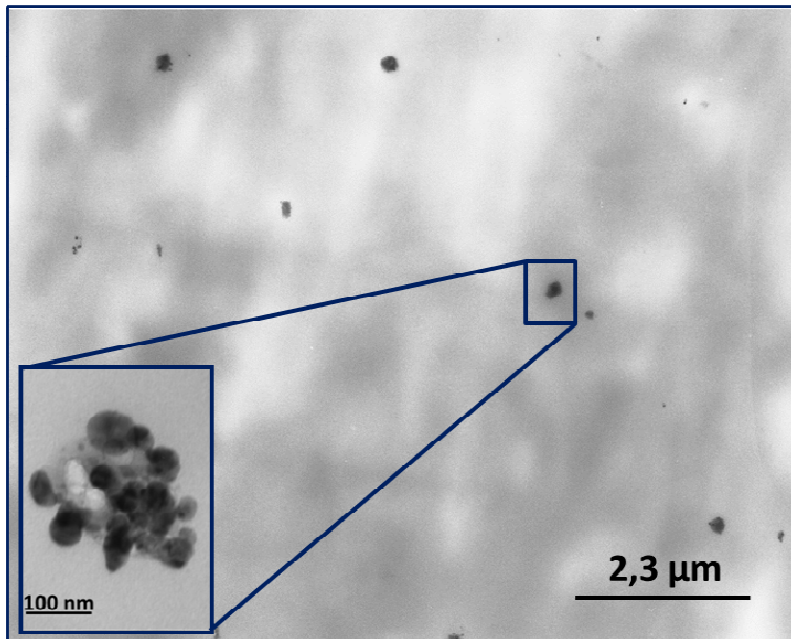


Figura 38. Imagen TEM de Polipropileno con 5% en volumen de nanopartículas de cobre.

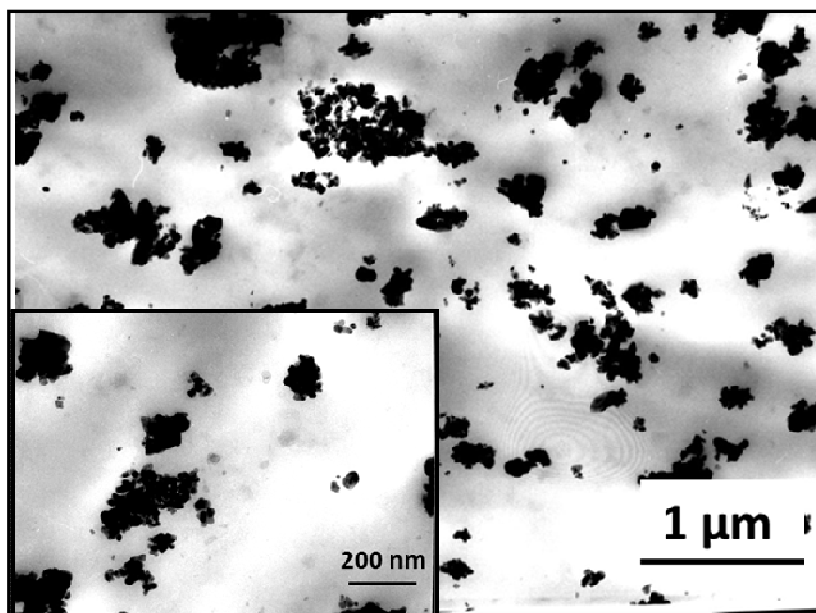


Figura 39. Imagen TEM de Polipropileno con 5% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre.

La muestra con nanopartículas de cobre metálico presenta aglomerados aislados que varían entre los 40 a 100 nm, y que se distribuyen heterogéneamente a lo largo de toda la matriz. Mientras que el nanocompósito con nanopartículas de óxido de cobre presenta aglomerados con tamaños mayores a los 100 nm. Aunque el porcentaje de carga es el mismo para ambos nanocompuestos, pareciera que la densidad del relleno es mucho mayor en la muestra con nanopartículas de óxido de cobre. Por ello se deduce que el nanocompósito con nanopartículas de cobre metálico (Figura 39) contiene clústeres pequeños, que la resolución de la imagen no es capaz de detectar.

La diferencia en las dimensiones de los aglomerados se debe a las diferentes distribuciones de tamaños. Las NPsCu tienen una distribución de tamaños estrecha cercana a los 10 nm, mientras que las NPsCuO poseen una distribución de tamaños ancha (entre 15 y 200 nm). La amplia distribución de tamaños de las NPsCuO se refleja en la heterogeneidad del tamaño de sus aglomerados. Los nanocompuestos con 1, 10 y 20% en volumen de relleno exhiben comportamientos similares.

Cabe recordar que los nanocompuestos poliméricos van a ser testeados con bacterias mediante contacto directo. En tal situación, es importante que los aglomerados de cobre, que corresponden al agente antimicrobial, se encuentren a menor distancia que el tamaño de una bacteria. Las bacterias varían de tamaño entre los 0,5- 700  $\mu\text{m}$  y la distancia de los aglomerados, según las imágenes TEM, son en promedio menores a 1  $\mu\text{m}$ , por lo que deberían comportarse como materiales antibacteriales. También podrían ser considerados materiales antihongos, el tamaño de estos organismos varía desde micrómetros a centímetros. Sin embargo, no deberían ser buenos materiales antivirales, pues estos organismos tienen tamaños pequeños, que van desde 10 nm a 1,4  $\mu\text{m}$ .



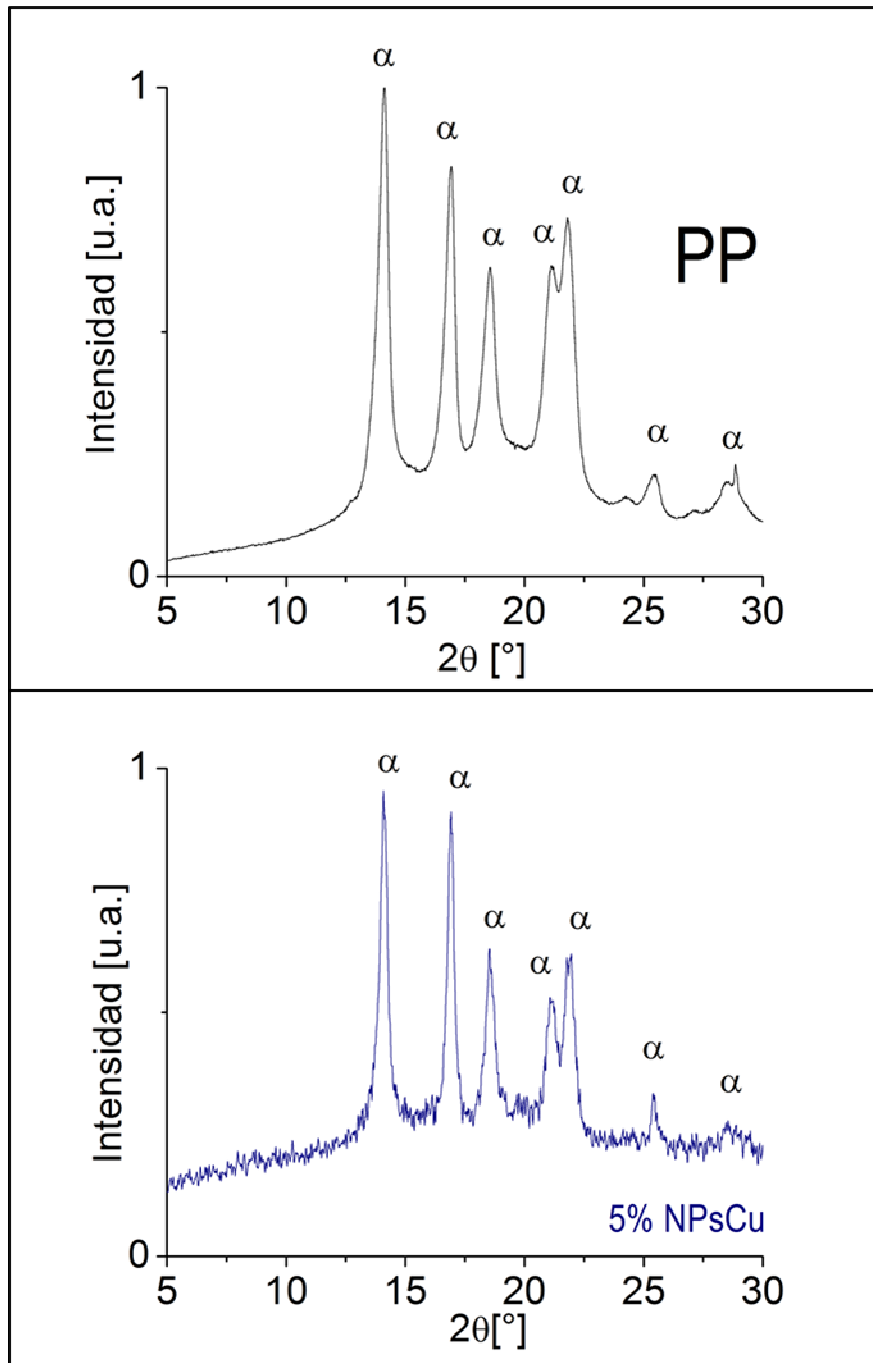


Figura 40. Difracción de rayos X a bajos ángulos de Polipropileno (PP) y Polipropileno con 5% en volumen de nanopartículas de cobre.

El análisis del difractograma a bajos ángulos del Polipropileno puro y del Polipropileno con 5% en volumen de nanopartículas de cobre (Figura 40), realizado a temperatura ambiente, muestra las fases cristalinas originadas. El PP corresponde al Polipropileno comercial PH0320.

El PP es un polímero polimorfo, que puede presentarse de cuatro formas cristalinas conocidas con forma monoclinica ( $\alpha$ ), hexagonal o trigonal ( $\beta$ ), ortorrómbica ( $\gamma$ ) y esméctica o subenfriada [154]. En condiciones habituales de procesado, la forma  $\alpha$  es la

más estable termodinámicamente y es el polimorfismo presente en las mayorías de las aplicaciones industriales. Las reflexiones del PP puro localizadas en aproximadamente  $2\theta=14,16; 16,91; 18,47; 21,13$  y  $21,92^\circ$  están asociadas respectivamente a los planos (110), (040), (130), (111) y (041) del Polipropileno isotáctico cristalizado en la forma monoclinica. La fase amorfa se puede observar entre la línea de background y los picos de difracción de las fases cristalinas [155]. El nanocompósito presenta los mismos picos asociados a la forma monoclinica en  $2\theta= 14,08; 16,82; 18,54; 21,13$  y  $21,91^\circ$  correspondientes a los planos antes mencionados, lo que indica que las nanopartículas de cobre metálico no alteran la estructura cristalina del PP puro.

Las variaciones en las intensidades de los picos pueden indicar que los cristales se ubican en el nanocompósito en posiciones donde sus planos difractan con distinta intensidad, en comparación a PP puro. Similar comportamiento se observó entre el Polipropileno puro y el Polipropileno con 5% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre, según se ve en la Figura 41. El PP y los nanocompósitos fueron ambos elaborados bajo las mismas condiciones de presión, temperatura, torque y tiempo.

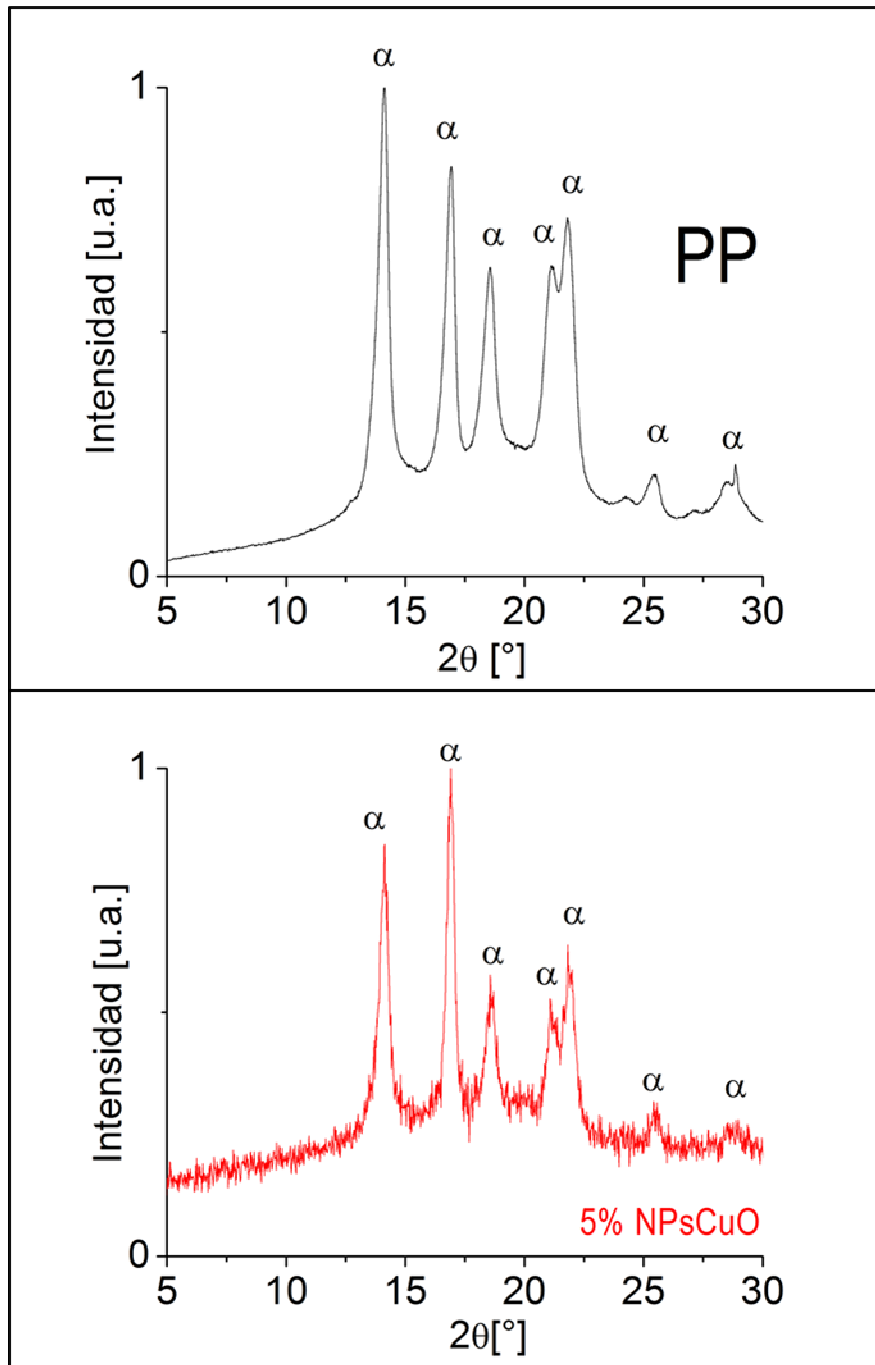


Figura 41. Difracción de rayos X a bajos ángulos de Polipropileno (PP) y Polipropileno con 5% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre.

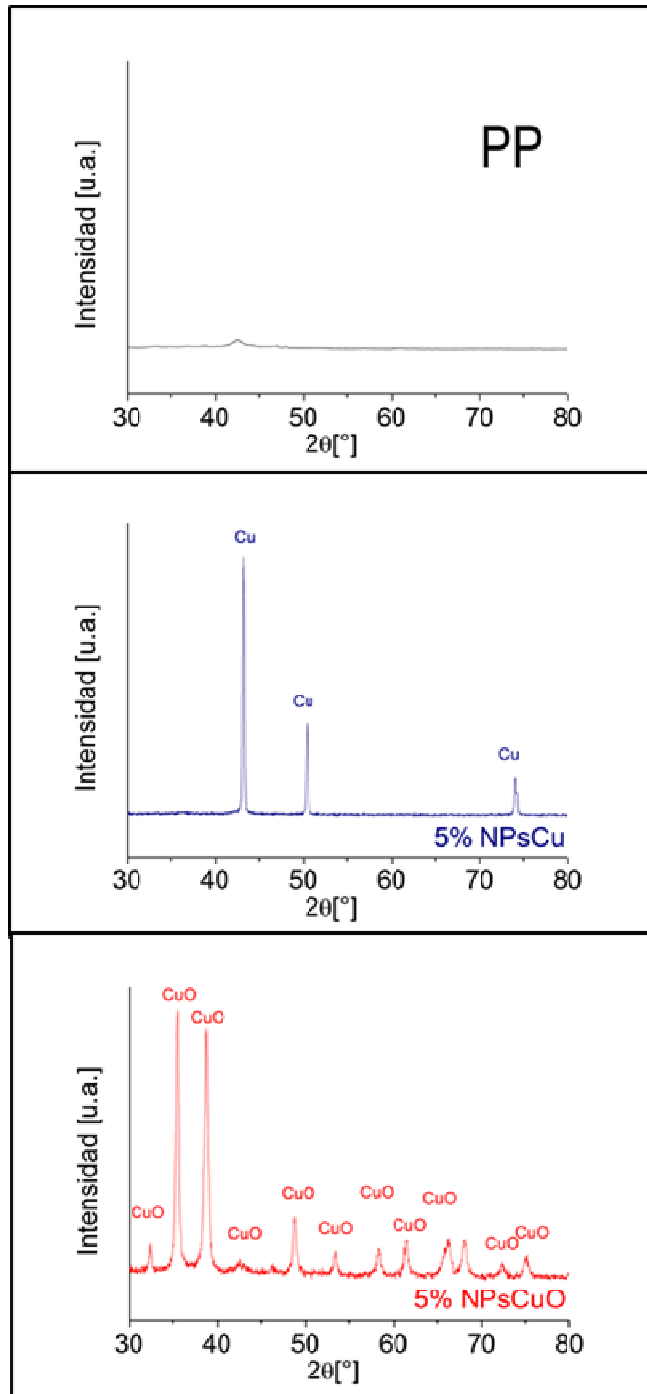


Figura 42. Difracción de rayos X a grandes ángulos de Polipropileno (PP); Polipropileno con 5% en volumen de nanopartículas de cobre y Polipropileno con 5% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre.

Los difractogramas de la

Figura 42 muestran que los compósitos presentan las reflexiones cristalinas asociadas a sus respectivos rellenos, cobre metálico y óxido de cobre. Esto indica que no se formaron nuevas fases, sino que los nanocompósitos son simples mezclas de polímero con nanopartículas.

5.1.3.-. Estudio de las propiedades antimicrobiales

La actividad antimicrobial de los nanocompuestos poliméricos formados por una matriz de Polipropileno y nanopartículas de cobre metálico fue evaluada frente a la bacteria *Escherichia coli* (bacteria Gram negativa) en función de la cantidad de nanopartículas embebida y el tiempo de contacto con el microorganismo.

La concentración inicial bacteriana fue de  $1 \pm 0,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> y después de 30, 90, 120, 180 y 240 minutos de contacto, fue nuevamente testada. Para estimar el número de colonias bacterianas, que corresponden a una unidad formadora de colonia (UFC), el volumen de bacterias contactado con las muestras fue sometido a diluciones secuenciales de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , para hacer practicable el conteo (Figura 49).

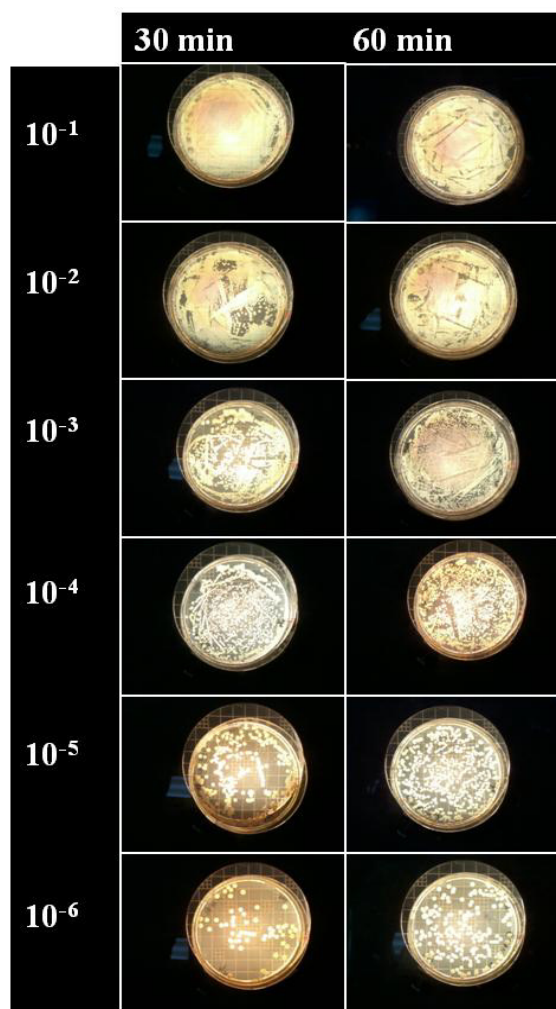


Figura 43. Colonias bacterianas de *Escherichia coli* incubadas sobre placas agar durante 30 y 60 min. Diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ .

Una vez determinada la dilución apropiada, el número de UFC mL<sup>-1</sup> se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$UFC/mL = N^{\circ} \text{ de colonias contadas} / (\text{Dilución} \times \text{Volumen sembrado}) \quad \text{Ecuación 3}$$

Por ejemplo,  $1 \pm 0,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de *Escherichia coli* se contactó con PP, durante 4 horas. Para cuantificar el número de colonias bacterianas viables en el tiempo se utilizó un volumen sembrado de 0,2 mL (200 µL) y una dilución de 10<sup>-6</sup>, registrándose los siguientes datos:

Tabla 23. Recuento de colonias bacterianas viables en Polipropileno.

TIEMPO	Nº DE COLONIAS CONTADAS (TRIPLICADO)	(CFU mL <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>8</sup>
0	--	1±0,5
30	142,5	7,13
90	257,5	12,88
120	441	22,5
180	524,5	26,22
240	551,5	27,58

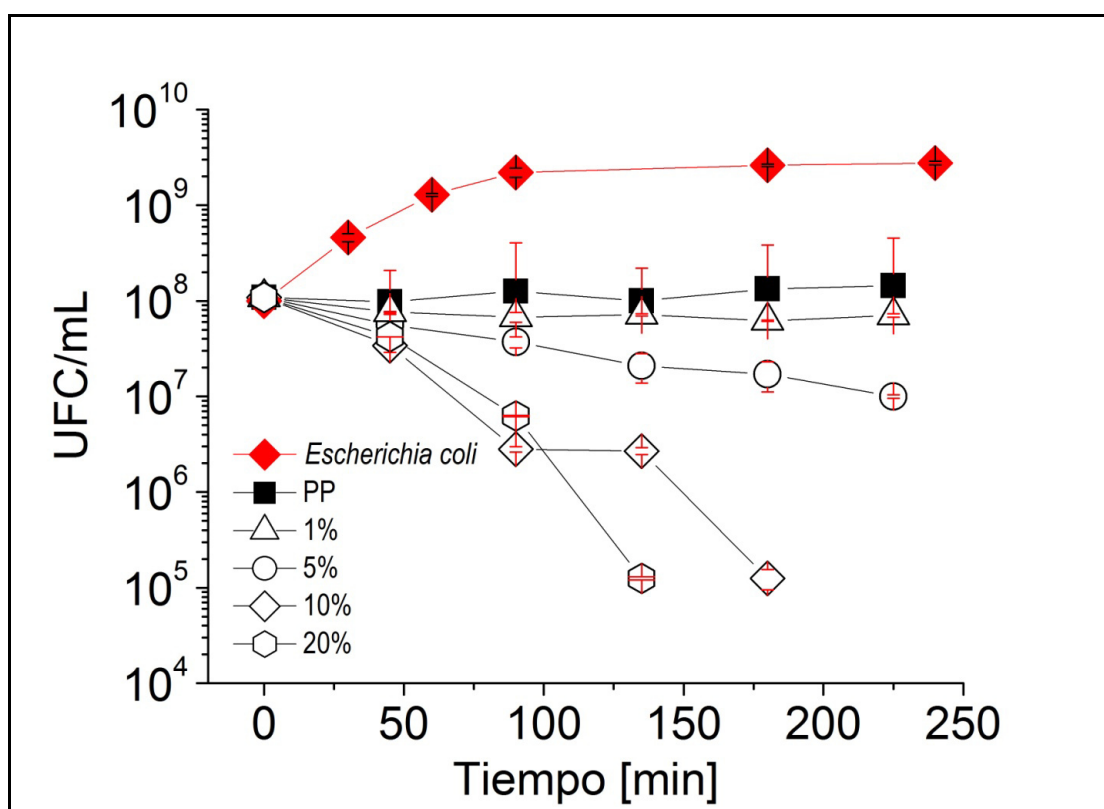


Figura 44. Concentración bacteriana de *Escherichia coli* (Gram negativa) en función del tiempo para los diferentes nanocompuestos poliméricos con nanopartículas de cobre. Concentración inicial:  $1 \pm 0,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>

El crecimiento bacteriano es prolongado durante los primeros 90 minutos, posteriormente el número de bacterias se mantiene casi estable (Figura 44). Normalmente, el crecimiento está limitado por el agotamiento de nutrientes o por la acumulación de productos del mismo metabolismo microbiano, que les son tóxicos. En ausencia de nanopartículas (muestra de control) la concentración bacteriana disminuye con respecto al crecimiento normal de la

bacteria, pero se mantiene constante independiente del tiempo transcurrido. Esto indica que la bacteria sobrevive sobre PP puro, pero no están creciendo nuevas colonias. Por otro lado, la presencia de nanopartículas de cobre metálico, dependiendo de su concentración, disminuye la sobrevivencia de *Escherichia coli* en todos los nanocompuestos.

La muestra con 1% en volumen de nanopartículas disminuye en un 60% la concentración bacteriana después de 30 min de contacto, sin mostrar mayor variación hasta los 240 min. Esta muestra es capaz de eliminar a la bacteria durante los primeros 30 min (efecto *cidal*), después sólo logra inhibir el crecimiento bacteriano de las colonias (efecto *estático*).

En el resto de los nanocompuestos poliméricos predomina el efecto *cidal*, dado que la concentración bacteriana decrece continuamente con el tiempo. La muestra con 5% en volumen de nanopartículas redujo la concentración bacteriana en un 90% después de 240 min, mientras los nanocompuestos con 10 y 20% en volumen la disminuyeron en un 99,9% después de 180 y 120 minutos de contacto, respectivamente. En consecuencia, el material formado por nanopartículas de cobre metálico embebidas en una matriz de Polipropileno presenta actividad antimicrobiana al eliminar o inhibir el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* y su efectividad antibacteriana depende del contenido de cobre y el tiempo de contacto.

Otros estudios demostraron que bajo similares condiciones de testeo, Cu-Zn y aleaciones Cu-Ni (con contenido de Cu  $\geq 20\%$  en volumen) eliminan todas las colonias de *Escherichia coli* después de 180 min. Similar efectividad obtuvieron los nanocompuestos con 10 y 20% en volumen de nanopartículas de cobre [24,25,156].

La actividad antimicrobiana de los nanocompuestos con 1 y 5% en volumen de nanopartículas de cobre fue testada a través de las bacterias más comunes involucradas en las infecciones intrahospitalarias, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva). El volumen de bacterias contactado con las muestras fue sometido a diluciones secuenciales (Figura 45 y Figura 46) para hacer practicable el conteo.



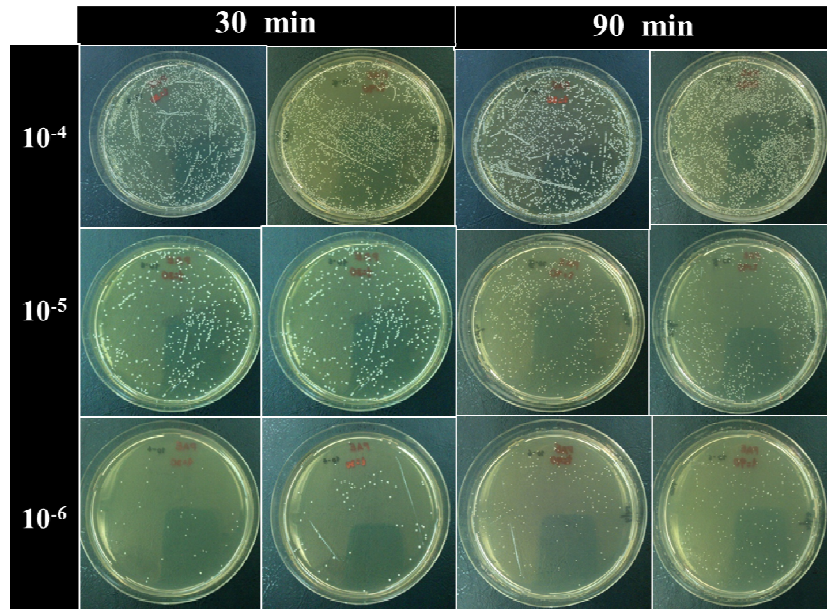


Figura 45. Colonias bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* incubadas sobre placas de agar durante 30 y 90 min. Diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ .

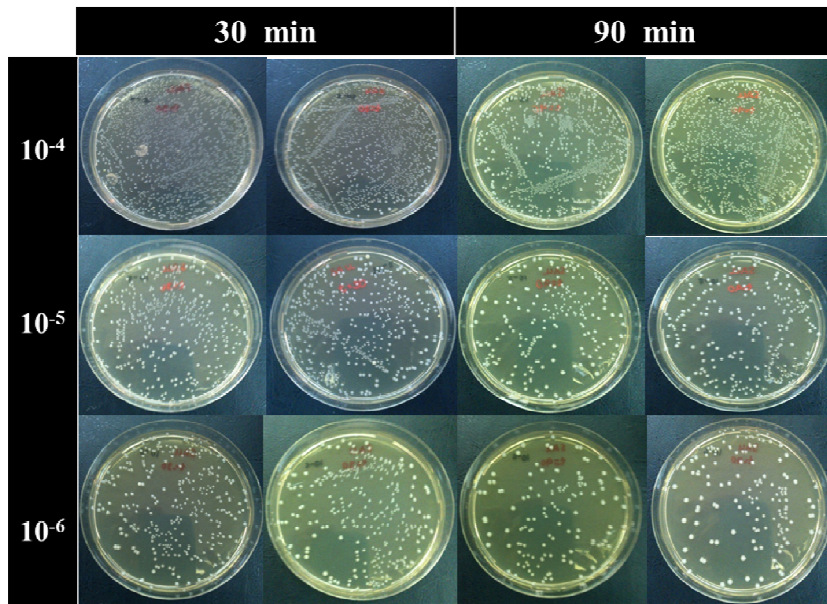


Figura 46. Colonias bacterianas de *Staphylococcus aureus* incubadas sobre placas de agar durante 30 y 90 min. Diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ .

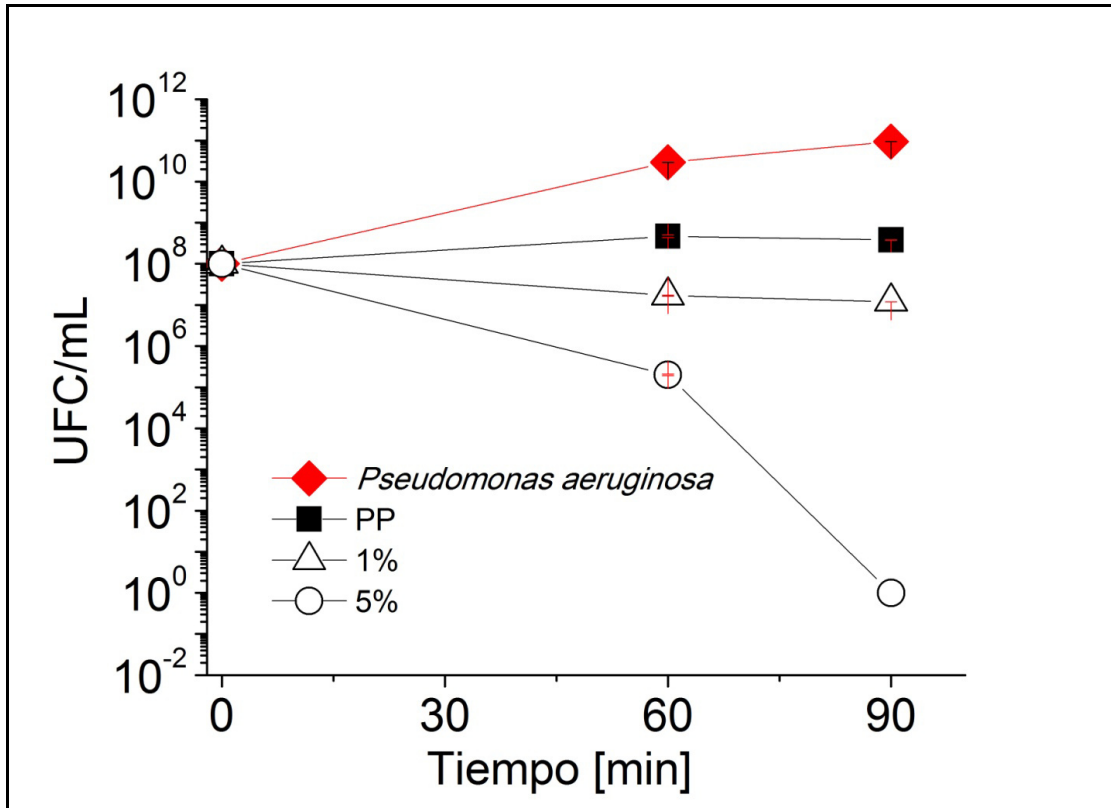


Figura 47. Concentración bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa) en función del tiempo para los diferentes nanocompuestos poliméricos con nanopartículas de cobre. Concentración inicial:  $1 \pm 0,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>

De acuerdo a la Figura 47, el crecimiento bacteriano de la *Pseudomonas aeruginosa* incrementa hasta los 90 min. La concentración bacteriana de este patógeno sobre la superficie de la muestra de control (PP puro) es menor al crecimiento bacteriano normal y no cambia notoriamente entre los 60 y 90 min. Similar comportamiento se observó en el crecimiento bacteriano de la *Staphylococcus aureus* sobre PP puro.

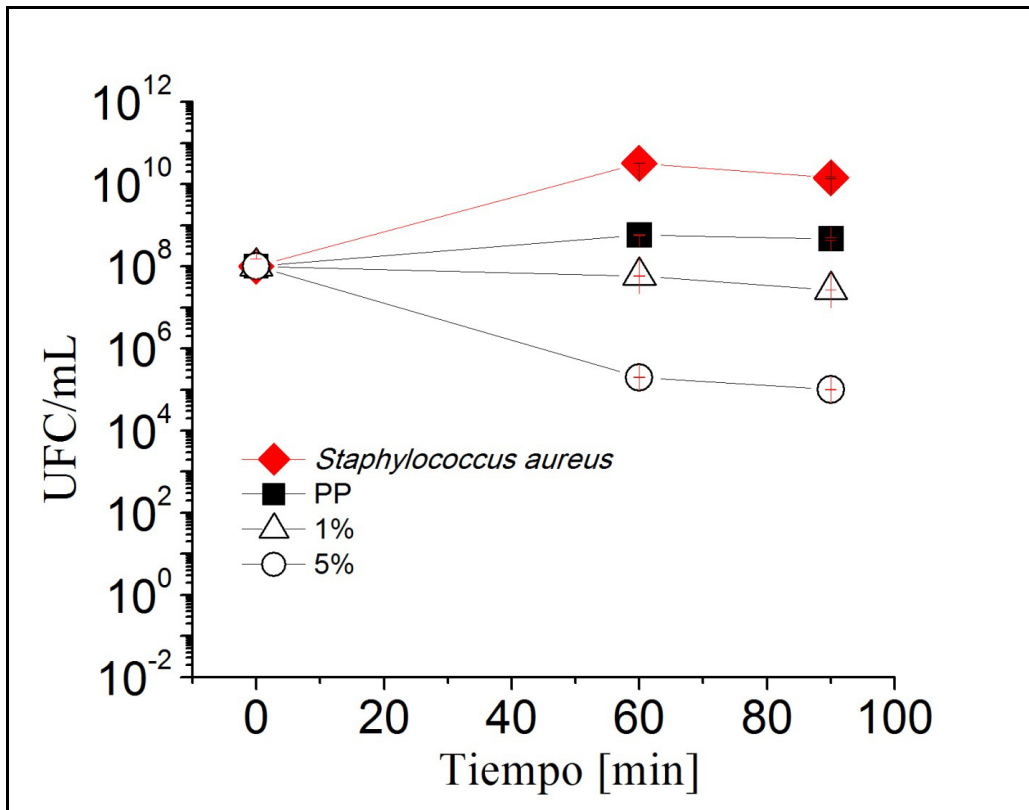


Figura 48. Concentración bacteriana de *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) en función del tiempo para los diferentes nanocompuestos poliméricos con nanopartículas de cobre. Concentración inicial:  $1 \pm 0,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>

Por otro lado, la presencia de bajas cantidades de nanopartículas de cobre produce un efecto bactericida sobre ambos microorganismos, decreciendo la concentración bacteriana inicial. Este comportamiento depende del tipo de bacteria, el contenido de cobre y el tiempo de contacto transcurrido. En particular, en la Figura 48 se observa que el nanocompuesto con 1% en volumen disminuye la concentración inicial de la *Pseudomonas aeruginosa* en un 83% a los 60 min, mientras la muestra con 5% en volumen la reduce en un 99% en el mismo tiempo, y elimina completamente a las colonias bacterianas a los 90 min. Con respecto a la *Staphylococcus aureus*, el nanocompuesto polimérico con 1% en volumen disminuye la sobrevivencia de la bacteria en un 73% después de 90 min, mientras que la muestra con 5% en volumen la reduce en un 99,9% en el mismo tiempo. Entonces, PP con 5% en volumen de nanopartículas muestra excelente actividad antibacteriana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, a cortos tiempos (90 min). También, se infiere que durante los primeros 60 min la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa) es más sensible a las nanopartículas de cobre.

En consecuencia, 1) PP es un material inerte frente a las diferentes bacterias estudiadas, 2) PP con nanopartículas de cobre embebidas demuestra actividad antibacteriana frente a las bacterias *Escherichia coli* (Gram negativa), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) y 3) la eficacia de los nanocompuestos poliméricos depende del tipo de bacteria, contenido de cobre y tiempo de contacto.

### 5.1.3.1.- Efecto del tipo de nanopartícula

Para estudiar el efecto del tipo de nanopartícula de cobre en la actividad antimicrobial de los nanocompuestos, se estudió la sobrevivencia de la bacteria *Escherichia coli* expuesta a nanocompuestos con 5% en volumen de nanopartículas de cobre metálico y nanopartículas de óxido de cobre.

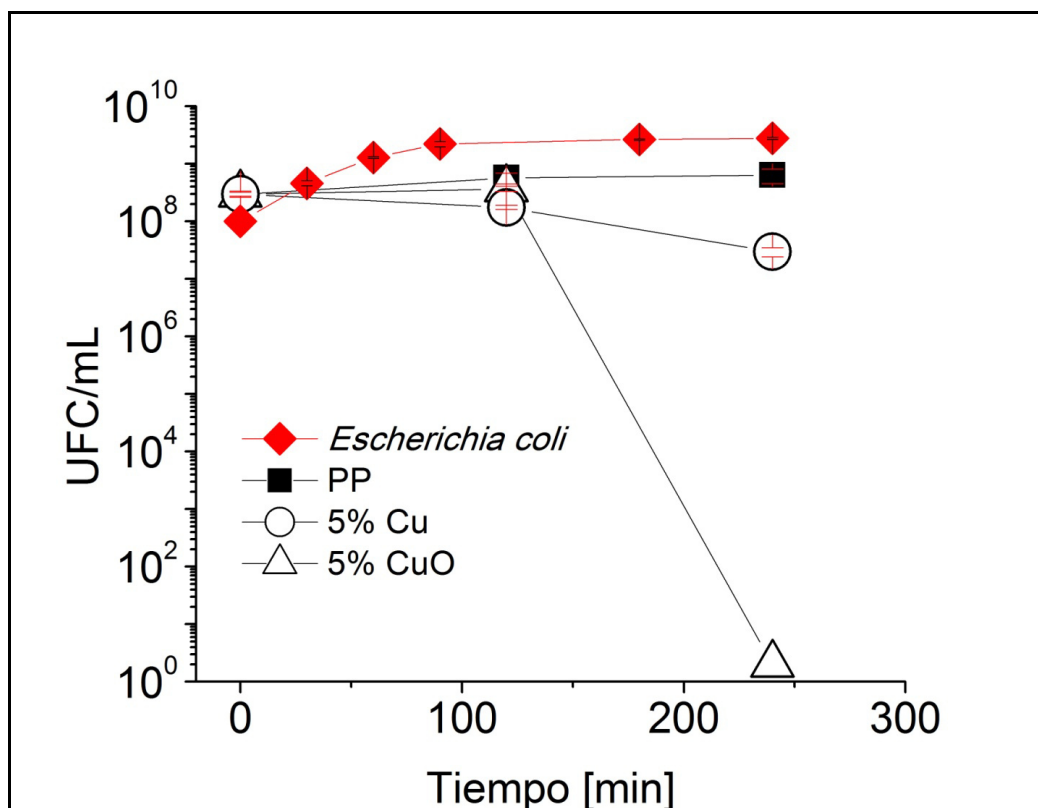


Figura 49. Efecto del tipo de nanopartícula en la sobrevivencia de la bacteria *Escherichia coli*.

Se observa que después de dos horas de contacto (120 min) ambos materiales eliminan cerca del 50% de la población bacteriana. Luego de 240 min el nanocompuesto con nanopartículas de cobre metálico la reduce en un 90%, mientras que el nanocompuestos con de óxido de cobre elimina más del 99,99%.

Los resultados expuestos en la Figura 49 tienen tres consecuencias principales: 1) Polipropileno con nanopartículas de óxido cúprico es efectivo eliminando a la bacteria *Escherichia coli*; 2) la actividad antimicrobial de los nanocompuestos depende del tipo de nanopartícula y 3) los nanocompuestos con nanopartículas de óxido de cobre son más efectivos eliminando al patógeno *Escherichia coli*.

### 5.1.4.-. Estudio de la liberación de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ )

Para entender el comportamiento antimicrobial de los nanocompuestos poliméricos, estos fueron inmersos en agua desionizada y su liberación de iones cúpricos fue

cuantificada. En este aspecto es importante notar que el ión cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) es altamente inestable en soluciones acuosas y se oxida rápidamente (menos de 1 segundo) al ion cúprico  $\text{Cu}^{+2}$  [93].

Para llevar a cabo el estudio, se escogió agua desionizada, que es un medio levemente ácido con pH 5,51 y con una conductividad eléctrica baja, de  $0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$ , debido a la escasa presencia de iones.

#### 5.1.4.1.-Liberación de iones desde Polipropileno (PP) con nanopartículas de cobre metálico (NPsCu)

En la Figura 50 se observa la liberación de iones (agente activo antimicrobial) desde todos los nanocompuestos poliméricos con nanopartículas de cobre metálico sumergidos en agua desionizada durante 100 días, mientras que la Figura 52 representa su velocidad de liberación.

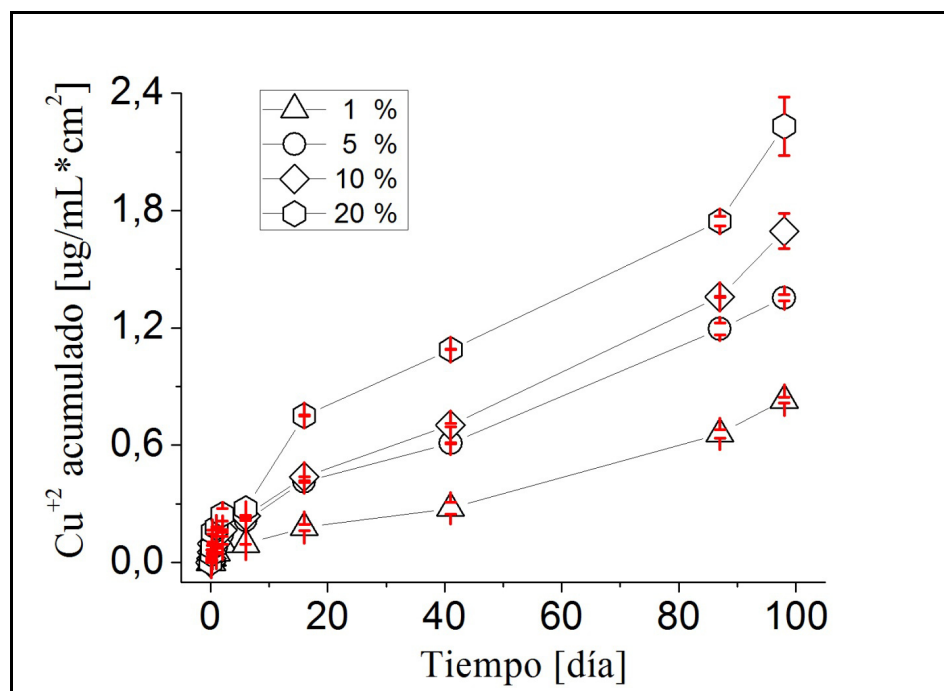


Figura 50. Liberación de  $\text{Cu}^{+2}$  desde nanocompuestos de Polipropileno con nanopartículas de cobre metálico sumergidos en agua desionizada.

Es importante destacar que a pesar de la **apolaridad** del Polipropileno, las nanopartículas de cobre embebidas son capaces de liberar iones cúpricos fuera de la matriz. También se observa que la liberación de iones incrementa con el tiempo de inmersión y la cantidad de nanopartículas. En particular, los nanocompuestos con 5 y 10 % en volumen no exhiben una notoria diferencia durante los primeros 40 días, pero luego la diferencia en la liberación de iones incrementa en el tiempo. Además, claramente se distingue que entre estos materiales no existe una relación lineal entre el contenido de nanopartículas y su liberación de iones cúpricos.

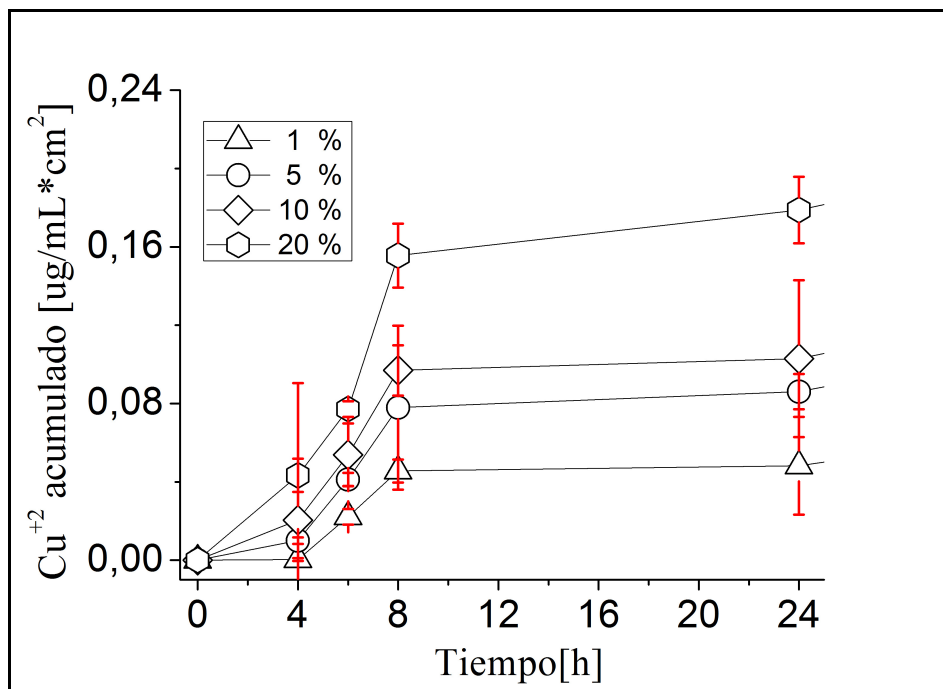


Figura 51. Comparación de la liberación a cortos tiempos desde nanocompuestos de Polipropileno con nanopartículas de cobre metálico sumergidos en agua desionizada.

Al comparar la cuantificación de iones durante el primer día, en la Figura 51 se aprecia que las diferencias son más evidentes con el paso tiempo. A las 4 horas no se tienen claras tendencias en las liberaciones, siendo importante el error de las mediciones. En vista de lo anterior, no es posible relacionar con certeza la tasa de liberación al tiempo 4 horas con los porcentajes de reducción de la bacteria *Escherichia coli* señalados en la sección anterior. Un estudio de Cioffi y colaboradores [120] señala que contrastes en la eficiencia antimicrobial se relaciona por diferencias en la liberación de iones en el rango de ppb (partes por billón):

Tabla 24. Correlación entre %p/p de nanopartículas de cobre en PVMK, crecimiento de UFC tras 4 h y liberación de cobre tras 4h [120].

PVMK/Cu (% p/p)	UFC <sub>inicial</sub> (tiempo 0 h)	UFC <sub>final</sub> (tiempo 4h)	Cu <sup>+2</sup> [ppb] <sub>4h</sub>
5	1600	1100	398
25	1600	52	1080

Microorganismo testado: *S. cerevisiae* (hongo); PVMK: Polivinil metil cetona; UFC: Unidades formadoras de colonias.

No es posible corroborar que la bacteria es altamente sensible a diferencias en el rango de ppb, pero podrían existir otros tipos de mecanismos letales contra la bacteria *Escherichia coli*.

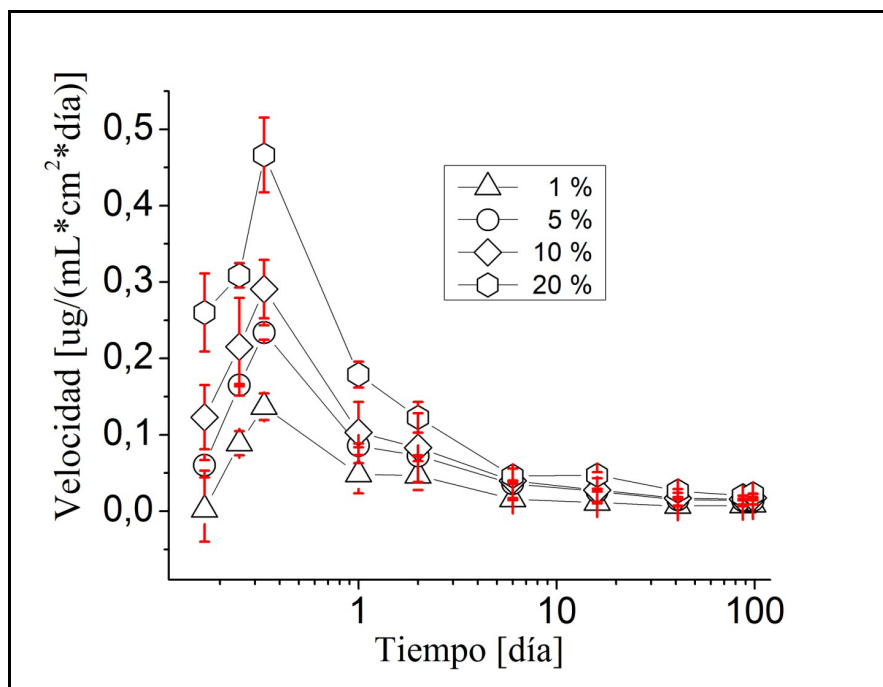


Figura 52. Velocidad de liberación de  $\text{Cu}^{+2}$  desde nanocompuestos de Polipropileno con nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada.

En la Figura 52 se ve que todos los nanocompuestos tienen una velocidad de liberación que incrementa rápidamente durante las primeras horas de exposición en el agua con un máximo de velocidad durante el primer día ( $\sim 10$  h). Después de este período, la liberación de iones decrece con el tiempo hasta un nivel constante registrando una liberación de orden cero (no depende del cambio en el tiempo de la concentración de las nanopartículas presentes en los nanocompuestos). Polipropileno con 1% en volumen de nanopartículas de cobre metálico demoró 6 días en alcanzar una tasa de liberación estable, mientras que con un 20% en volumen demoró 41 días.

La rápida liberación en tiempos cortos es conocida como “*liberación explosiva*” en sistemas de liberación de drogas desde matrices poliméricas [157]. Esta “*explosión*” es comúnmente atribuida a la liberación de drogas que se encuentran en la superficie de la matriz, seguida por una difusión gradual de la droga desde las capas internas del polímero. En un estudio previo, el análisis por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) indicó que los nanocompuestos estudiados en esta tesis no presentan cobre en la superficie de la matriz [158], por lo cual la liberación explosiva no se debe a la ubicación de nanopartículas superficiales. Entonces, los iones de cobre difundirían rápidamente desde el seno del material al exterior, como consecuencia de la gran superficie específica de las nanopartículas [109], produciéndose el fenómeno de “*liberación explosiva*”. Posteriormente, la liberación se ve disminuida por la dificultad del contacto entre el agua, oxígeno y las nanopartículas que se encuentran en las capas más internas del material, alejadas de las superficies. La alta liberación a tiempos cortos evitaría el asentamiento inicial de microorganismos y disminuiría la probabilidad de formación de bio-películas bacterianas complejas.

Como se mencionó antes, nanopartículas de cobre no fueron detectables en la superficie del material según los estudios de XPS. Por lo tanto, disminuye el riesgo de liberación de nanopartículas desde los nanocompuestos al exterior, que podrían causar efectos tóxicos al ser ingeridas, inhaladas o al tener contacto con la piel. Por ejemplo, Chen y colaboradores [159] compararon la toxicidad de nanopartículas (23,5 nm) y micropartículas (17  $\mu\text{m}$ ) de cobre al exponer a ratones a ingerirlas vía oral, concluyendo que las nanopartículas son más tóxicas. El DL50<sup>12</sup> para nanopartículas fue de 413 mg kg<sup>-1</sup>, mientras que para micropartículas fue mayor a 5000 mg kg<sup>-1</sup>.

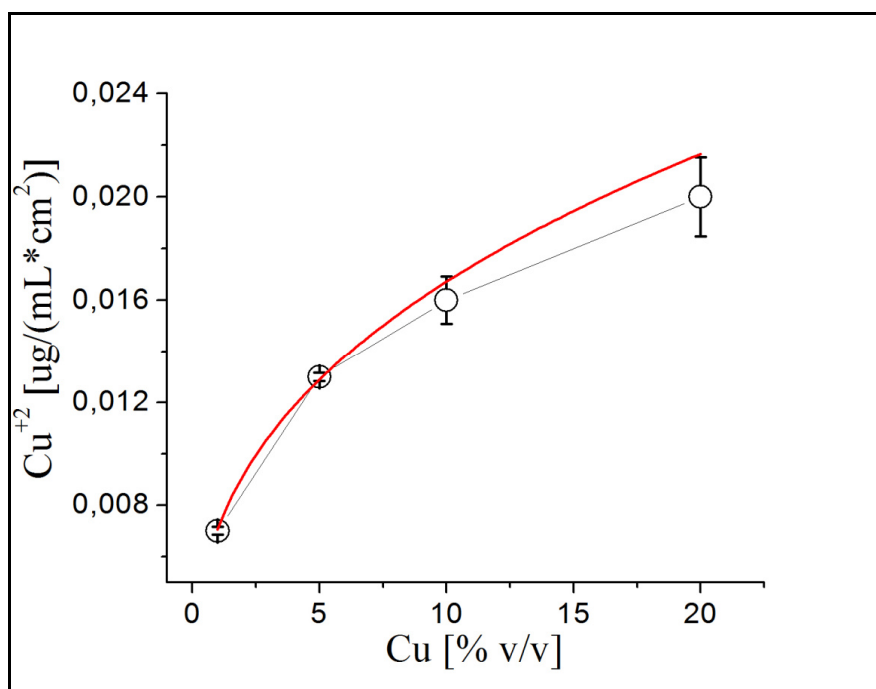


Figura 53. Velocidad de liberación de Cu<sup>+2</sup> desde los nanocompuestos al día 100 en función la fracción volumétrica de cobre contenido en el nanocompuesto.

En la Figura 53 se graficó la velocidad de liberación que tienen los nanocompuestos en el día 100. La velocidad incrementa proporcionalmente con la fracción volumétrica de nanopartículas de cobre embebidas en una matriz de Polipropileno y esta relación se ajusta a una curva alométrica ( $f(x) = ax^b$ ), donde  $b \approx 1/2$ . Similar comportamiento reportaron Roseman y colaboradores [160] en sistemas de liberación de fármacos embebidos en un polímero sólido, la cantidad de droga liberada es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo, y la velocidad de liberación disminuye gradualmente. Este comportamiento no lineal debido que al aumentar el contenido de relleno también aumenta la probabilidad de formación de aglomerados, decreciendo la superficie expuesta.

Es importante destacar que el Polipropileno casi no absorbe agua dado que es un polímero hidrofóbico, sólo valores de absorción de 0,7 % p/p después de 400 horas han sido reportados [161]. El mecanismo de absorción de agua en el Polipropileno sería a través de sus poros intrínsecos o zona amorfa. Agua y oxígeno difunden al interior, a través de la

<sup>12</sup> DL50: Dosis Letal. Miligramos (mg) de una sustancia necesarias por un kilogramo (Kg) de peso de un animal para matar el 50% de la población.



zona amorfa hasta tomar contacto con las nanopartículas, entonces ocurre el proceso de corrosión del cobre y finalmente la difusión de los iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) fuera de la matriz. El proceso de corrosión en la superficie de las nanopartículas ocurre de acuerdo al mecanismo expuesto en la Sección 2.2.3.2

La Figura 54 resume todos los mecanismos que involucran la corrosión de cobre en la matriz de Polipropileno y la posterior difusión de iones que explica la actividad antimicrobial reportada:

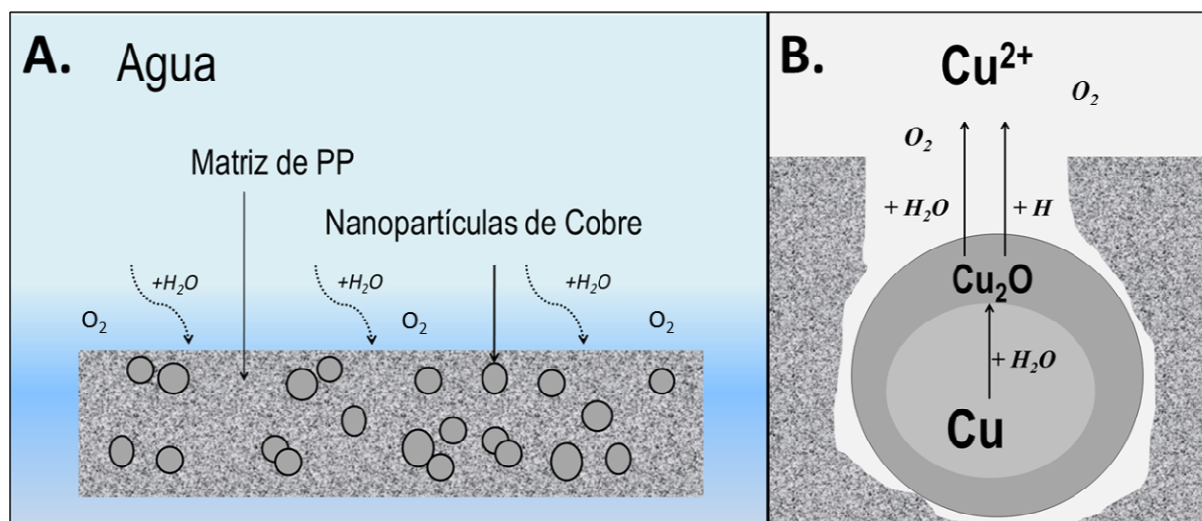


Figura 54. Esquema del proceso de difusión a través de la matriz de PP. A) Difusión de agua dentro del nanocompuesto. B) Proceso de corrosión de la superficie de las nanopartículas y difusión de iones fuera del nanocompuesto.

La difusión de iones desde el volumen del material es a través de dos tipos de poros, los inherentes a la matriz polimérica y los adquiridos por la erosión de las nanopartículas, por lo cual la rapidez del contacto entre los reactantes depende de la porosidad y tortuosidad del material y, en consecuencia, de ellas depende la velocidad de liberación de iones cúpricos.

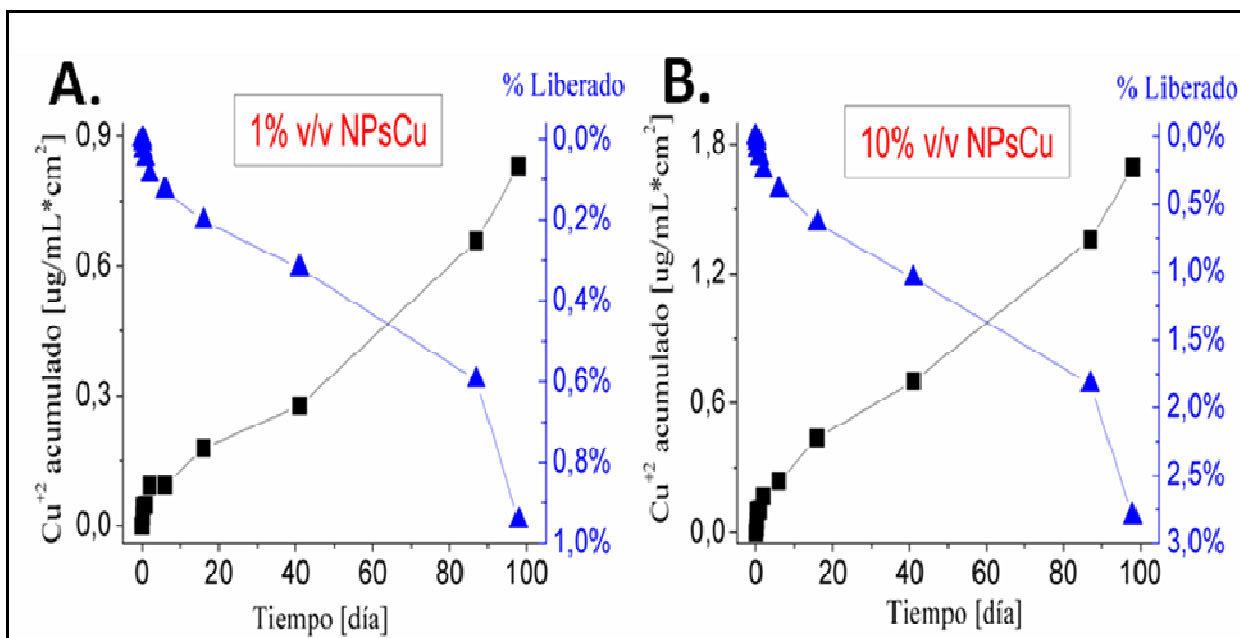


Figura 55. Liberación acumulada de  $\text{Cu}^{+2}$  y porcentaje de cobre liberado con respecto al contenido inicial de cobre en función del tiempo, desde los nanocompuestos poliméricos con A) 1% y B) 10% en volumen de nanopartículas de cobre metálico hasta el día 100.

Es complejo predecir la duración de la actividad antimicrobial de estos materiales, por varias razones: 1) desconocimiento de algunos procesos de corrosión; 2) grado de agregación de las nanopartículas; 3) variación de las condiciones de temperatura, pH y humedad e 4) incerteza del contacto entre los reactantes (agua, oxígeno, cobre). En la Figura 55 se compara el porcentaje cobre liberado con respecto al contenido inicial de cobre de los nanocompuestos con 1% y 10% en volumen de nanopartículas de cobre metálico. Ambos casos muestran un bajo porcentaje de liberación, un 1 y 3% hasta el día 100, respectivamente.

Al considerar que reacciona todo el cobre contenido y este se libera a una velocidad constante de  $\sim 4,8 \text{ ug día}^{-1}$  (velocidad promedio de liberación registrado al día 100), estos materiales se mantendrían liberando iones por un período mayor o igual a 30 años. Cai y colaboradores [110] señalaron que sólo un 33% de cobre nanométrico embebido en Polietileno de Baja Densidad (PEBD) es liberado al exterior. Este antecedente reduciría los tiempos de vida media de estos materiales en al menos un tercio.

En orden a confirmar el mecanismo de corrosión, se estudió el difractograma del nanocompuesto polimérico con 5 % en volumen de nanopartículas de cobre metálico antes y después de 100 días de inmersión en agua desionizada (Figura 56).

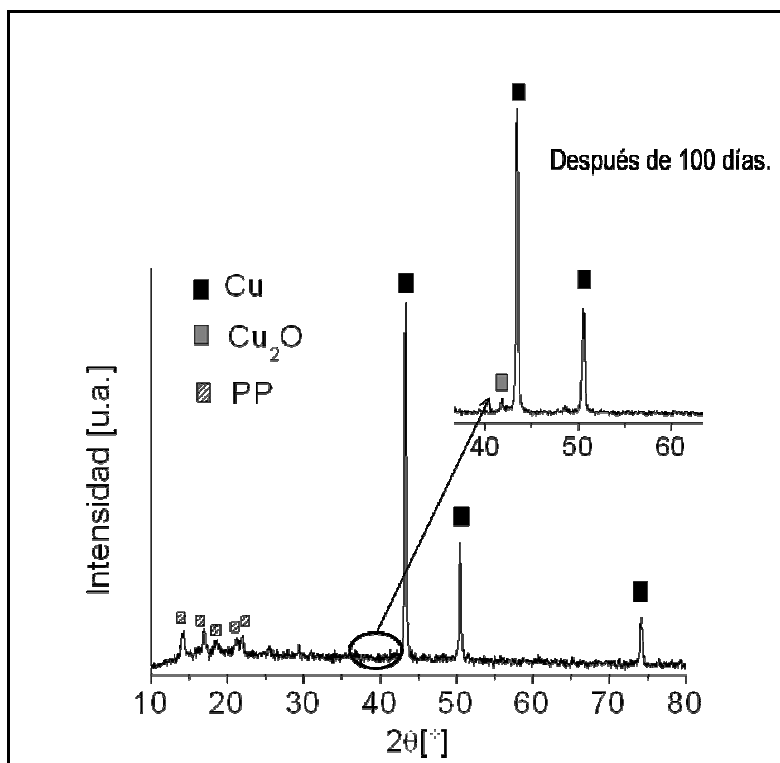


Figura 56. Difractograma del nanocompuesto polimérico con 5% en volumen de nanopartículas de cobre antes y después de 100 días de inmersión en agua.

El nanocompuesto inicialmente sólo tiene las reflexiones asociadas al cobre metálico en las posiciones  $2\theta = 43,3; 50,5$  y  $74,2^\circ$ , sin evidenciar presencia de óxidos. Únicamente, después de la inmersión durante un largo periodo se forma el pico a  $2\theta = 41,7^\circ$  correspondiente a la fase de óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), confirmando el proceso de corrosión. El  $\text{Cu}_2\text{O}$  se forma como una delgada capa sobre la superficie de la nanopartícula, esta capa puede pasivar o lentificar el proceso de corrosión [11]. No obstante, en este caso la intensidad del pico es muy baja en comparación a las reflexiones del cobre metálico; eso significa que el óxido cuproso es muy escaso.

#### **5.1.4.2.-Liberación de iones desde Polipropileno (PP) con nanopartículas de óxido de cobre (NPsCuO)**

Se cuantificó la liberación de iones de estos materiales en las condiciones antes señaladas, sumergidos en agua desionizada a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) por 100 días.

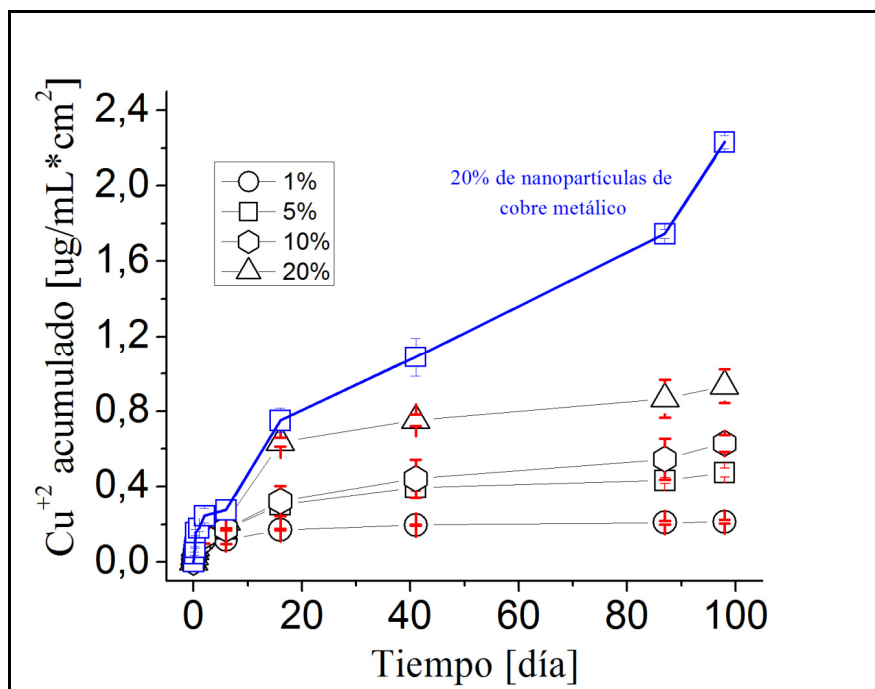


Figura 57. Liberación de  $\text{Cu}^{+2}$  desde nanocompósitos de Polipropileno con nanopartículas de óxido de cobre sumergidas en agua desionizada.

Los nanocompósitos presentaron una baja capacidad de liberación de iones (Figura 57), que aumenta con el tiempo y la cantidad de nanopartículas. Según la gráfica, todos los valores registrados se encuentran son menores a los valores de la liberación de los nanocompósitos con igual contenido de nanopartículas, pero en estado metálico (ver Figura 51). A modo de ejemplo, se comparan las curvas de las muestras con 20% en volumen de nanopartículas en estado metálico y oxidado. Se concluye que esta última tiene liberaciones similares en periodos menores a los 10 días y luego es supera constantemente, hasta ser doblada al día 100. Comportamientos similares se observaron para el resto de las muestras.

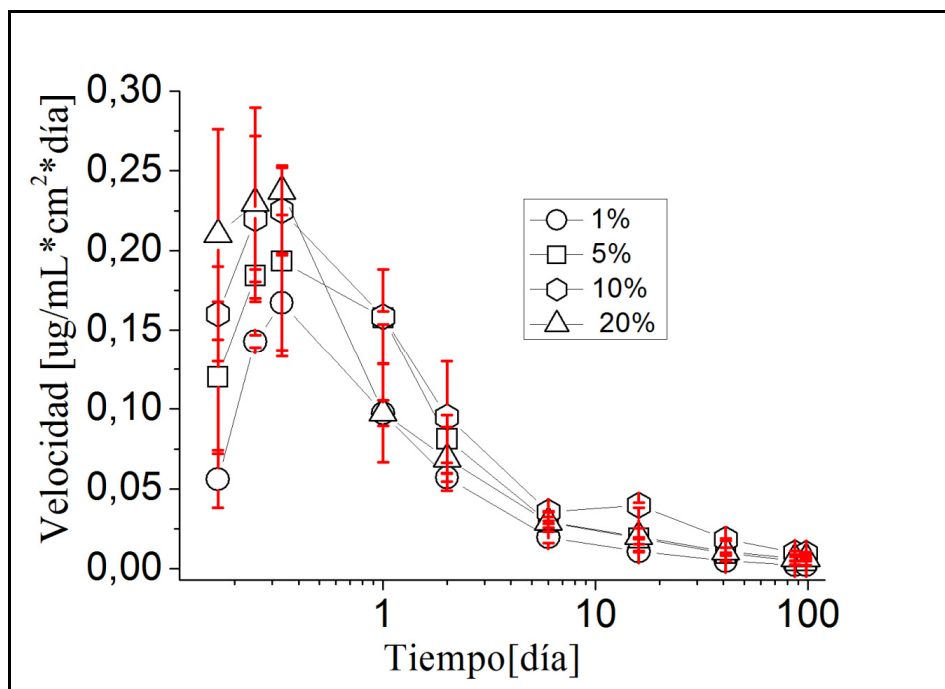


Figura 58. Velocidad de liberación de  $\text{Cu}^{+2}$  desde nanocompuestos de Polipropileno con nanopartículas de óxido de cobre sumergidas en agua desionizada.

La máxima tasa de liberación se tiene aproximadamente a las 10 h para todos los nanocompuestos, luego la tasa decrece hasta un nivel casi constante a los 100 días (Figura 58).

En este escenario, el mecanismo de generación de iones cúpricos se debe a la disolución del óxido cúprico ( $\text{CuO}$ ), según la reacción (ver esquema de la Figura 59):

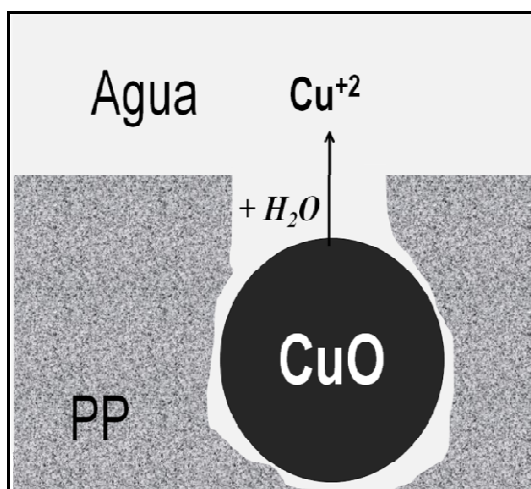


Figura 59. Proceso de disolución superficial de las nanopartículas de óxido de cobre ( $\text{CuO}$ ) y difusión de iones fuera del nanocompuesto.

El óxido cúprico (CuO) es el mayor estado de oxidación del cobre, por ello sólo su disolución permite la formación de iones. Esto se confirma con el difractograma de un nanocompósito con óxido cúprico, después de 100 días de inmersión en agua desionizada no se observa la aparición de nuevas reflexiones, sino un leve aumento de la intensidad.

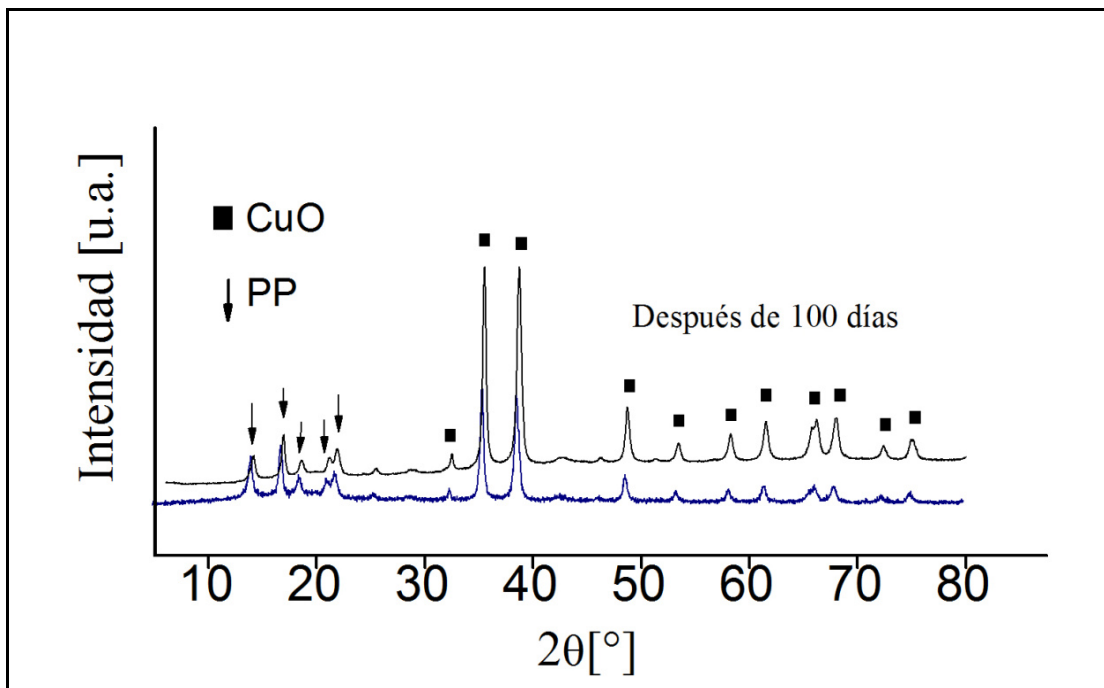


Figura 60. Difractograma del nanocompósito polimérico con 5% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre antes y después de su inmersión en agua desionizada durante 100 días.

En general, una poliolefina con nanopartículas en base a cobre embebidas, conforma un nanocompósito con actividad antimicrobial. En particular, Polipropileno con nanopartículas de cobre metálico u oxidado embebidas, tiene actividad antimicrobial, y esta depende de varios factores: la concentración del agente antimicrobial (Cu o CuO); el estado de oxidación del agente antimicrobial; la liberación controlada del agente activo ( $\text{Cu}^{+2}$ ); el tipo de bacteria y tiempo de contacto con el nanocompósito y las condiciones ambientales de temperatura, pH y humedad.

## 5.2.- EFECTO DEL TAMAÑO DE RELLENO Y EL TIPO DE MATRIZ POLIMÉRICA

Embeber cobre en una matriz polimérica termoplástica es considerada como una novedosa ruta para la producción de materiales antimicrobianos. Varios estudios evidencian que el comportamiento antimicrobial de estos compósitos está relacionado con su capacidad de liberar iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ). Con el fin de comprender la eficacia antimicrobial de estos materiales polímero/cobre, dos importantes variables fueron estudiadas: el tamaño del relleno y el tipo de matriz polimérica. En particular, matrices poliméricas hidrófilas e hidrófobas con variados grados de cristalinidad fueron testeadas:

Polipropileno, Polipropileno injertado con anhídrido maleico, Copolímero de Polipropileno -1-octadeceno, Polietileno y Poliamida.

### 5.2.1.- Efecto del tamaño del relleno

En esta sección se estudiarán partículas de cobre metálico de tamaño nanométrico y micrométrico embebidas en una matriz de Polipropileno y se relacionará su tamaño con la actividad antimicrobial.

#### 5.2.1.1.-Caracterización de las partículas

El tamaño de las micropartículas fue estimado por Microscopía Óptica (MO): se tomaron 10 fotografías digitales con un aumento de 5x que se analizaron con el programa JImage el cual permitió obtener el tamaño de las partículas y/o aglomeración. Tras el análisis se logró estimar un tamaño promedio de  $45,02 \mu\text{m}$  y con desviación estándar de  $\pm 1,32 \mu\text{m}$ . La Figura 61 corresponde a una de las micrografías conseguidas, que muestran una forma esférica.

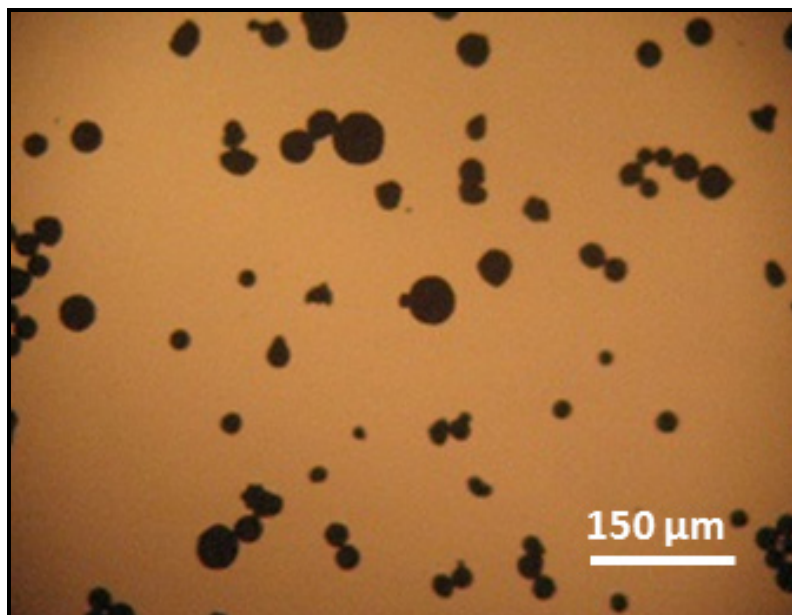


Figura 61. Imagen de Microscopía Óptica (MO) de micropartículas de cobre.

Se calculó un área superficial teórica  $S=14,9*10^{-11} \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  considerando un diámetro promedio de  $45 \mu\text{m}$ , una  $\rho=8,96 \text{ g cm}^{-3}$  e inexistencia de porosidad. Su patrón de difracción indica que las micropartículas son cobre metálico (estado de oxidación 0), que difractan en  $2\theta= 43,34; 50,42$  y  $74,12^\circ$ .

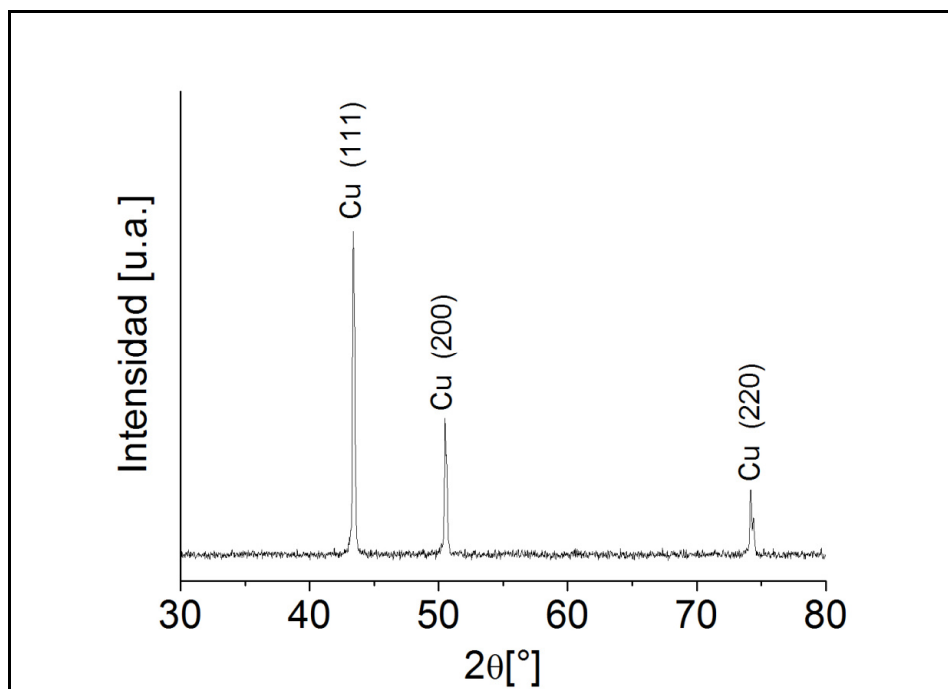


Figura 62. Difracción de rayos X de micropartículas de cobre.

Las nanopartículas de cobre corresponden a las caracterizadas en la sección 5.1.1. y, según su patrón de difracción, también corresponden a cobre metálico (estado de oxidación cero), y tienen un tamaño promedio de  $10 \pm 2$  nm.

#### ***5.2.1.2.-Estudio de la liberación de iones desde las partículas***

Se cuantificó la liberación de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) desde 0,05 g de nano/micro partículas de cobre metálico, inmersas en agua desionizada durante 70 días a temperatura ambiente, según se ilustra en las Figura 63 y Figura 64.



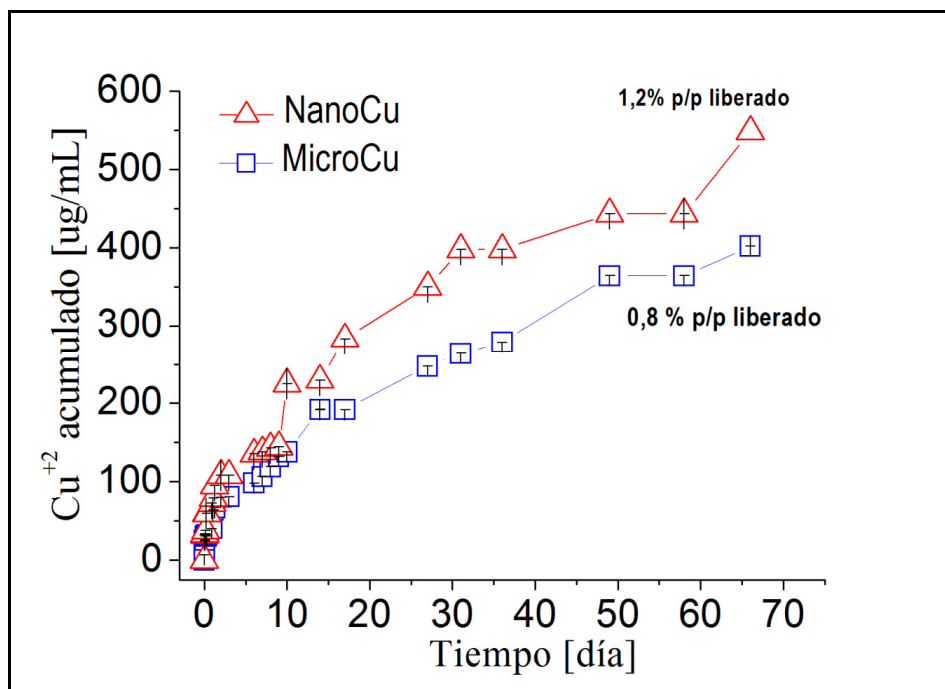


Figura 63. Liberación de  $\text{Cu}^{+2}$  desde nano/micro partículas de cobre puro sumergidas en agua desionizada durante 70 días.

En la gráfica se ilustra el porcentaje de transformación de cobre a iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) en el día 70. Las nanopartículas transforman un 1,2% p/p, mientras que las micropartículas transforman el 0,8% p/p, bajo las mismas condiciones. En otras palabras, las nanopartículas liberan ~ 30% más de iones que las micropartículas. Esto es consecuencia del área superficial de las nanopartículas, resultando más fácil y rápida interacción con el agua y el oxígeno [109].

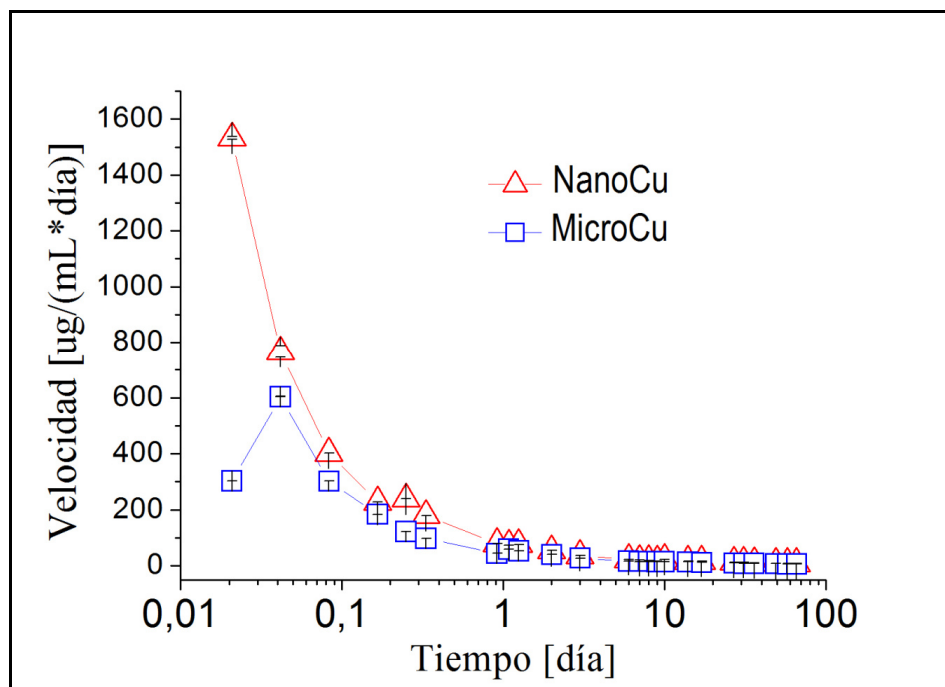


Figura 64. Velocidad de liberación de  $\text{Cu}^{+2}$  desde nano/micro partículas de cobre puro sumergidas en agua desionizada durante 70 días.

En la Figura 64 se deduce que los mecanismos de corrosión y difusión de las nano/micro partículas no son sincrónicos, durante las primeras horas la velocidad de liberación de las nanopartículas es superior. La velocidad de formación de  $\text{Cu}^{+2}$  incrementa rápidamente en las nanopartículas, observándose un máximo de  $1500 \text{ ug mL}^{-1} \text{ día}^{-1}$  a los 30 min, luego decrece con el aumento del tiempo de inmersión hasta un nivel constante. Mientras, las micropartículas consiguen su máxima velocidad de liberación en  $600 \text{ ug mL}^{-1} \text{ día}^{-1}$  después de 1 h, entonces también decrece la liberación, hasta que la velocidad se hace constante. En este caso, es claro el efecto de tamaño al comienzo del proceso de corrosión, la formación de iones es más rápida para las nanopartículas que para las micropartículas, mientras que a tiempos más largos no hay diferencia entre ambas partículas. Una tendencia similar fue reportada por Xia y colaboradores [109], donde la alta área superficial y la elevada energía superficial de las nanopartículas ocasionaron notorias diferencias frente a las micropartículas en la liberación de cobre al inicio.

Tabla 25. Comparación entre los tamaños y el área superficial teórica en masa ( $S_{\text{teórica}}$ ) de las partículas.

	Tamaño [nm]	$S_{\text{teórica}}$ [m <sup>2</sup> /g]
<b>Micropartículas</b>	45000	$14,9 \cdot 10^{-11}$
<b>Nanopartículas</b>	20	66,9
<b>Razón</b>	2250	$2 \cdot 10^{-12}$

De acuerdo a la Tabla 25 las nanopartículas son ~2000 veces más pequeñas que las micropartículas, pero tienen un área superficial mayor en  $10^{12} \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Estas evidentes diferencias dimensionales no se reflejan en el estudio de las liberaciones, evidenciando un moderado efecto de tamaño. Es importante advertir que las nanopartículas en un medio

acuoso, libre de tensioactivos, tienen naturalmente a agregarse para formar partículas de mayor tamaño, reduciendo así su elevada energía superficial. Esto, posiblemente, está afectando la eficiencia de la formación de iones.

### 5.2.1.3.-Caracterización de los procesos de corrosión

Se determinaron los productos de corrosión de las partículas después de 70 días inmersas en agua desionizada a temperatura ambiente. La diferencia en la coloración que se observa en la Figura 65 se explicaría por la exposición de las partículas a procesos corrosivos. El color inicial del cobre nano o micrométrico es típico de metal puro, color salmón y brillo metálico. Después de 70 días de exposición, las nanopartículas de cobre se tornan más oscuras y opacas, una combinación entre el rojo-violeta característico del  $\text{Cu}_2\text{O}$  (óxido cuproso) y el negro del  $\text{CuO}$  (óxido cúprico). El cambio de coloración es menos drástico en las micropartículas, que se tornan café.

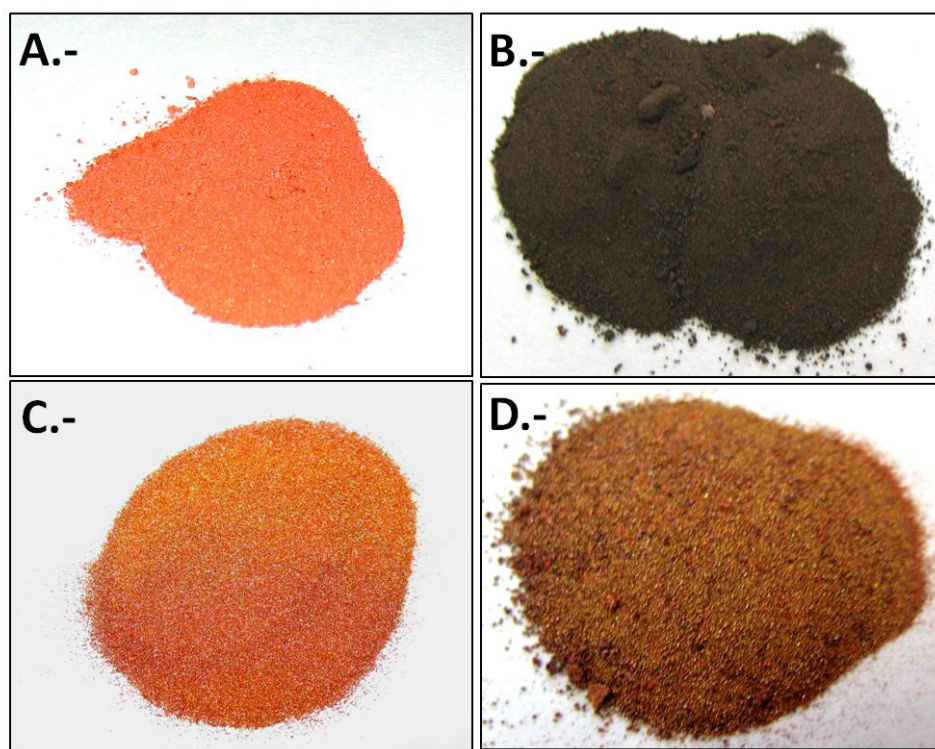


Figura 65. Aspecto de A) nanopartículas de cobre, B) nanopartículas de cobre después de 70 días de inmersión en agua desionizada, C) micropartículas de cobre y D) micropartículas de cobre después de 70 días de inmersión en agua desionizada.

Para corroborar las observaciones anteriores se realizaron los difractogramas de las partículas expuestas en agua. Como se exhibe en la Figura 66, las nanopartículas no producen nuevas fases en sus productos de corrosión, mientras que en la Figura 67 se observa la aparición de la fase  $\text{Cu}_2\text{O}$  para las micropartículas. El  $\text{Cu}_2\text{O}$  sería el responsable del cambio de coloración de las micropartículas.

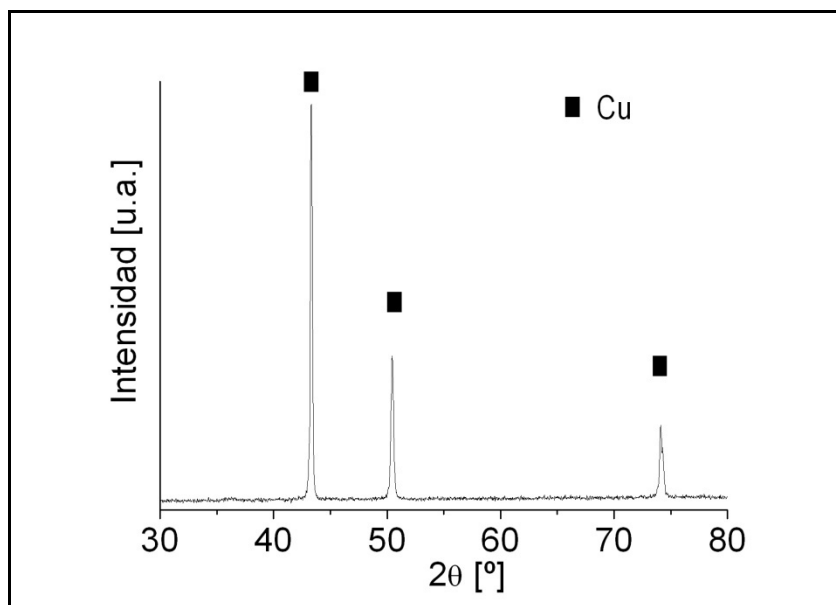


Figura 66. Patrón de difracción de nanopartículas de cobre, después de 70 días de inmersión en agua desionizada.

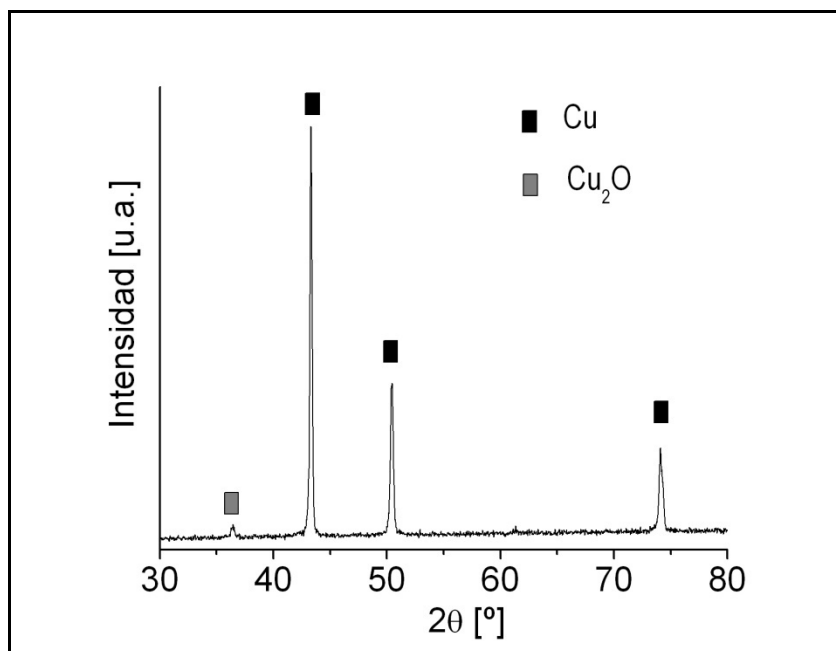


Figura 67. Patrón de difracción de micropartículas de cobre, después de 70 días de inmersión en agua desionizada.

La información entregada por el difractograma de las nanopartículas no concuerda con la coloración que adoptaron. Esto podría indicar que la cantidad de óxidos de cobre formados en su superficie es menor o igual al 3% p/p, que corresponde a la resolución del equipo de difracción de rayos X. En los mecanismos tradicionales de corrosión, el óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) se produce en la superficie del cobre, como una película delgada, pasivando la formación de  $\text{Cu}^{+2}$ . Se ha demostrado que debido a la alta reactividad

superficial de las nanopartículas, el  $\text{Cu}_2\text{O}$  puede ser convertido fácilmente a  $\text{Cu}^{+2}$  [109], por ello no se observan cantidades apreciables de esta fase como producto de su corrosión.

El agua desionizada es un medio donde sólo los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^-$  están presentes, otros iones son contaminantes que pueden encontrarse en trazas. En este medio acuoso las partículas pueden seguir las reacciones de corrosión expuestas en la Sección 2.2.3.2. Lo anterior es consistente con las variaciones de pH registradas (Tabla 26).

Tabla 26. Valores de pH de las soluciones de corrosión de las nanopartículas (NPsCu) y micropartículas (MPsCu) después de 70 días en agua desionizada.

	Agua desionizada	Solución corrosión NPsCu	Solución corrosión MPsCu
<b>pH</b>	5,51	6,28	6,10

El aumento del pH significa que existen más iones  $\text{OH}^-$  libres en solución, por lo tanto, en ambos casos existe una tendencia hacia las **Reacciones 8 y 9**, que corresponden a la generación de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ). De acuerdo a la Tabla, el pH es más básico para las nanopartículas, concordando con la mayor liberación de iones cúpricos registrada en contraste con las micropartículas.

En conclusión, los mecanismos de corrosión pueden ser levemente diferentes entre sistemas macro/micro y nano de cobre: 1) la formación de  $\text{Cu}^{+2}$  en cortos períodos de tiempo es más rápida en nanopartículas y 2) las nanopartículas no forman una película de productos de corrosión, mientras que las micropartículas forman  $\text{Cu}_2\text{O}$  después de 70 días.

#### 5.2.1.4.- Estudio de la liberación de iones cúpricos desde los compósitos

En esta sección se estudiará la liberación de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) desde Polipropileno (PP) en función del tamaño de la partícula de cobre y el contenido.

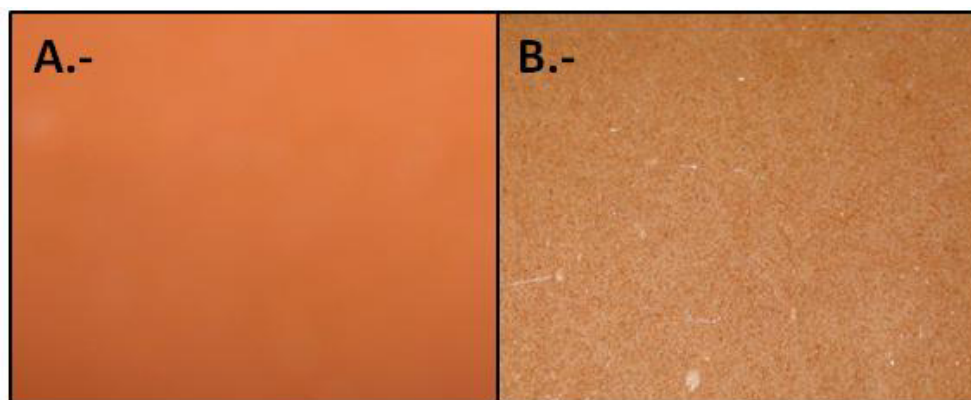


Figura 68. Compuestos con A) 5% en volumen de nanopartículas de cobre y B) 5% en volumen de micropartículas de cobre.

En la Figura 68 se exhiben diferencias en el aspecto de los compuestos con igual contenido de nano y micro partículas. El nanocompósito adquiere una coloración

homogénea, el color salmón del cobre metálico. En el microcompósito iteran aglomerados de cobre y espacios de PP puro. Los aglomerados tienen un tamaño micrométrico y brillo metálico.

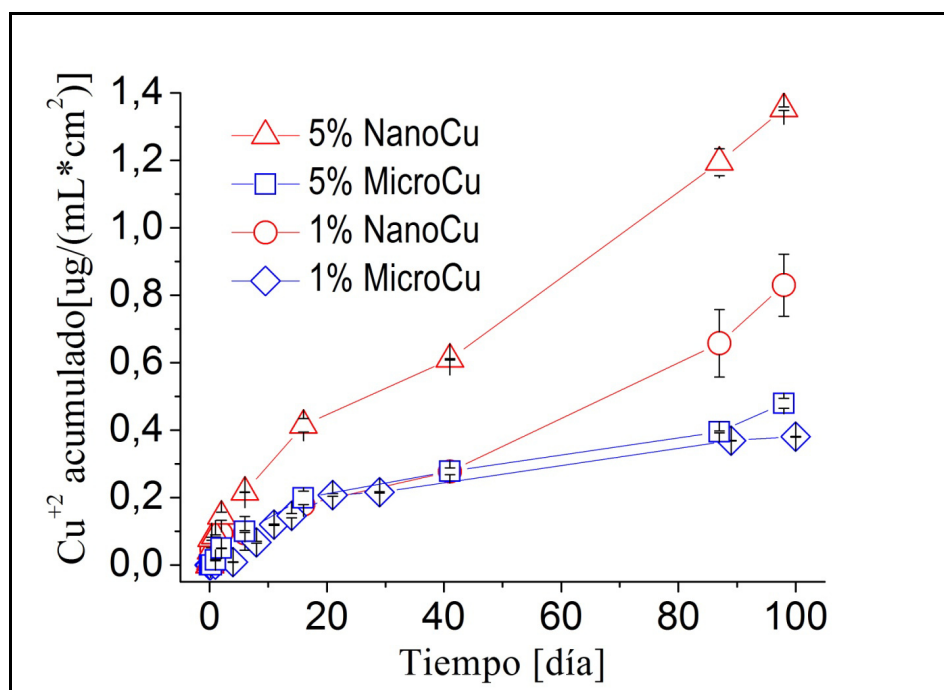


Figura 69. Liberación de  $\text{Cu}^{+2}$  desde nano/micro compósitos con 1% y 5% en volumen de partículas, sumergidos en agua desionizada durante 100 días.

Todos los compósitos poliméricos fueron testeados en agua desionizada, a temperatura ambiente por 100 días. En la Figura 69 se grafica la concentración de  $\text{Cu}^{+2}$  en función del tiempo de inmersión. Todos los compósitos investigados presentan liberación proporcional al tiempo de inmersión e incrementa con el contenido de cobre.

El rendimiento de la liberación depende del tamaño del relleno; una mayor liberación fue observada en nanocompósitos que en microcompósitos, siguiendo la tendencia observada en las partículas puras. Damm y colaboradores [19] demostraron similares resultados entre nanopartículas de plata embebidas en una Poliamida y nanopartículas puras.

A medida que transcurre el tiempo, las diferencias incrementan entre nanocompósitos y microcompósitos. Esto difiere de lo observado con las partículas puras, donde la diferencia permanece casi invariable con el transcurso del tiempo. En el día 100 los nanocompósitos con 1% en volumen de cobre liberaron  $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}\text{cm}^{-2}$ , mientras los microcompósitos con igual contenido liberaron la mitad,  $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}\text{cm}^{-2}$ . Similar comportamiento se observó en los nanocompósitos y microcompósitos con 5% en volumen de cobre, ellos liberaron  $1,4$  y  $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}\text{cm}^{-2}$  al día 100, respectivamente.

Para las nanocompósitos un incremento en el contenido de cobre resultó en un incremento en la liberación. Para los microcompósitos un incremento en el contenido no

significó un aumento en la liberación, el material con 5% en volumen de micropartículas evidenció una menor liberación que el material con 1% en volumen de nanopartículas. Los fenómenos referidos concuerdan con el aspecto que presentaban los materiales: los grandes aglomerados evidentes en el microcompósito disminuyen el área efectiva expuesta para la liberación iones.

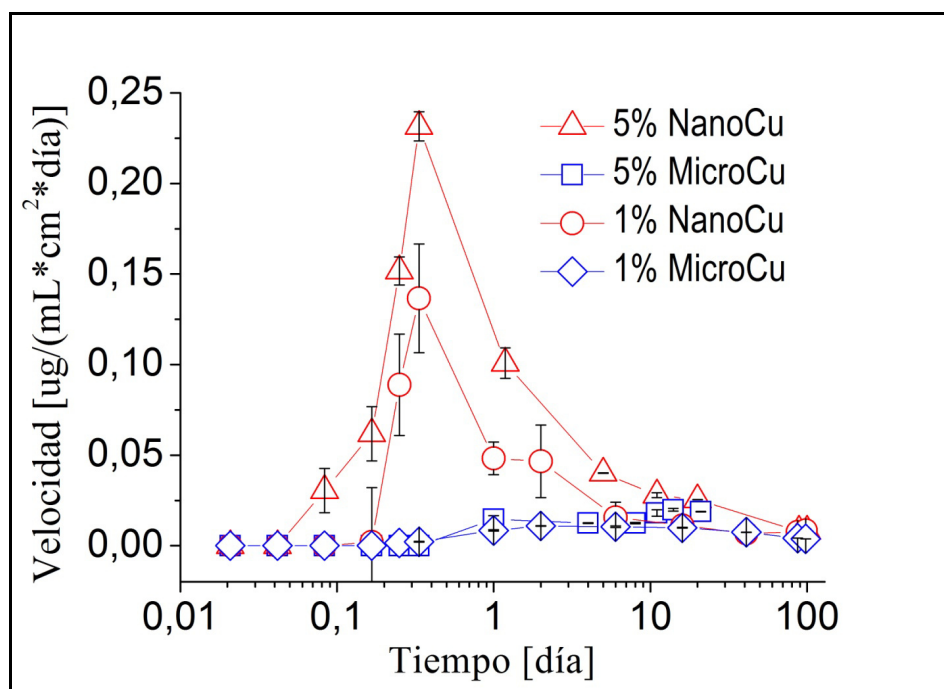


Figura 70. Velocidad de liberación de  $\text{Cu}^{+2}$  desde nano/micro compósitos con 1% y 5% en volumen de partículas, sumergidos en agua desionizada durante 100 días.

La cinética (Figura 70) sigue el mismo comportamiento que las partículas solas, los nanocompósitos presentan máximos acentuados en períodos cortos de inmersión, mientras que la cinética de los microcompósitos incrementa lentamente con el tiempo hasta nivelarse. La velocidad máxima de las nanopartículas se observó a los 30 min, mientras que de los nanocompósitos la registraron a las 8 h. Este desplazamiento indica un retardo en los procesos corrosivos de las nanopartículas embebidas, dando cuenta de cierta dificultad del ingreso del agua y el oxígeno.

A partir de los resultados se puede señalar que: 1) los nanocompósitos son más efectivos liberando iones que los microcompósitos; 2) la velocidad de liberación de los nanocompósitos muestra un máximo en cortos períodos de inmersión, no observado en los microcompósitos; 3) la liberación incrementa con el tiempo y el contenido y 4) el fenómeno de liberación de iones desde los compósitos depende del tamaño del relleno.

### 5.2.1.5- Estudio de las propiedades antimicrobiales

Se determinó la actividad antimicrobial de los nanocompósitos y microcompósitos frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Existe un efecto

en el tamaño de la partícula de cobre sobre la efectividad antimicrobial según las Figura 71 y Figura 72.

Las muestras fueron inoculadas con una suspensión de *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*, con concentraciones iniciales de  $1 \pm 0,5 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> y la sobrevivencia fue testada después de 60 y 90 min La concentración bacteriana de ambos patógenos sobre la superficie de control (PP sin cobre) no se ve afectada en el tiempo, convirtiéndose en un potencial foco de infecciones. Polipropileno con nanopartículas de cobre exhibe una mayor actividad antimicrobial contra ambos patógenos que Polipropileno con micropartículas, mostrando la relevancia del tamaño de la partícula de cobre sobre la actividad antimicrobial de los compósitos. Este resultado confirma la relación entre la concentración de iones cúpricos liberados y la actividad antimicrobial.

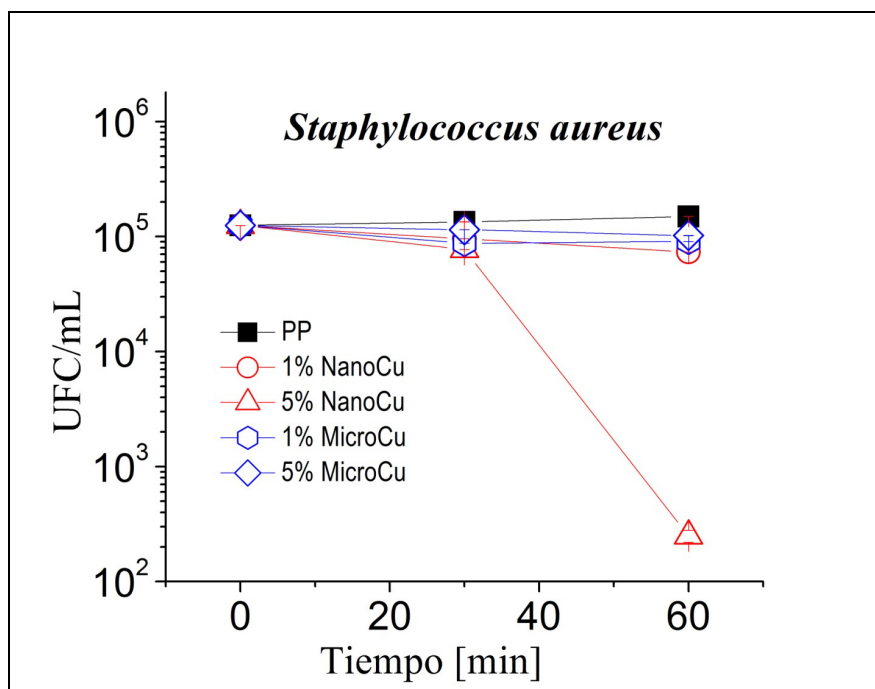


Figura 71. Concentración bacteriana de *Staphylococcus aureus* Resistente a la Metilina (SARM) en contacto con diferentes compósitos de Polipropileno con cobre.



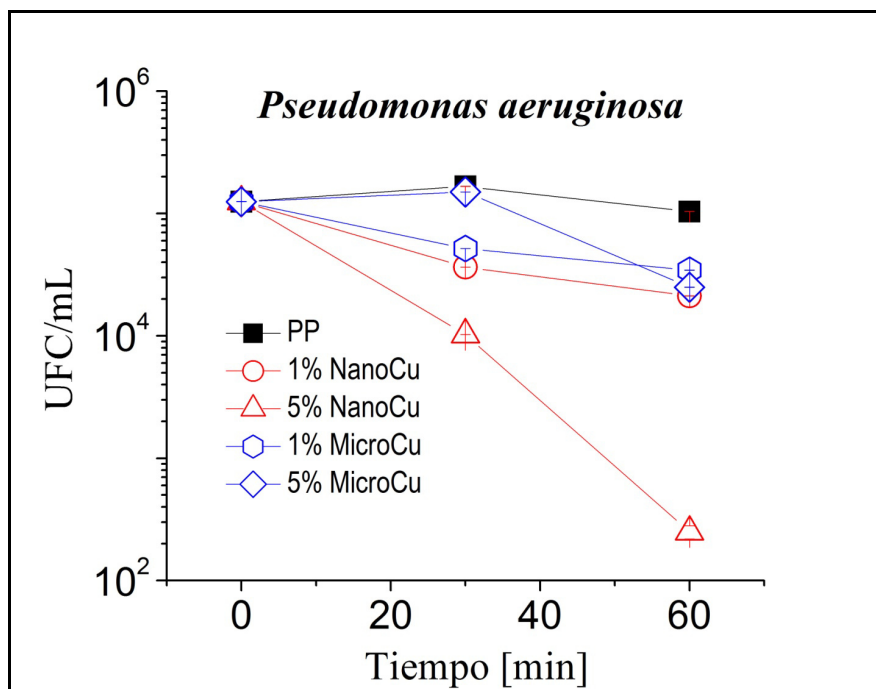


Figura 72. Concentración bacterial de *Pseudomonas aeruginosa* en contacto con diferentes compósitos de Polipropileno con cobre.

Polipropileno con 5% en volumen de nanopartículas de cobre fue capaz de reducir a la bacteria *Staphylococcus aureus* en un 99,8% después de 60 min, mientras que Polipropilenos con micropartículas no tuvieron una actividad antimicrobial significativa.

Para la *Pseudomonas aeruginosa* diferentes resultados fueron obtenidos. La bacteria exhibió mayor sensibilidad para los compósitos conteniendo cobre. Polipropileno con 5% en volumen de nanopartículas fue capaz de disminuir la concentración en un 99% luego de 60 min de contacto, mientras que la presencia de 5% en volumen de micropartículas produce un decrecimiento muy bajo de la concentración bacteriana. Varios estudios reportaron que eliminar una bacteria Gram negativa tiene una dificultad adicional por la necesidad de que el agente antimicrobial cruce la doble membrana y el espacio periplásmico característico de este tipo de bacterias [162,163]. El evidente buen comportamiento antimicrobial de los nanocompósitos puede relacionarse con su mayor liberación de iones de cobre y por ende se tiene una consecuencia importante: los microcompósitos exhiben menor eficacia antimicrobial que los nanocompósitos bajo las mismas condiciones.

Finalmente, el efecto del tamaño del relleno se puede sintetizar en la Tabla 27.

**Tabla 27. Tabla resumen del efecto del tamaño del relleno.**

NANOPARTÍCULAS DE COBRE	MICROPARTÍCULAS DE COBRE
Mayor área por unidad de volumen y masa favorecen la liberación de iones	Menor área superficial, menor liberación de iones
Mejor distribución en las matrices favorece la probabilidad de contacto entre los patógenos y el agente antimicrobial (Cu <sup>+2</sup> ).	Mala distribución en las matrices provoca menor probabilidad de contacto entre los patógenos y el agente antimicrobial (Cu <sup>+2</sup> ).
Mayor actividad antimicrobiana comprobada comparada con microcompósitos.	Menor efectividad antimicrobiana comparada con nanocompósitos.
No afecta la procesabilidad	No afecta la procesabilidad
Mayor efecto en la coloración de la matriz polimérica.	Menor efecto en la coloración de la matriz polimérica.

### 5.2.2.- Efecto del tipo de matriz polimérica

Existen diversos factores relacionados con la matriz polimérica que pueden afectar la actividad antimicrobiana de los nanocompósitos, consecuencia de la cinética de liberación de iones Cu<sup>+2</sup>. Por ejemplo, en sistemas de liberación de drogas, se utilizan matrices poliméricas específicas donde el fármaco se libera por difusión controlada, basada en la ley de Fick. Similarmente en los sistemas estudiados, los iones Cu<sup>+2</sup> tienen a difundir hacia la superficie del polímero rápidamente, en cortos períodos y luego la velocidad de liberación disminuye gradualmente.

La cinética de liberación de iones está gobernada por las propiedades físicas de la matriz, particularmente por el grado de cristalinidad y naturaleza hidrófoba o hidrófila [111], además de la cantidad de cobre incorporado. Si hay suficiente cobre para mantener una concentración interna mayor a la del medio externo, en secciones previas se demostró que la velocidad de difusión de iones se mantiene constante. En este estudio se consideraron matrices poliméricas hidrófilas e hidrófobas con variados grados de cristalinidad: Polipropileno isotáctico (PP), Polipropileno metalocénico isotáctico (PP-Met), Polipropileno injertado con anhídrido maleico (PP-g-AM), Copolímero de Polipropileno -1-octadeceno (PPC18), Polietileno de alta densidad (PEAD) y Poliamida 6 (PA6).

### 5.2.2.1.-Matrices poliméricas

Para el estudio se utilizó un Polipropileno comercial isotáctico (PP), código PH0320 de Petroquim S.A. Además, Polipropileno injertado con anhídrido maleico (PP-g-AM), este corresponde a un producto comercial conocido como Polybond 3200 y manufacturado por Chemtura.

Las matrices Polietileno de alta densidad (PEAD) y Poliamida 6 (PA6) también corresponden a polímeros comerciales, mientras que el Polipropileno metalocénico isotáctico (PP-Met) y el Copolímero de Polipropileno-1-octadeceno (PPC18) fueron sintetizadas.

#### A. Descripción de la matriz PP-g-AM

El Polipropileno injertado con anhídrido maleico ( $C_4H_2O_3$ ) o también llamado comercialmente como Polybond, es un compuesto químico el cual sirve como agente de acoplamiento o compatibilizante entre el Polipropileno y algunas cargas. La función del anhídrido es dar adherencia y polaridad. Su carácter polar se debe a los grupos funcionales carbonilos ( $-CO$ ) presentes en el anhídrido maleico. En el estudio se utilizó Polybond 3200 con 1% en peso de anhídrido maleico.

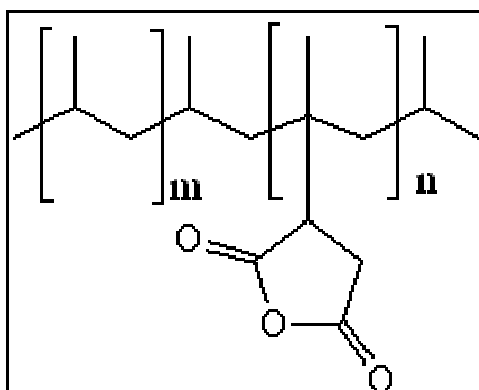


Figura 73. Estructura del Polipropileno injertado con anhídrido maleico.

#### B. Síntesis y descripción de las matrices PP-Met y PPC18

Estas matrices fueron sintetizadas utilizando un sistema catalítico metalocénico. Se empleó como catalizador metalocénico  $Me_2Si(2-Me-Ind)ZrCl_2$ , que permite la obtención de Polipropileno de tipo isotáctico y como co-catalizador MAO (metilaluminoxano).

Para la síntesis se adicionaron  $5 \times 10^{-6}$  mol de catalizador y  $5 \times 10^{-3}$  mol de co-catalizador, y las condiciones de operación fueron temperatura de reacción  $40^\circ C$ , tiempo de reacción 30 min y presión 3 bar. Para la síntesis del Copolímero PPC18<sup>13</sup> además se adicionó al inicio de la reacción 120 mL de Octadeceno ( $C_{18}H_{36}$ ). En la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. se presentan los resultados de las síntesis.

Polímero	Eficiencia	Actividad Catalítica
----------	------------	----------------------

<sup>13</sup> Macromolécula compuesta por dos o más unidades repetitivas distintas.

	[g]	[kg/mol*bar*h]
PP-Met	43,8	5803
PPC18	30,8	4089

El PP-Met conserva la misma estructura de un Polipropileno isotáctico (ver Figura 21), mientras que en la Figura 74 se observa la estructura del PPC18.

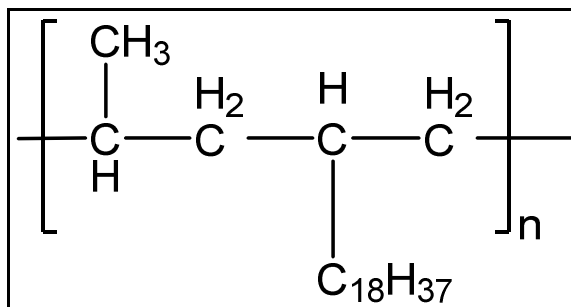


Figura 74. Estructura del Polipropileno-1-Octadeceno

Ambos polímeros están constituidos por carbonos e hidrógenos, por lo tanto conservan el carácter apolar e hidrofóbico. No obstante, los polímeros ramificados como el PPC18 tienen menor grado de cristalinidad que los Polipropilenos isotácticos, por la dificultad de formar estructuras ordenadas.

### 5.2.2.1.-Estudio de la cristalinidad

Se determinó la cristalinidad de todas las matrices mediante análisis DSC, según se resume en la Tabla 28.

Tabla 28. Valores obtenidos de las curvas de DSC de las diferentes matrices poliméricas estudiadas.

Matriz	$\Delta H_f^\circ$ [J/g]	$\Delta H_f$ [J/g]	$T_f$ [°C]	$\Delta H_c$ [J/g]	$T_c$ [°C]	$\chi_c$ [%]
PP (PH0320)	209 [3]	83	164	91,1	111	40
PP-Met		78	156	85,8	103	37
PP-g-AM		86	164	92,6	109	42
PPC18		64	$T_{f-max}=80$ $T_{f-min}=54$	22,6	10	16
PEAD	290[131]	195	133	196,1	112	67
PA6	240 [164]	55	$T_{f-max}=211$ $T_{f-min}=218$	63,9	184	23

El porcentaje de cristalinidad ( $\chi_c$ ) se calculó como la razón entre la entalpía de fusión del polímero ( $\Delta H_f$ ) y la entalpía correspondiente a la fusión de un polímero 100% cristalino ( $\Delta H_f^\circ$ ):

$$\chi_c = [\Delta H_f / \Delta H_f^\circ] \times 100$$

#### Ecuación 4

En términos generales se aprecia que el grado de cristalinidad PP comercial, el PP-Met y PP-g-AM no varían apreciablemente. Por otro lado, el PPC18 presenta un muy bajo

grado de cristalinidad (16%) al estar ramificado, sólo comparable al 23% de cristalinidad de la PA6. La mayor cristalinidad se observó en el PEAD, debido a que es un polímero muy lineal.

### 5.2.2.2.- Estudio de la liberación de iones cúpricos

A todas las matrices se les incorporó un 5% en volumen de nanopartículas de cobre metálico de aproximadamente 20 nm.

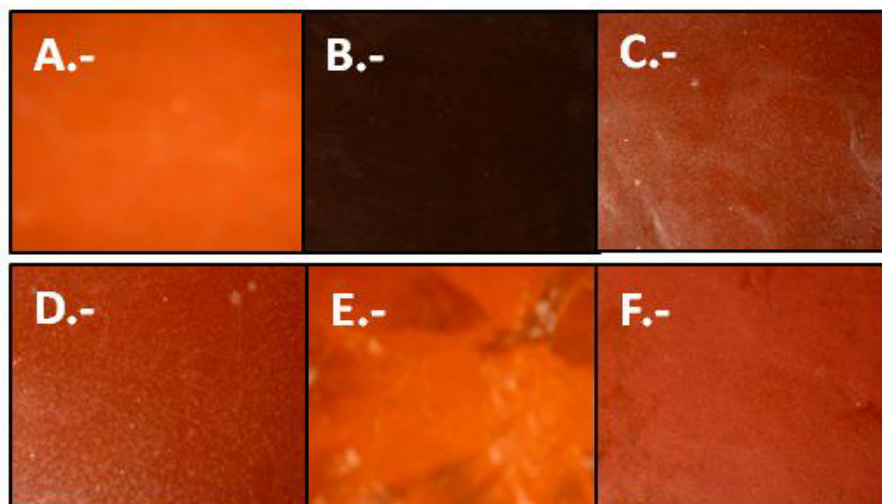


Figura 75. Compuestos con 5% en volumen de nanopartículas embebidas en: A) PP; B) PP-Met; C) PPC18; D) PP-g-AM; E) PEAD y F) PA6.

En la Figura 75 se exhiben los compuestos obtenidos, todas las matrices adquieren coloración. A pesar de que el relleno es el mismo, nanopartículas de cobre metálico de color salmón, las matrices exhiben distintos colores. Por ejemplo, PP y PEAD tienen un color salmón, PPC18, PP-g-AM y PA6 tienden a un salmón con tintes rojos, mientras que PP-Met resultó de una tonalidad café. Es importante destacar que la coloración es homogénea en todas las matrices. A continuación se resume el nivel hidrófilo y el grado de cristalinidad ( $X_c$ ) de todas las matrices :

Tabla 29. Principales características de las diferentes matrices utilizadas.

MATRIZ	NIVEL HIDRÓFILO	$X_c$ [%]
PP	↓	40
PP-Met	↓	37
PP-g-AM	↓↑	42
PPC18	↓	16
PEAD	↓	67
PA6	↑	23

Se presume que la fase amorfa de los polímeros es relevante para explicar la difusión del agua y oxígeno en su seno y la posterior difusión a la superficie del ión cúprico. Por ello, matrices menos cristalinas podrían liberar más iones. Además, matrices

con naturaleza polar o hidrófila absorben más agua incrementando también la liberación de iones.

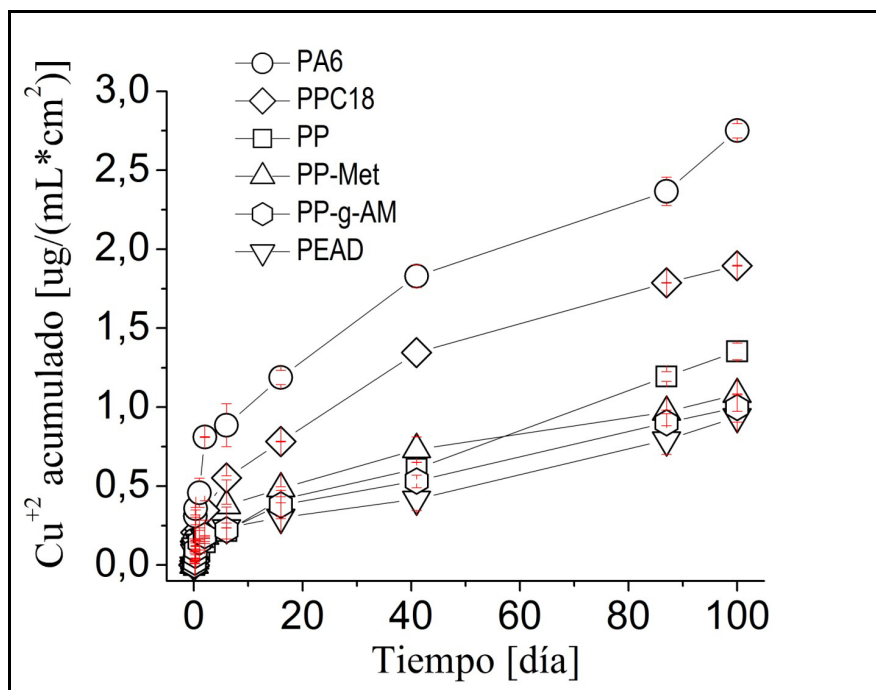


Figura 76. Liberación de Cu<sup>+2</sup> desde las diferentes matrices con 5% en volumen de nanopartículas de cobre.

La Figura 76 muestra la relevancia de las características de la matriz en la liberación de iones. En particular, la liberación más alta es observada en la matriz más hidrófila o con mayor nivel de polaridad (PA6), mientras que los menores valores coincidieron con una matriz apolar y con alta cristalinidad (PEAD). La PA6 es una matriz con tendencia a absorber agua debido a sus grupos funcionales, incrementando el proceso de difusión y facilitando el transporte de masa.

Por otro lado, también el agua puede penetrar por los poros intrínsecos de las matrices con bajo grado de cristalinidad. Este efecto es claro si se compara PPC18 con PP, PP-Met y PP-g-AM. El Copolímero (PPC18) presenta una baja cristalinidad y una liberación de iones mayor en un 50% que el resto de los Polipropilenos (PP, PP-Met, PP-g-AM). Las matrices que presentan mayor eficiencia en la liberación son PA6 y PPC18, liberando el 0,27% y el 0,23% de su contenido de cobre, respectivamente. El resto de las matrices alcanzaron una liberación similar, de 0, 1%.

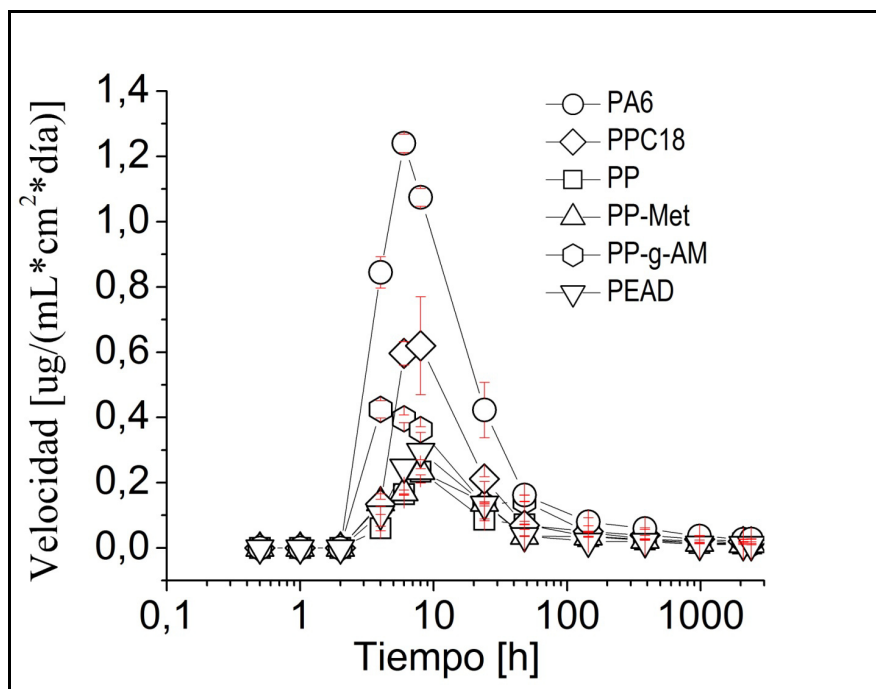


Figura 77. Velocidad de liberación de  $\text{Cu}^{+2}$  desde las diferentes matrices con 5% en volumen de nanopartículas de cobre.

Todas la matrices muestran una velocidad de liberación máxima durante el primer día de exposición en agua desionizada, incluso las matrices hidrófobas como Polietileno y Polipropileno. Como se señaló en el estudio del efecto del tamaño del relleno, esta característica es intrínseca al nano relleno de cobre. Sin embargo, la intensidad de los pico es una característica que se le puede conferir a la matriz polimérica. Con el paso del tiempo, la velocidad de liberación se mantiene constante.

La propiedad de absorber agua de acuerdo a las propiedades de la matriz les convierte en materiales de enorme interés para generar sistemas de liberación controlada y/o sostenida del agente antimicrobial que se encuentra embebido (unido físicamente) en la matriz. La continua liberación de estos sistemas, según se observó, es porque envuelven simultáneamente la **absorción de agua y desorción del agente activo**, siendo la capa de polímero la única estructura que limita la absorción/desorción. En este sentido, el proceso será controlado por la absorción de agua o, otras palabras, por la elección de la matriz polimérica. Por ejemplo, la PA6 absorbe 9,5 % en peso de agua como máximo [146], mientras que el PP absorbe hasta 0,7 % en peso [161].

Es importante notar que la liberación de iones tiene una relación con la actividad antimicrobial del material. En tales condiciones las matrices PA6 y PPC18 se pueden considerar como potenciales alternativas para elaboración de materiales antimicrobiales.

Basado en los resultados encontrados, es posible diseñar a la medida materiales antimicrobiales compuestos de una matriz polimérica y cobre, controlando la polaridad o cristalinidad de la matriz y el tamaño de la partícula de cobre.

## CAPÍTULO 6: ACTIVIDAD ANTIFOULING

La liberación de  $\text{Cu}^{+2}$  desde pinturas *antifouling* a base de compuestos de cobre es una validada estrategia para mantener la superficie de las redes acuícolas plásticas libres de la biopelícula marina. La liberación usualmente forma zona de inhibición cercana a la interface superficie /mar. Sin embargo, estos sistemas eventualmente se agotan y comienzan a ser inefectivos. En tales condiciones, se requiere volver a aplicar la pintura y el ciclo de pintado se reanuda indefinidamente, produciendo altos costos de mantención.

En los últimos años se ha recurrido a las instalaciones de redes de aleaciones Cu-Zn o latones ( $\geq 15\%$  de zinc) que si bien son efectivas previniendo el *fouling* sin necesidad de aplicarles pinturas, son muy pesadas, de difícil manipulación y muy costosas. Esto último ha hecho que las industrias acuícolas accedan a ellas mediante contratos de arrendamiento (*leasing*).

El estudio propone diseñar un material que contenga las virtudes de ambas tecnologías: redes plásticas y redes metálicas. Basado en la hipótesis que los iones  $\text{Cu}^{+2}$  son los responsables de la actividad *antifouling*, el principal objetivo es evaluar si polímeros con nanopartículas de cobre embebidas demuestran tener esta propiedad. Las ventajas observadas de estos materiales son que tienen muy bajo peso con respecto a una aleación de cobre, son de fácil manipulación, fácilmente procesables por las metodologías convencionales de procesamiento de plásticos y además, como se comprobó anteriormente, son capaces de controlar la liberación de iones  $\text{Cu}^{+2}$  haciendo innecesaria la aplicación de pinturas *antifouling*.

Para estudiar el comportamiento *antifouling*, los nanocompósitos fueron inmersos en el mar hasta por 2 meses a temperatura ambiente ( $22^\circ\text{C}$ ). También, se estudió el comportamiento de las muestras en ambientes controlados de temperatura y salinidad. Todos los estudios se realizaron en el **Institut de la Corrosion**, Brest, Francia. Se evaluaron los nanocompósitos con matriz de Polipropileno (PP) y con 1; 5; 10 y 20% en volumen de nanopartículas de cobre, además se testearon con 1 y 5% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre, todas las muestras fueron previamente caracterizadas en la sección 5.1.





Figura 78. Instalaciones del “Institut de la Corrosion” en las costas de Brest, Francia.

## 6.1.- ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE IONES

Los nanocompósitos fueron evaluados de acuerdo a su capacidad de liberar el agente *antifouling*, en este caso los iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ). Para ello se cuantificó la liberación de cobre desde placas sumergidas en piscinas con recirculación continua de agua de mar, con un Flujo de agua de  $22,5 \text{ L h}^{-1}$ , a temperatura ambiente de  $22^\circ\text{C}$ .

La concentración de Oxígeno Disuelto (OD) se estimó en  $8,13 \text{ mg L}^{-1}$ , muy cerca del valor de saturación de  $8,8 \text{ mg/L}$  a  $22^\circ\text{C}$ . El pH registrado fue 7,73 y la conductividad se midió en  $54800 \text{ uS/cm}$ . Basado en información bibliográfica, se compara la tasa de liberación de las muestras con la tasa mínima reportada para que el material tenga la actividad *antifouling*. Según Efird y colaboradores [83] de  $2,5 \text{ ug cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ .



Figura 79. Piscinas con recirculación de agua del mar de Brest, Francia.

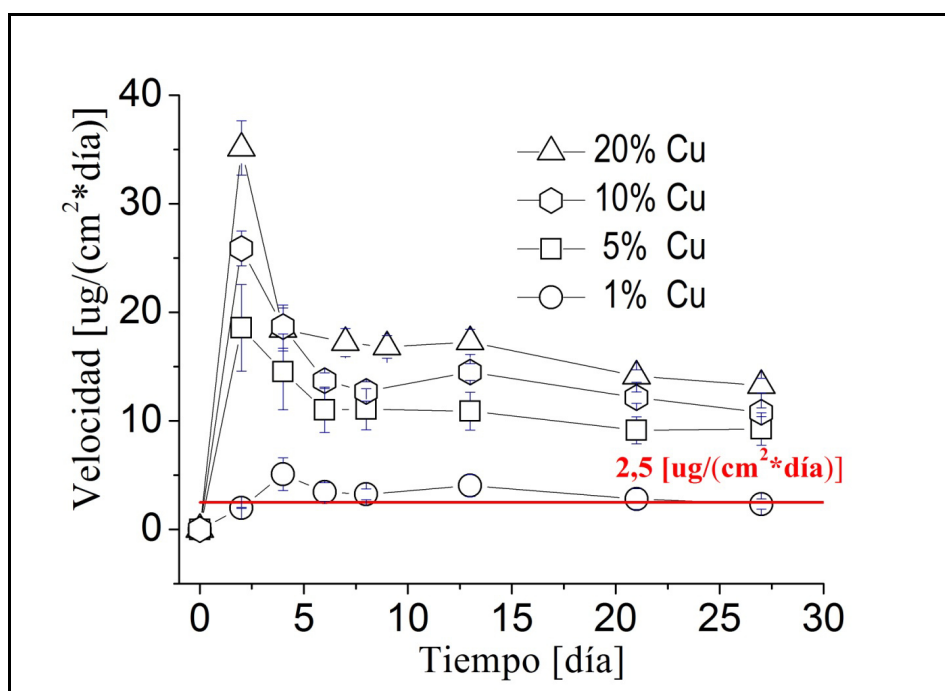


Figura 80. Variación en el tiempo de la tasa de liberación de iones cúpricos en agua de mar (22°C) por un mes desde PP con nanopartículas de cobre.

En la Figura 80 se muestran las velocidades de liberación de los nanocompuestos con nanopartícula de cobre durante un mes en agua de mar. Se exhibe un aumento en la tasa de liberación a medida que aumenta el porcentaje de cobre contenido en la matriz polimérica, observándose máximos en períodos de tiempo cortos que luego decrecen hasta alcanzar valores constantes. Estos resultados muestran que es posible controlar la tasa de liberación al utilizarse diferentes cargas de cobre.

Se aprecia una baja tasa de liberación de la muestra con 1% en volumen. Esta apenas iguala la tasa mínima de liberación que deben tener materiales con actividad *antifouling*. Su liberación de iones es doblada por la muestra con 5% en volumen de cobre en todo el rango de tiempo estudiado.

De acuerdo a estudios de corrosión del cobre, a pH entre 6-9 la cinética de corrosión es constante [94], lo cual es coherente con que los nanocompuestos consigan una velocidad constante de liberación de iones, después de un tiempo aproximado de 5 días. Las velocidades registradas luego de 5 días se resumen en la Tabla 30.

Tabla 30. Velocidades de los nanocompuestos con nanopartículas de cobre.

MUESTRA	VELOCIDAD $\mu\text{g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$
5% Cu	9
10% Cu	12
20% Cu	14

Se comprueba que la tasa de liberación no es lineal con respecto al contenido de cobre. Además, materiales con concentraciones sobre el 1% en volumen de nanopartículas tienen potencial actividad *antifouling* hasta al menos un mes.

Es complejo pronosticar el tiempo de duración de la liberación de iones desde cobre inmerso en matrices poliméricas. Como referencia, Cai y colaboradores [165] reportan que cerca de un tercio de la cantidad total de cobre es soluble a pH cercanos a 7 y está fracción incrementa con el decrecimiento del pH. En este caso, los nanocompuestos fueron expuestos a un pH ligeramente básico de 7,73.

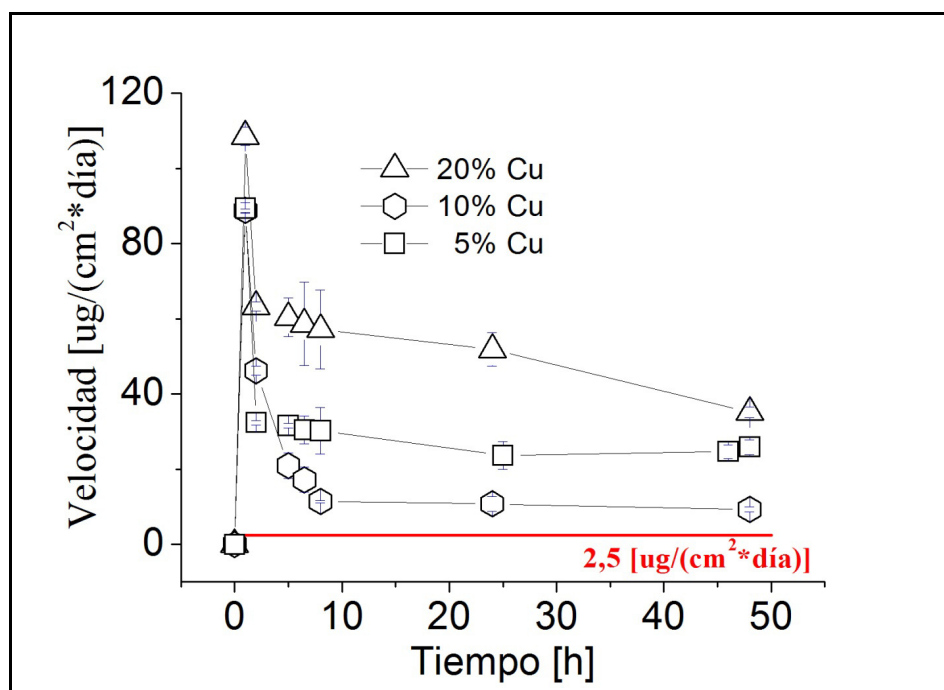


Figura 81. Variación en el tiempo de la tasa de liberación de iones cúpricos en agua de mar (22°C), a cortos tiempos.

En todos los casos se observa una tasa máxima de liberación durante el primer día (Figura 81). Este comportamiento ocurre ya que las nanopartículas generan mecanismos que facilitan la liberación de los iones a cortos plazos (ver Sección 5.1), aumentando la disponibilidad del agente activo *antifouling* en la superficie y mejorando su desempeño *antifouling*.

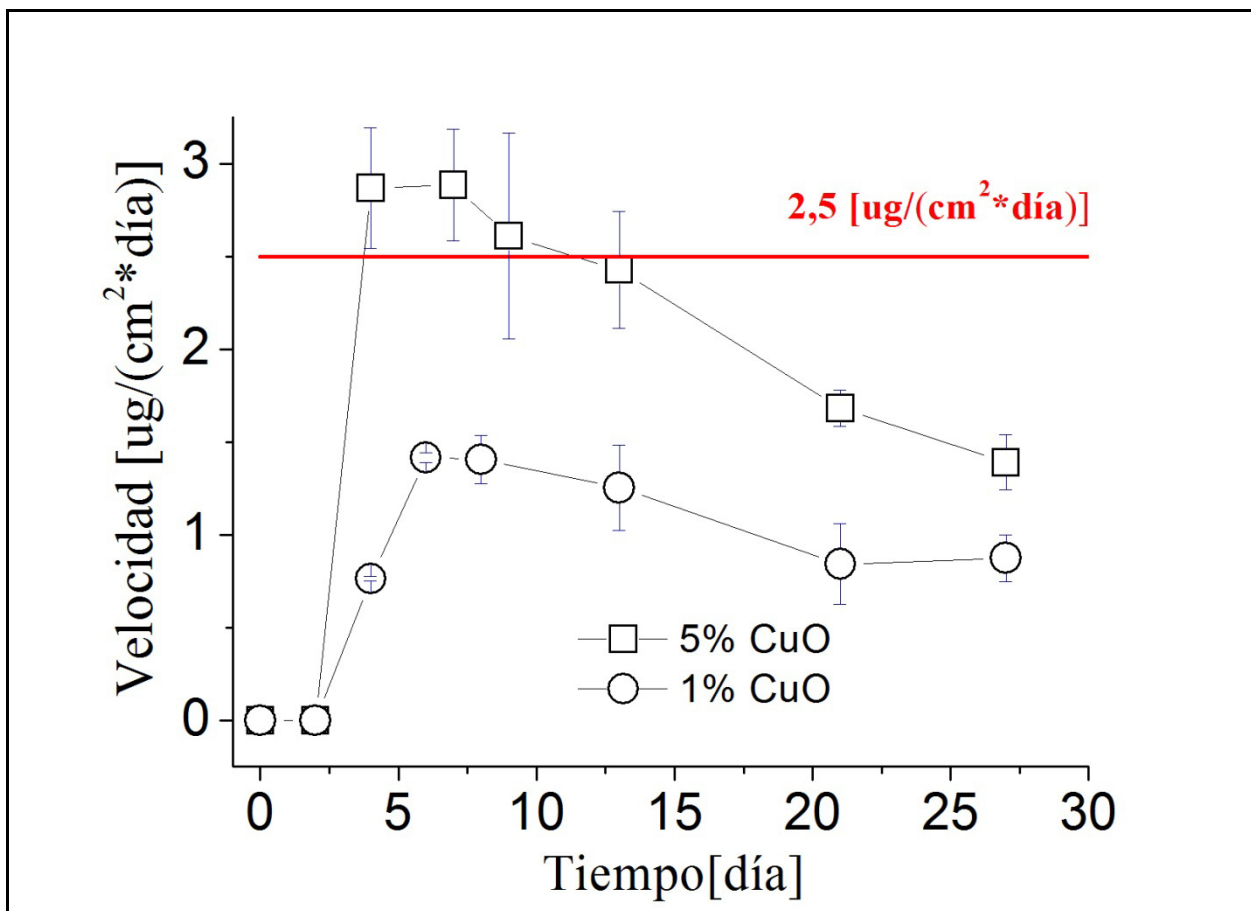


Figura 82. Variación en el tiempo de la tasa de liberación de iones cúpricos en agua de mar (22°C) por un mes desde PP con nanopartículas de óxido de cobre.

Como es evidente en la Figura 82, las velocidades de liberación desde PP con 1% y 5% de nanopartículas de óxido de cobre son inferiores a la mínima tasa reportada para exhibir actividad *antifouling*. El óxido cúprico CuO se señala como el más estable estado de oxidación del cobre, su disolución baja y necesita pH ácidos y temperaturas altas [87,92] que se contraponen a las condiciones marinas testeadas. Sin embargo, la alta reactividad superficial, debido a su tamaño nanométrico, permite la disolución de cierta fracción de ellas.

Existe un fenómeno habitual observado sobre las superficies de cobre expuestas a ambientes marinos, que no es trivial observar en estas experiencias, debido a los cortos tiempos de exposición. La liberación de iones cúpricos puede verse reducida por la formación de productos insolubles a partir de las especies disueltas en el agua de mar y su

adsorción a las superficies [85]. La que típicamente se forma es  $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$  ;calumetita  $\text{Cu}(\text{OH},\text{Cl})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; y malaquita  $\text{Cu}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_2$  ,según las siguientes reacciones químicas [54,109]:



Estos compuestos secundarios al precipitar sobre la superficie, bloquearían la disolución de  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

## 6.2.- ESTUDIO DE LA CORROSIÓN MARINA

Los nanocompósitos expuestos al ambiente marino durante dos meses corresponden a placas de  $12 \times 12 \text{ cm}^2$  y 1 mm de espesor.

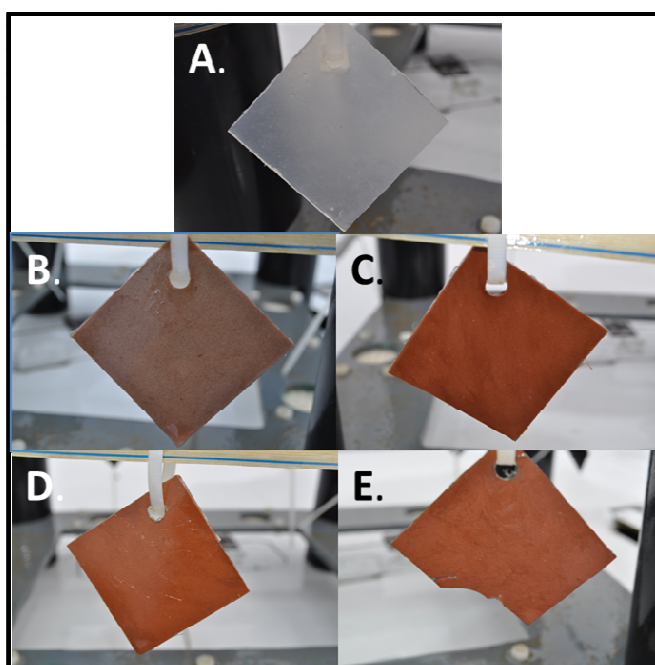


Figura 83. Imágenes de las muestras después de 2 meses inmersas en agua de mar. PP con: A) 0%;B) 1%; C) 5%; D) 10% y E) 20% en volumen de nanopartículas de cobre.

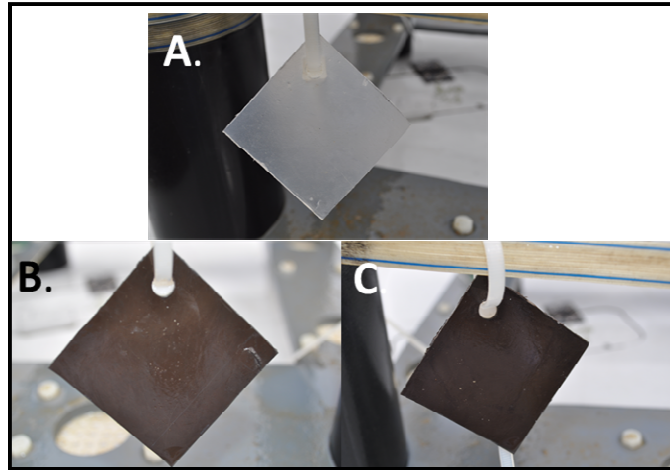


Figura 84. Imágenes de las muestras después de 2 meses inmersas en agua de mar. PP con A) 0%; B) 1%; C) 5% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre.

Según se observa en las Figura 83 y Figura 84, las placas no presentan deterioro físico aparente, ni cambios en la coloración. Sólo cierta opacidad, producto del depósito de compuestos clorados o sales presentes en el mar.

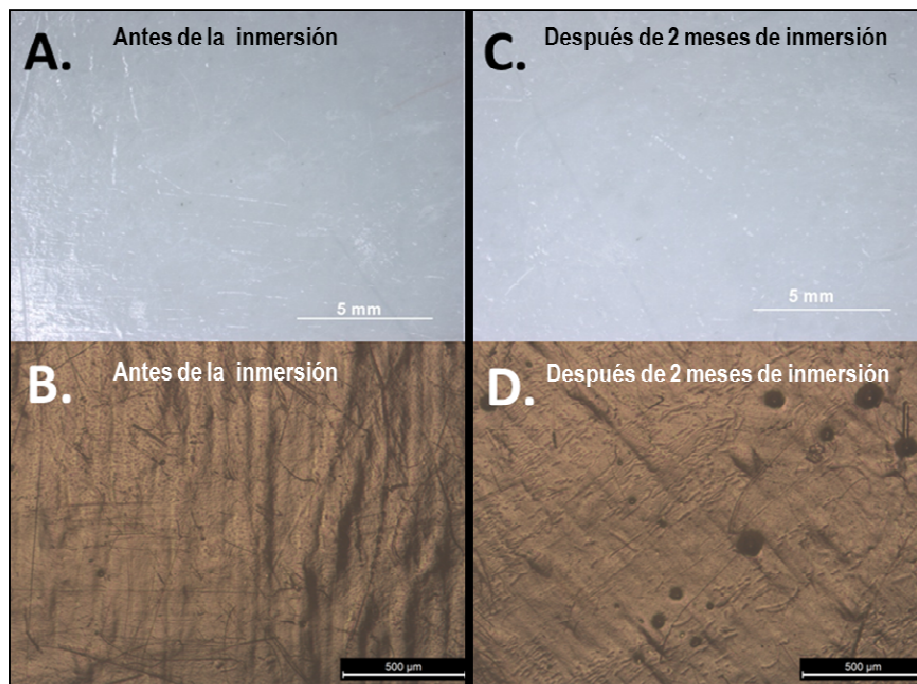


Figura 85. Micrografías de PP: A) y B) antes de la inmersión; C) y D) después de 2 meses de inmersión en el mar.

Tras la exposición de la matriz de PP sin nanopartículas (muestra control), se evidencia un grado de degradación luego de 2 meses inmersa en el mar. Aunque no hay importantes cambios en la rugosidad, sí se observa la aparición de agujeros con tamaños que van desde 10 a 150  $\mu\text{m}$ .

Los polímeros, a diferencia de los metales, no sufren corrosión por ataque electroquímico, pero pueden ser atacados por agentes químicos. En este caso, el PP es un polímero con buena resistencia química en medios ácidos y básicos [3,113,118], por ello no es normal que se vea afectado la aparición de agujeros. No obstante, un estudio reciente señala la existencia de microorganismos marinos con capacidad para digerir el plástico, estos se adhieren al plástico causándole orificios en la superficie del mismo [166].

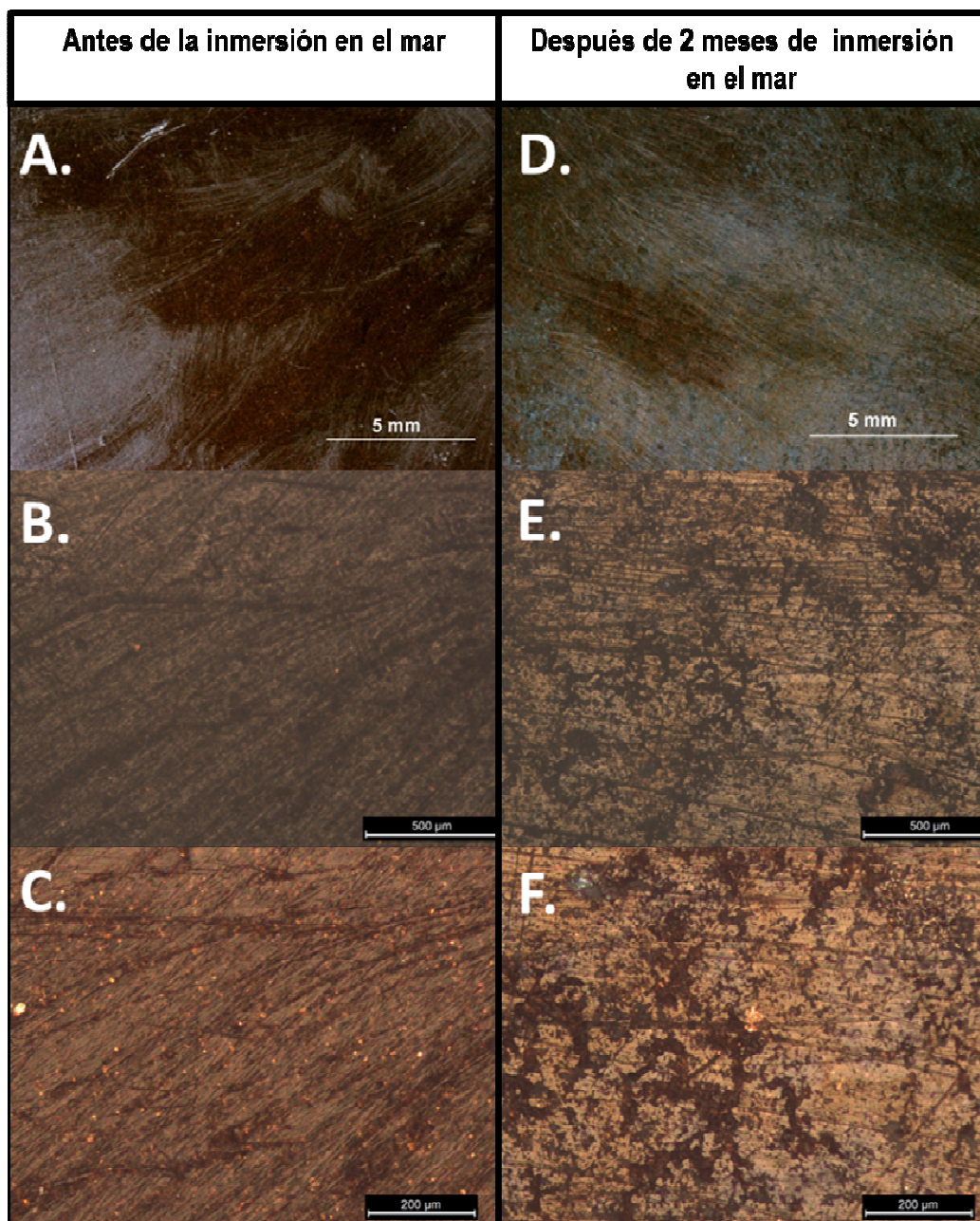


Figura 86. Micrografías de PP con 20% en volumen de nanopartículas de cobre: A),B) y C) antes de la inmersión; D), E) y F) después de dos meses de inmersión en el mar.

Se estudió los cambios de la morfología superficial del nanocompósito con mayor contenido de nanopartículas de cobre (20% en volumen) en diferentes resoluciones, según

se aprecia en la Figura 86. En la superficie de la muestra se exhibe una película delgada de color verdoso, atribuido a que parte de los iones cúpricos liberados interactúan con los iones libres del mar formando compuestos que se depositan. Por ejemplo, el hidroxocloruro de cobre ( $\text{Cu}_2\text{Cl} [\text{OH}]_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ) es un compuesto de color verde, que recubre las superficies de cobre expuestas a ambientes marinos [82].

En las imágenes con mayor resolución, se aprecia un aumento de la rugosidad superficial y la formación de surcos, a diferencia de los agujeros formados en PP puro. Este fenómeno puede atribuirse al ataque superficial de iones agresivos presentes en el mar, o a que los iones de cobre al difundir erosionan a la matriz, o a la combinación de ambos fenómenos.

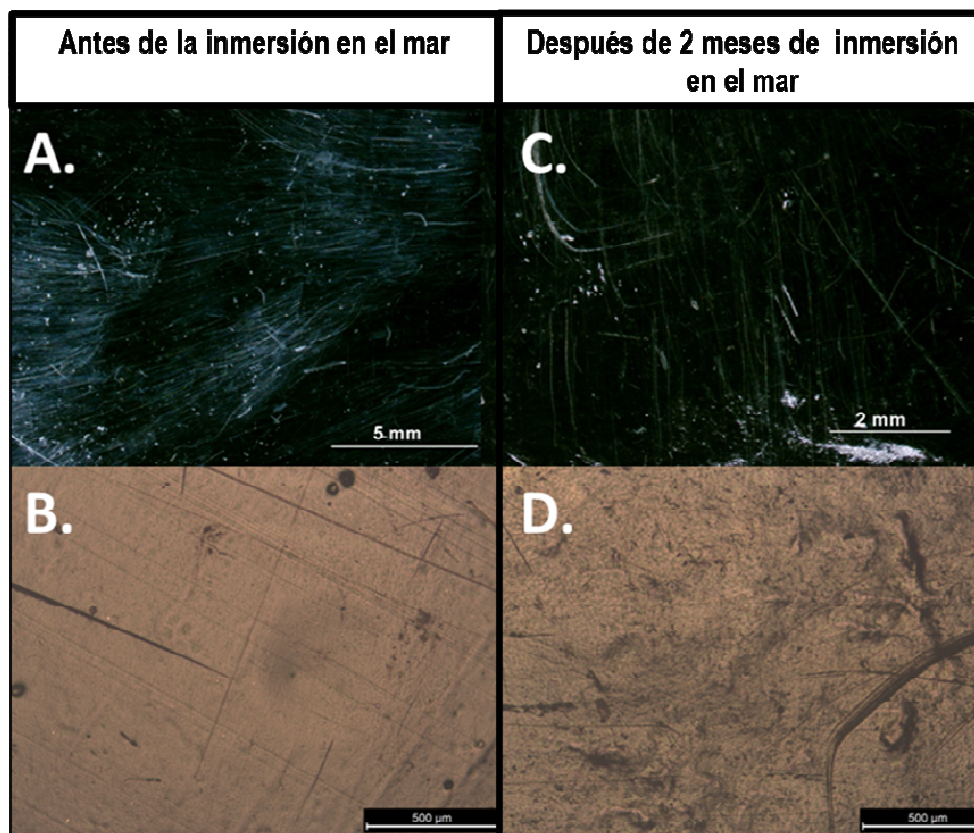


Figura 87. Micrografías de PP con 5% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre: A) y B) antes de la inmersión; C) y D) después de 2 meses de inmersión en agua de mar.

La muestra con nanopartículas de óxido de cobre casi no experimenta cambios superficiales, su rugosidad aumenta levemente. Se confirma, de esta manera, que el ataque de iones agresivos presentes en el mar afecta muy poco el deterioro superficial, pues estas muestras también tienen PP como matriz. Sí es posible inferir que la principal causa es la erosión por difusión de iones, debido a que estas muestras liberan muy poco, su deterioro es leve.



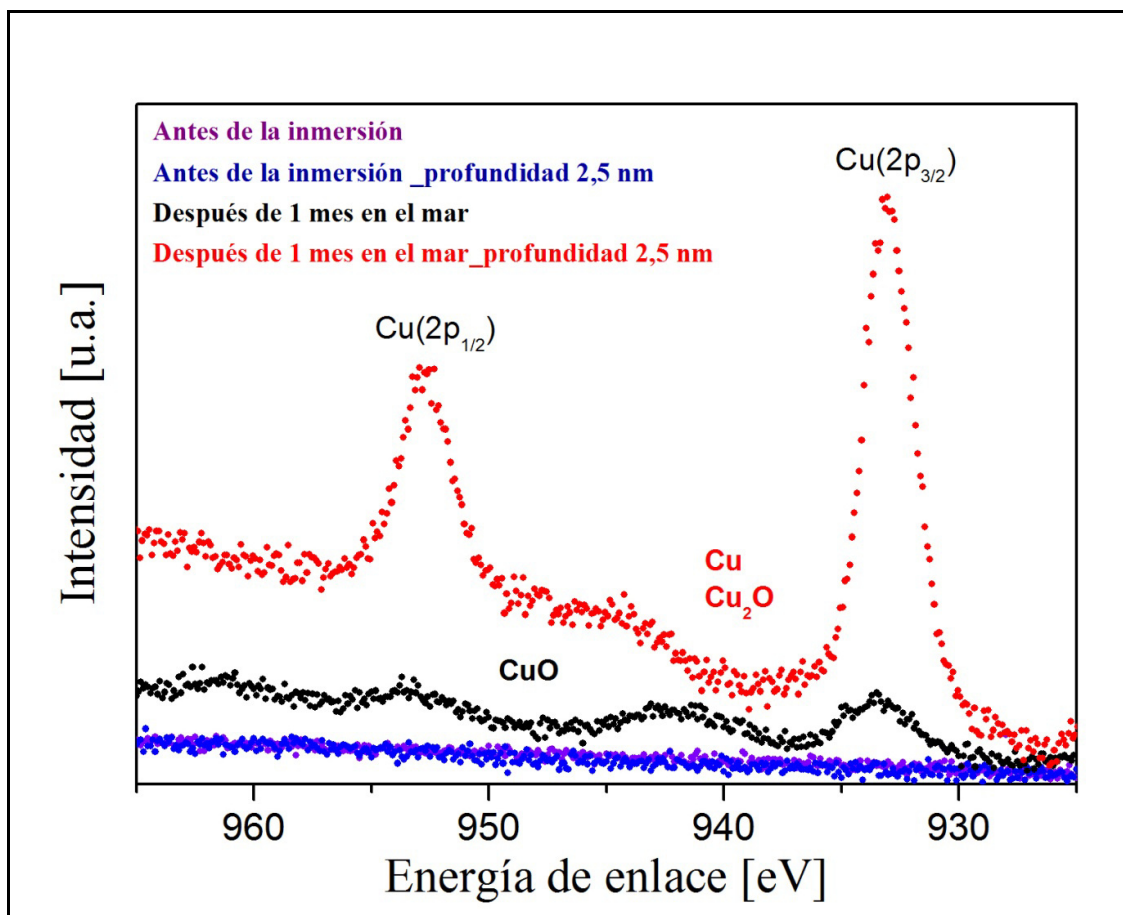


Figura 88. Espectro XPS de PP con 20% en volumen de nanopartículas de cobre antes y después de 1 mes inmerso en el mar.

Se identificaron los productos de corrosión de la muestra de PP con 20% en volumen de nanopartículas de cobre, después de 1 mes inmerso en el mar. Se utilizó una tecnología sensible a la superficie, Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS). Normalmente, la profundidad de penetración del XPS es de 3-5 nm, que corresponde al espesor de varios átomos.

El nivel Cu 2p fue empleado para investigar la oxidación superficial de las nanopartículas de cobre (Figura 88). No se detectan picos en el perfil de la muestra antes de su inmersión en el mar, indicando que inicialmente no hay cobre en la superficie del nanocompósito. El material fue sometido a sputtering, mediante el bombardeo con iones argón ( $Ar^+$ ) durante 5 min para la remoción homogénea de una capa de 2,5 nm. Nuevamente, no se detectó cobre a una profundidad 2,5 nm. De acuerdo a lo anterior, las nanopartículas de cobre se encontrarían embebidas en el seno del nanocompósito, a una profundidad de al menos 2,5 nm.

Luego de 1 mes de exposición en el ambiente marino, en el espectro de XPS se detectan picos anchos, que dan cuenta de la formación de óxido cúprico (CuO). Las señales asociadas a CuO son anchas y se encuentran alrededor de 963, 954, 943 y 934 eV. Al remover 2,5 nm se detecta la presencia de óxido cuproso ( $Cu_2O$ ) y Cu. Una señal ancha en

torno a 947 eV corresponde a Cu<sub>2</sub>O, mientras que picos muy bien definidos cercanos a 933 y 953 eV se relacionan con Cu. Según los mecanismos convencionales de corrosión del cobre, el CuO se forma desde óxido cuproso (Cu<sub>2</sub>O) tras la difusión de oxígeno, lo cual da cuenta del fenómeno observado. La capa de Cu<sub>2</sub>O actúa como barrera de la disolución de cobre, lo que explicaría el decrecimiento gradual de la velocidad de liberación de cobre. Según Braun y colaboradores [94], en ambientes acuosos con pH entre 6 y 9 se forma Cu<sub>2</sub>O y se alcanza una velocidad de corrosión constante.

El CuO es el estado de oxidación más estable del cobre. Cai y colaboradores [165] indicaron que cerca del 90% del óxido cúprico nanométrico expuesto a un medio acuoso a pH 6,5 y temperatura 37°C se transforma a Cu<sup>+2</sup>, como resultado de la elevada superficie específica. Las nanopartículas de CuO embebidas en PP demostraron escasa disolución al verse afectadas por las condiciones ambientales, pH básico de 7,73 y temperatura templada de 22°C.

En vista de lo anterior, se puede señalar que los nanocompuestos no contienen nanopartículas expuestas superficialmente. Estos al ser expuestos a ambientes marinos presentan deterioro superficial. En cuanto a su relleno, las nanopartículas de cobre metálico experimentan procesos de corrosión convencionales, mientras que las nanopartículas de óxido cúprico se disuelven.

### 6.3.- EFECTO DE LA TEMPERATURA

Determinar el efecto de la temperatura del agua en la liberación del agente *antifouling* es relevante, dado que la formación del *biofouling* depende de la geografía del lugar y las condiciones climáticas.

Los materiales fueron sumergidos en agua salina de mar con una concentración de cloruro de sodio (NaCl) de 3,5% (35 g/L) durante 8 días a pH 7,73. Las temperaturas testeadas fueron 10°C, 22°C y 30°C.

Teóricamente, la cinética del proceso de corrosión depende de la temperatura. A mayor temperatura, la velocidad es más rápida, de acuerdo a la ecuación de Arrhenius:

$$k(T)=A * e^{Ea/RT}$$

**Ecuación 5**

$k(T)$  : constante cinética (dependiente de la temperatura)

A: factor preexponencial o factor de frecuencia.

Ea: energía de activación, expresada en J/mol.

R: constante universal de los gases.

T: temperatura absoluta [K]

Al elevarse la temperatura en un sistema acuoso, paralelamente se produce la reducción de oxígeno disuelto (OD). Esto podría disminuir la reacción catódica del proceso de corrosión del cobre. Para evitar la deficiencia de oxígeno, se monitoreó su concentración y al registrarse valores bajo los 7 mg/L, se procedió a saturar el agua.

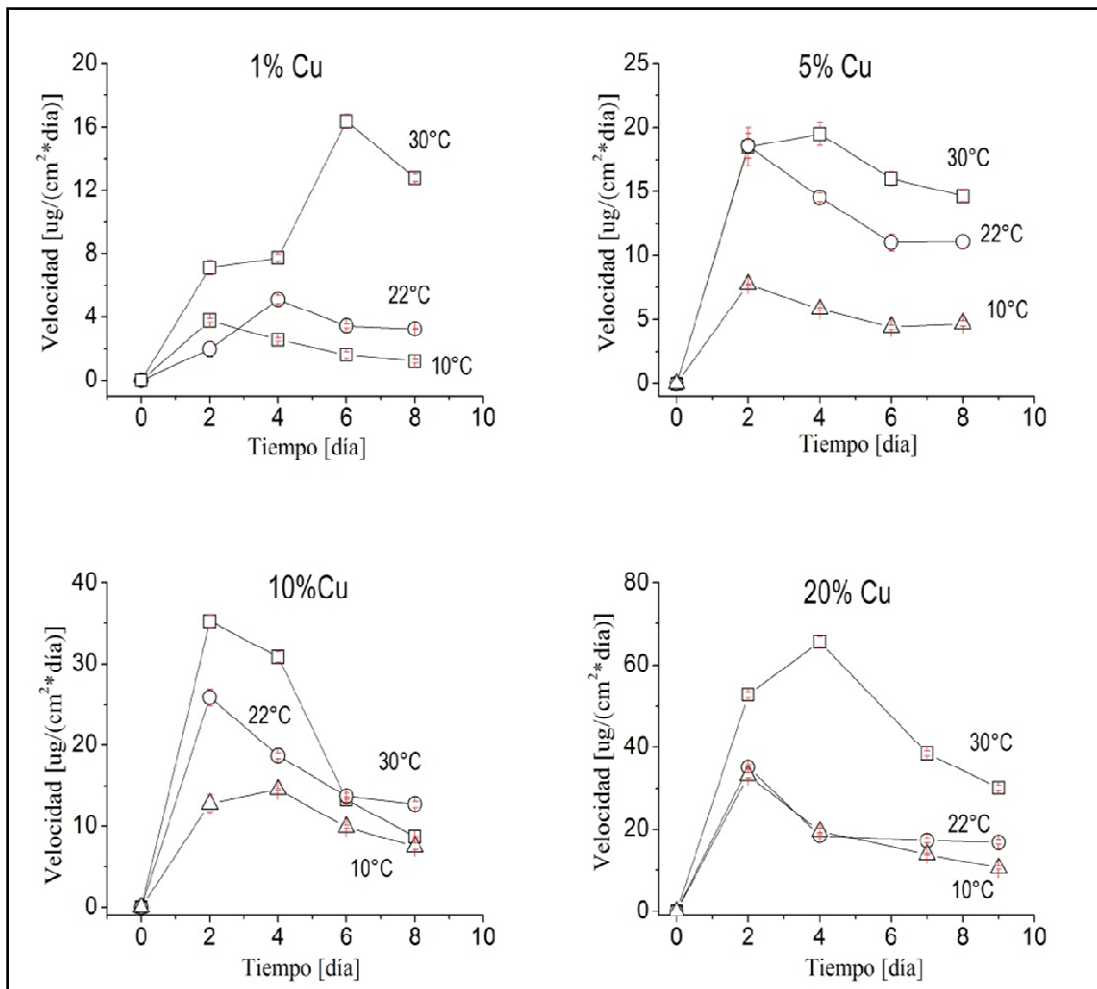


Figura 89. Variación en el tiempo de la concentración de iones cúpricos desde PP con nanopartículas de cobre a diferentes temperaturas: 10°C ( $\Delta$ ); 22°C ( $\circ$ ) y 30°C ( $\square$ ).

Para todos los nanocompuestos con nanopartículas de cobre metálico se observó una clara tendencia, a medida que incrementa la temperatura es mayor la cantidad de iones liberados (Figura 89). Esta liberación es proporcional a la cantidad de cobre embebido en la matriz de PP.

Las curvas de los 22°C y 10° C de la muestra con 20% en volumen son parecidas en todo el rango de tiempo. Probablemente, al ser mayor la cantidad de cobre, aumenta la probabilidad de aglomeración disminuyendo su área superficial disponible para la corrosión.

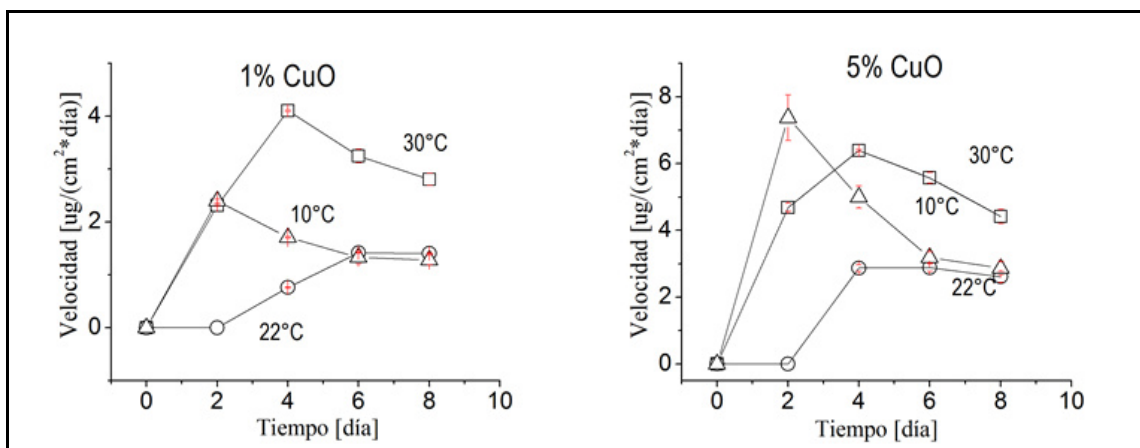


Figura 90. Variación en el tiempo de la concentración de iones cúpricos desde PP con nanopartículas de óxido de cobre a diferentes temperaturas: 10°C (Δ); 22°C (○) y 30°C (□).

Los nanocompuestos con óxido de cobre registran una tasa de liberación muy baja y no se observa una preferencia clara de temperaturas (Figura 90). Los valores se encuentran en el rango de errores experimentales.

#### 6.4.- EFECTO DE LA SALINIDAD

Debido a las diferentes condiciones geográficas, el mar contiene concentraciones de cloruro que pueden variar desde 5 a 35 g L<sup>-1</sup>. El ión cloruro (Cl<sup>-</sup>) se conoce por ser agresivo y acelerar los procesos corrosivos de superficies metálicas, por eso es importante reconocer su efecto sobre los materiales estudiados en este trabajo.

Los materiales fueron sumergidos en distintos medios acuosos (Tabla 31) durante 8 días, a una temperatura de 22°C.

Tabla 31. Propiedades de los medios acuosos a temperatura de 22°C.

TIPO	CONCENTRACIÓN		CONCENTRACIÓN		CONDUCTIVIDAD [uS cm <sup>-1</sup> ]
	NaCl [g L <sup>-1</sup> ]	pH	O <sub>2</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]		
Agua de mar	35 (3,5%)	7,7	7,3		54800
Agua desionizada	10 (1%)	6,6	8,2		18090
Agua desionizada	0	5,8	8,1		56,2

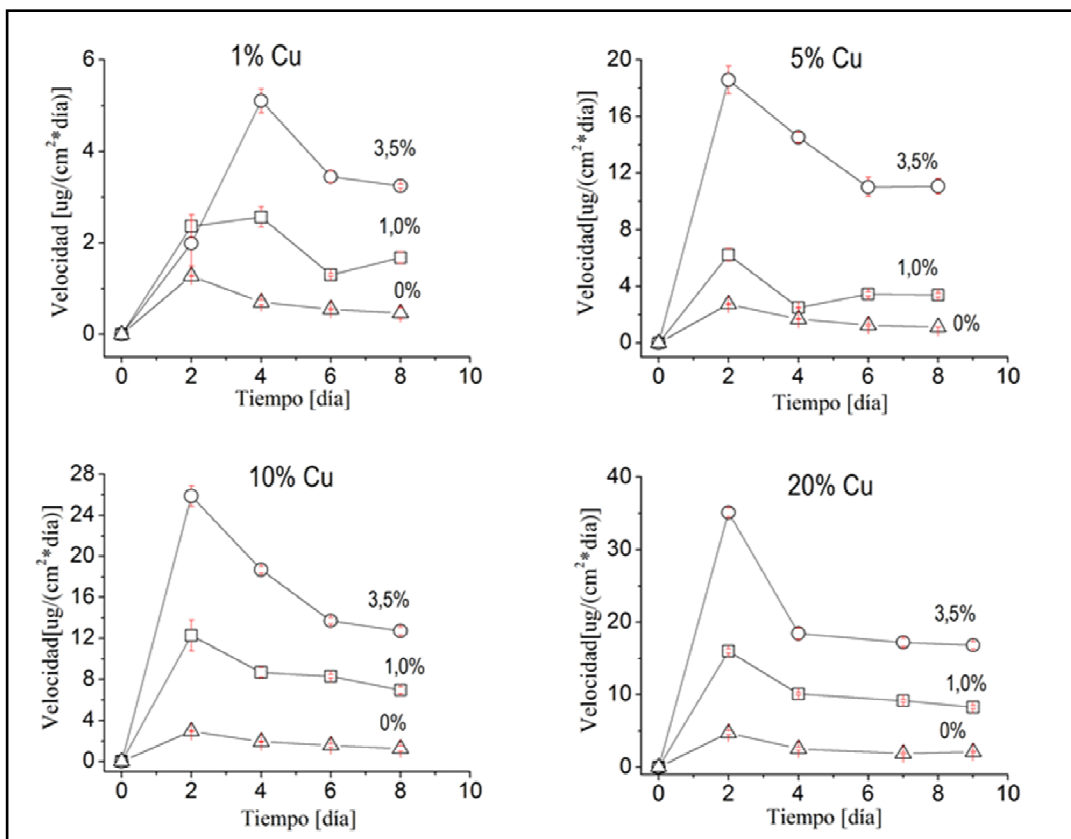
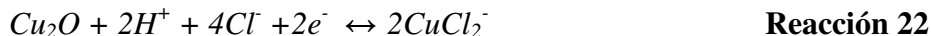


Figura 91. Variación en el tiempo de la concentración de iones cúpricos desde PP con nanopartículas de cobre metálico a diferentes concentraciones de iones cloruro (Cl<sup>-</sup>): 3,5%(○); 1%(□) y 0% (Δ) de NaCl

El incremento de iones Cl<sup>-</sup> aceleró la velocidad de liberación de cobre desde todos los nanocompósitos, tal como se aprecia en la Figura 91. Se corrobora que el cloruro daña las superficies metálicas, inclusive las embebidas en matrices poliméricas.

En estos medios salinos, se ha estudiado el mecanismo de disolución del óxido cuproso (Cu<sub>2</sub>O), producto de su reacción con los iones cloruro (Cl<sup>-</sup>) e hidrógeno (H<sup>+</sup>), formando complejos cloro-cobre [14,167] :



Estas ecuaciones dan cuenta de la dependencia de la velocidad de liberación con la salinidad y el pH, al incrementar la salinidad y disminuir el pH aumenta la liberación [94]. Según los medios acuosos estudiados, el efecto de la salinidad predomina por sobre la influencia del pH. Estas especies fueron reportadas a pH entre 6-8 por Beech y colaboradores [99].

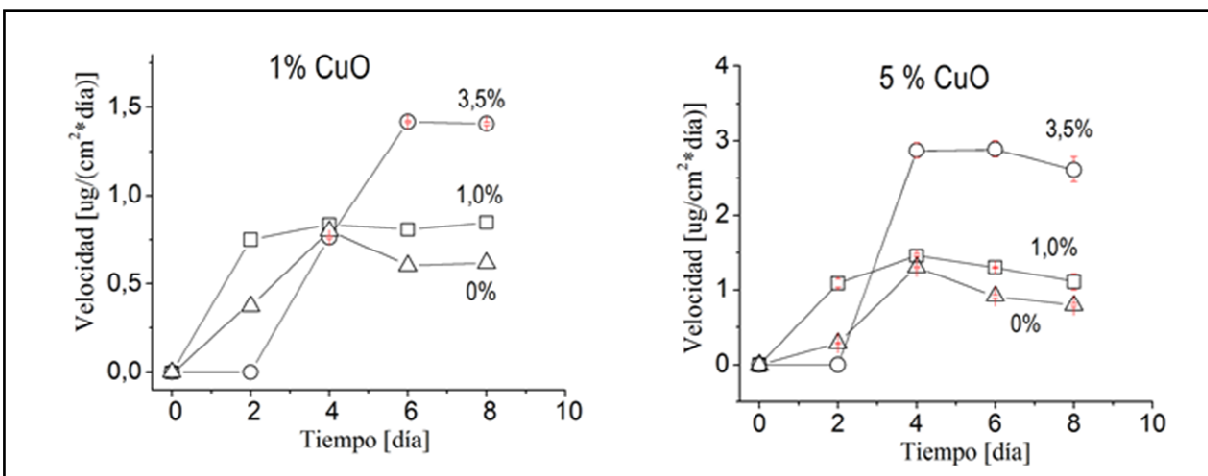


Figura 92. Variación en el tiempo de la concentración de iones cúpricos desde PP con nanopartículas de óxido de cobre a diferentes concentraciones de iones cloruro (Cl<sup>-</sup>): 3,5% (○); 1% (□) y 0% (Δ) de NaCl.

## 6.5.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD *ANTIFOULING*

Una de las estrategias para prevenir y controlar el *biofouling* es el uso de superficies hidrófilas, ya que previamente se ha demostrado su resistencia a la adhesión bacteriana. Las superficies hidrófilas interactúan con el agua formando una barrera con ésta, que minimiza la adhesión de biomacromoléculas o células bacterianas, que se adhieren mediante interacciones hidrófobas [168]. En vista de lo anterior, es un desafío desarrollar materiales *antifouling* desde matrices hidrófobas como el Polipropileno (PP).

Se realizaron estudios *in situ* de la actividad *antifouling*. Para ello se sumergieron los nanocompósitos en el mar, junto a PP puro como muestra de control. Se evaluaron dos condiciones:

- 1) Temperatura 30°C y tiempo 2 semanas.
- 2) Temperatura 22°C y tiempo 2 meses.

Para realizar el conteo de las bacterias adheridas a la superficie de las muestras, se usó Microscopía de Fluorescencia.

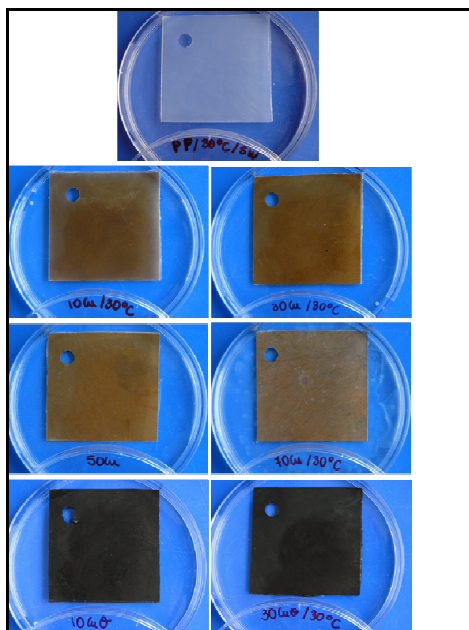


Figura 93. Imágenes de los nanocompuestos inmersos en el mar a 30°C, durante 2 semanas.

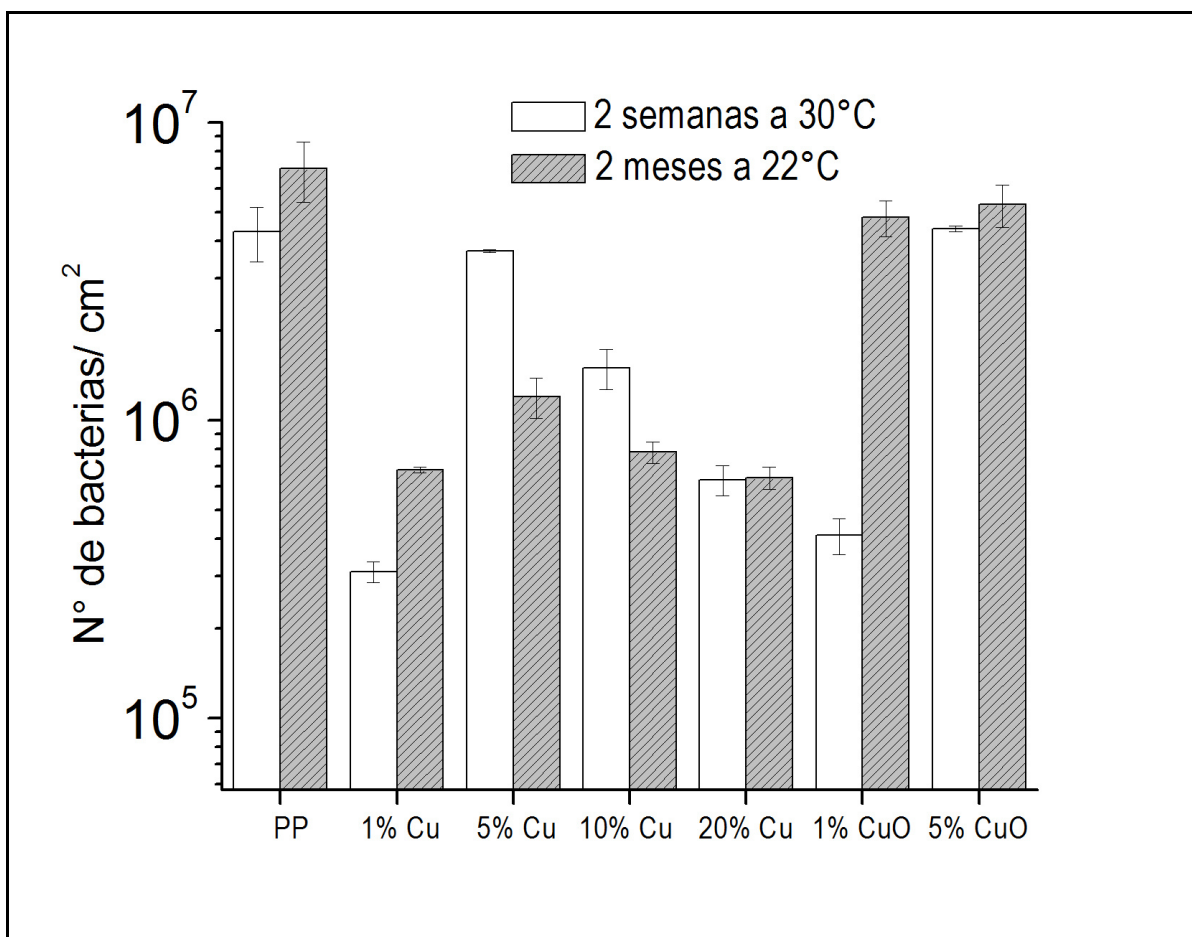


Figura 94. Concentración bacteriana de las biopelículas formadas en las superficies de las muestras inmersas en el mar.

En el gráfico de barras de la Figura 94 se ilustra el número de bacterias por unidad de área bajo las dos condiciones evaluadas. Normalmente, una alta temperatura incentiva la velocidad de colonización bacteriana, al igual que un mayor tiempo de exposición de las superficies en el medio marino [11,14]. Entre las condiciones estudiadas existen grandes diferencias en las concentraciones bacterianas.

En general, las superficies de control presentan elevada adherencia. Después de 2 semanas expuestas a 30°C las muestras con 1%, 10% y 20% en volumen de nanopartículas de cobre metálico presentan una adherencia menor al control. La muestra 1%Cu presenta la mejor actividad *antifouling* de su serie, similar a la actividad de la muestra con 1%CuO, mientras que la concentración bacteriana en las muestras 5%Cu y 5%CuO es similar al control. La Tabla 32 resume los porcentajes de reducción de la adherencia bacteriana:

Tabla 32. Reducción de la adherencia bacteriana en ambiente marino a 30°C durante 2 semanas.

	<b>PP</b>	<b>1%Cu</b>	<b>5%Cu</b>	<b>10%Cu</b>	<b>20%Cu</b>	<b>1%CuO</b>	<b>5%CuO</b>
<b>Nº de bacterias /cm<sup>2</sup></b>	43×10 <sup>5</sup>	31×10 <sup>4</sup>	37×10 <sup>5</sup>	15×10 <sup>5</sup>	63 ×10 <sup>4</sup>	56×10 <sup>3</sup>	44×10 <sup>5</sup>
<b>% Reducción *</b>	-	92,8	14,0	65,1	85,3	98,7	0

\*: Reducción con respecto la muestra control (PP)

Tras 2 meses a 22°C la adherencia del PP puro (muestra de control) aumenta. Todos los nanocompuestos con nanopartículas de cobre metálico presentan una adherencia menor al control, las muestras con 1%, 10% y 20% de cobre tienen colonizaciones similares. Por el contrario, las muestras con óxido de cobre no demuestran alteración en la adherencia con respecto al control. Los porcentajes de reducción son resumidos en la Tabla 33.

Tabla 33. Reducción de la adherencia bacteriana en ambiente marino a 22°C durante 2 meses.

	<b>PP</b>	<b>1%Cu</b>	<b>5%Cu</b>	<b>10%Cu</b>	<b>20%Cu</b>	<b>1%CuO</b>	<b>5%CuO</b>
<b>Nº de bacterias /cm<sup>2</sup></b>	70×10 <sup>5</sup>	68×10 <sup>4</sup>	12×10 <sup>5</sup>	78×10 <sup>4</sup>	64 ×10 <sup>4</sup>	48×10 <sup>5</sup>	56×10 <sup>5</sup>
<b>% Reducción *</b>	-	90,3	82,9	88,9	90,9	31,4	20,0

\*: Reducción con respecto la muestra control (PP)



Las diferencias de los resultados en ambas condiciones testeadas son atribuibles a las diferencias en los tiempos de exposición, definitivamente tras largos períodos se reflejan los comportamientos de los materiales.

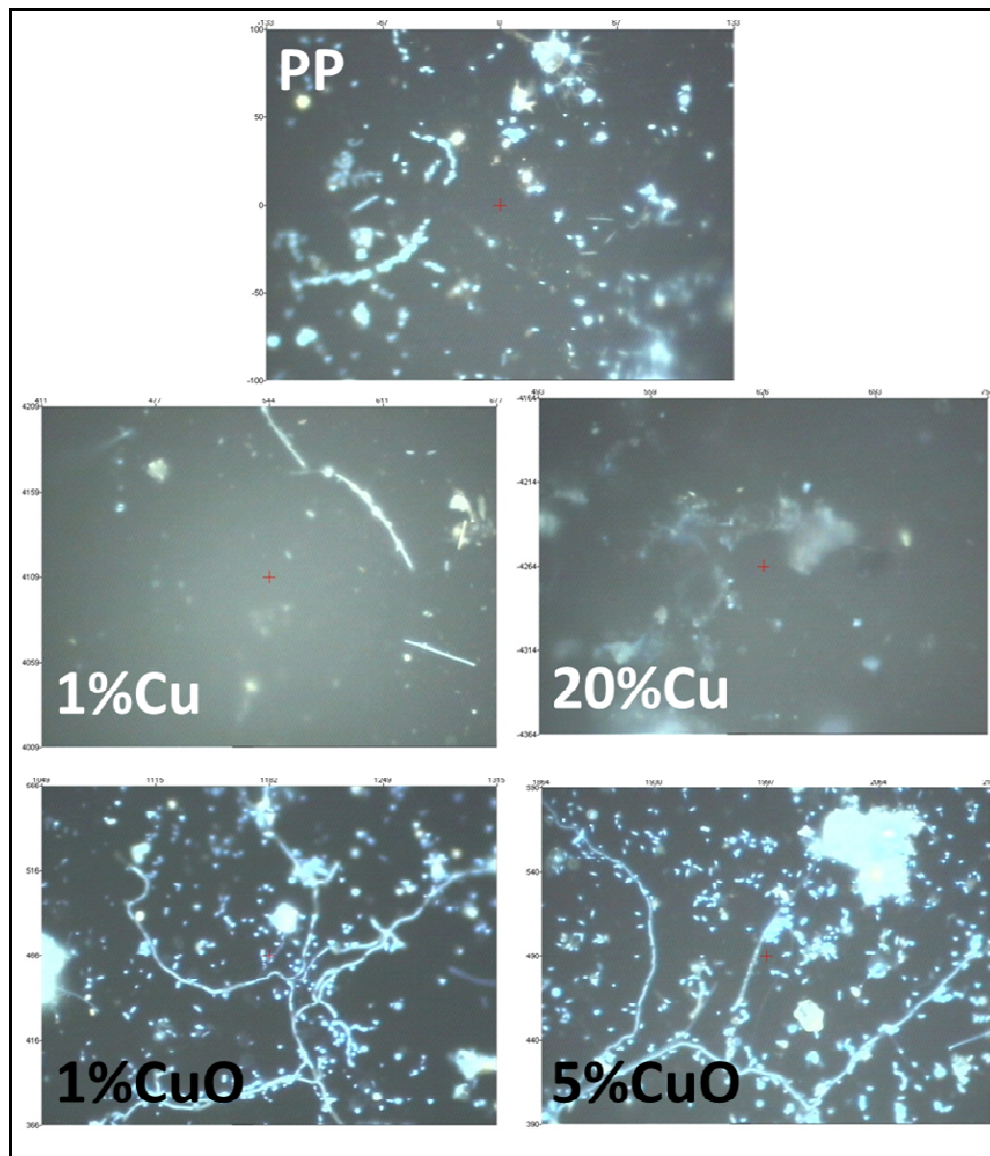


Figura 95. Fotografías de Microscopía de Epifluorescencia de las muestras de PP con 0%, 1% y 20% de nanopartículas de cobre metálico y de las muestras de PP con 0%, 1% y 5% de nanopartículas de óxido de cobre. Después de 2 meses inmersos en el mar a 22°C.

Según se exhibe en la Figura 95 , el *biofilm* o biopelícula formado sobre Polipropileno puro (PP) se distribuye homogéneamente en toda la superficie, con morfologías diferentes. Se evidencia una biopelícula compleja por la combinación de formas filamentosas y otras redondas, asociadas a bacterias y protozoos. Este grado de colonización corresponde a un *microfouling* inmaduro de aproximadamente una semana

[14]. No se observaron alteraciones en el brillo y las bacterias conservan formas definidas y un pequeño tamaño, indicando un metabolismo normal.

Las muestras con nanopartículas de cobre metálico presentan variación en la intensidad del brillo, las bacterias aparecen más apagadas que en la muestra control, en especial sobre la superficie con 20% en volumen de Cu, donde apenas son distinguibles. La variación del color y las discrepancias en tamaño dan cuenta de una alteración en el metabolismo de la bacteria, probablemente por la acción tóxica de los iones cúpricos. Las formas voluminosas corresponden a bacterias encapsuladas o rodeadas por los exopolisacáridos secretados.

Las muestras con nanopartículas de óxido de cobre tienen una alta concentración bacteriana. Estos microorganismos presentan formas filamentosas, barras y algunas formas voluminosas de exopolisacáridos, todas muy fluorescentes. Esto demuestra que las superficies son adecuadas para la adherencia bacterial en las condiciones en que se realizaron los test.

A pesar de la prolongada exposición de 2 meses a 22°C, el *microfouling* resultó pobremente adherido sobre las superficies de PP con nanopartículas de cobre metálico, siendo fácilmente limpiado o removido por raspaje ligero. Investigaciones señalan que si existe un fácil desprendimiento del *microfouling*, el *macrofouling* también sería pobremente soportado [82,169,170]. La actividad *antifouling* es consecuencia de la liberación de iones cúpricos [169].

A partir de los resultados es posible aseverar que todas las superficies testeadas con nanopartículas de cobre metálicos son tóxicas para las bacterias que conforman el biofilm. Estos materiales tienen un uso potencial en la industria marina, reduciendo el *biofouling* o la bioadherencia y minimizando los regímenes de limpieza. Los nanocompuestos con CuO no manifiestan actividad *antifouling*, coherentemente a sus bajas velocidades de liberación de iones cúpricos.

Se recomienda realizar los estudios por largos periodos de tiempo para tener resultados más precisos. Si bien la formación del biofilm demora pocos días, toma cerca de 2 a 3 meses en madurar. Además a bajas temperaturas el proceso es lento, mientras que a temperaturas sobre 27°C el biofilm se forma en pocas horas [167].

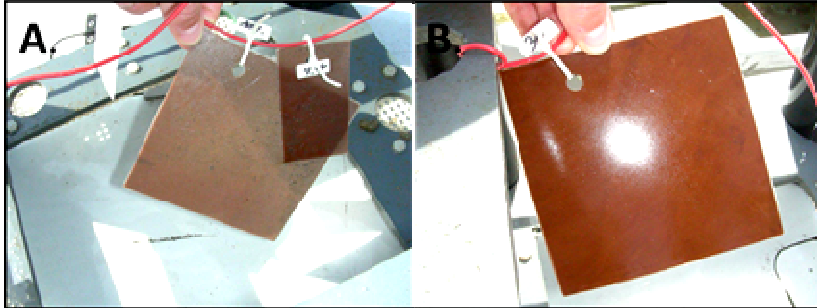


Figura 96. Imágenes de las muestras después de 6 meses inmersas en agua de mar de PP con A) 1% y B) 5% en volumen de nanopartículas de cobre.

La superficie de las placas después de una inmersión de 6 meses en el mar no exhiben adherencia de microorganismos marinos, corroborando su actividad *antifouling* (Figura 96). Estas muestras se encuentran actualmente inmersas en el mar y se espera evaluarlas después de un año.

# CAPÍTULO 7: ESTUDIOS TÉRMICOS Y REOLÓGICOS

El estudio de las propiedades térmicas y reológicas de los nanocompuestos es relevante para determinar la factibilidad de su procesamiento y las condiciones para la fabricación de un producto que cumpla con ciertas propiedades requeridas.

## 7.1.- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES TÉRMICAS

Se estudiaron las transiciones térmicas por la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Los análisis de Polipropileno isotáctico comercial (PH0320) sin y con nanopartículas de cobre son ilustrados en las Figura 97 y Figura 98.

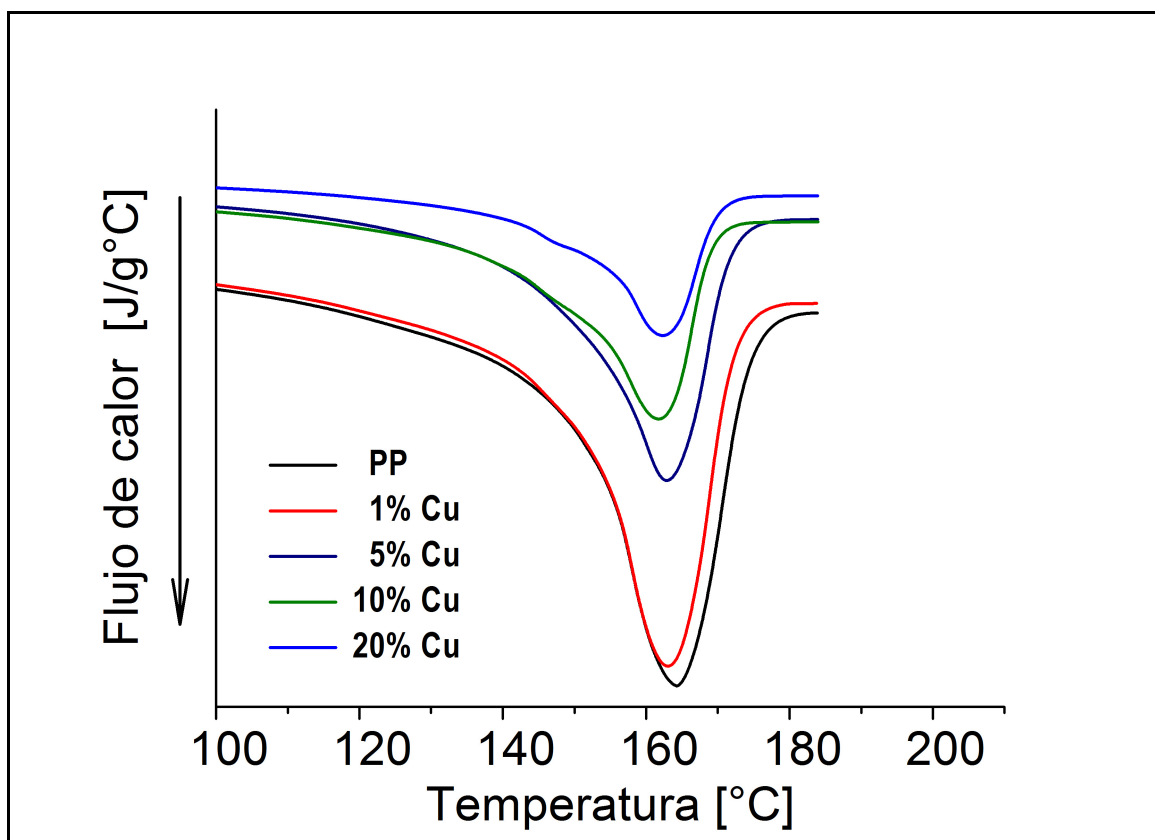


Figura 97. Curvas de fusión del PP puro y de los nanocompuestos con 1,5, 10 y 20% en volumen de nanopartículas de cobre.

Las muestras fueron tratadas no isotérmicamente desde 25 a 190°C a una velocidad de calentamiento de 20°C/min (Figura 97). Presentan cambios en el flujo de calor en función de su nano-contenido: los picos endotérmicos de fusión son más pequeños mientras mayor es el contenido de nanopartículas de cobre, mientras que la

temperatura de fusión ( $T_f$ ) no cambia con la presencia del nano-contenido. Esto quiere decir que la fracción de polímero que funde disminuye, en contraste con el aumento del contenido de nanopartículas de cobre.

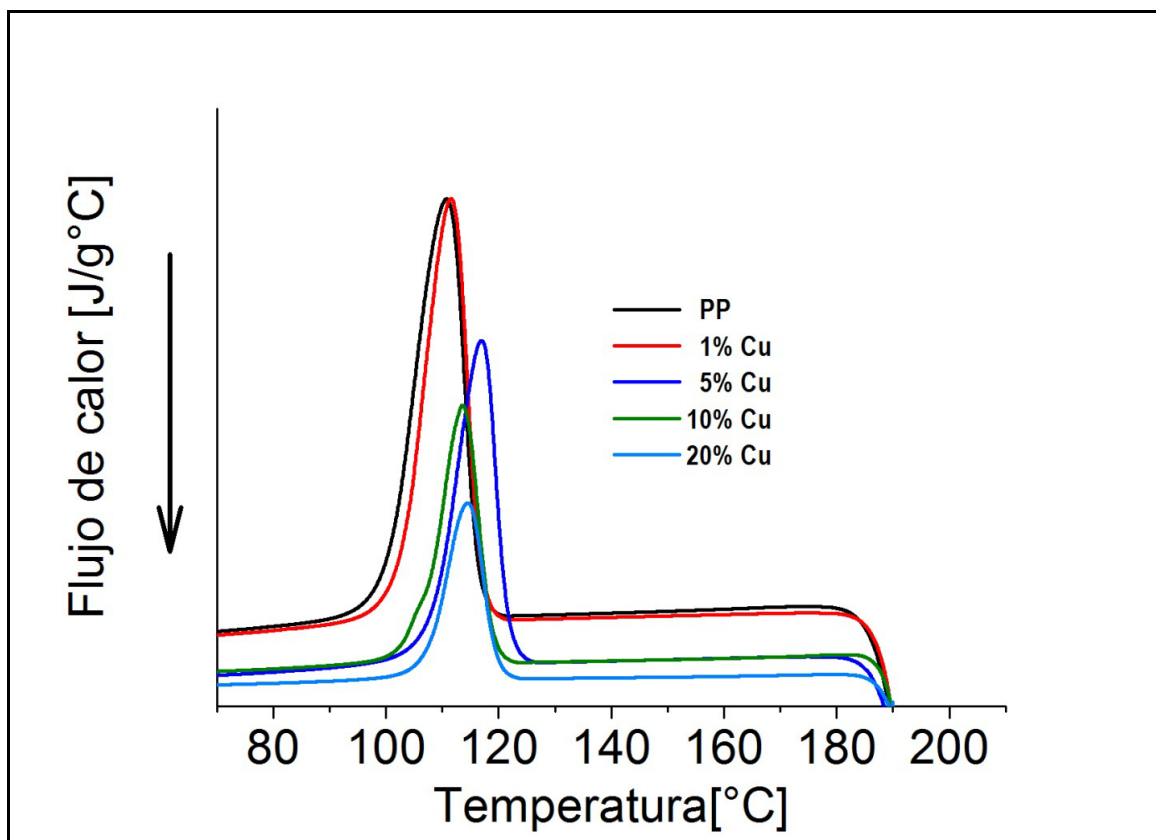


Figura 98. Curvas de cristalización del PP puro y los nanocompuestos con 1,5, 10 y 20% en volumen de nanopartículas de cobre.

El estudio de la evolución de la cristalización en régimen no isoterma se presenta en la Figura 98. Se constata, por el área de los picos exotérmicos, que a medida que aumenta el nano-contenido se logra menor cristalización del material y un leve aumento de las temperaturas de cristalización ( $T_c$ ).

De acuerdo a lo anterior, los valores de entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ), entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusión ( $T_f$ ) y temperatura de cristalización ( $T_c$ ) son obtenidos desde las curvas y enlistados en la

Tabla 34. La entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ) fue calculada por integración del pico de enfriamiento (Figura 98). La temperatura de fusión ( $T_f$ ) se escogió como el mínimo de la endoterma de fusión y la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) como el máximo de la exoterma de enfriamiento.

Tabla 34. Valores obtenidos de las curvas de DSC del PP puro y los nanocompuestos con 1, 5, 10 y 20% en volumen de nanopartículas de cobre.

Muestra	$\Delta H_1$ [J/g]	$\Delta H_2$ [J/g]	$T_f$ [°C]	$\Delta H_c$ [J/g]	$T_c$ [°C]	$\chi_c$ [%]
---------	-----------------------	-----------------------	---------------	-----------------------	---------------	-----------------

PP	83	-	164	91	111	40
1% Cu	80	75	163	86	112	38
5% Cu	58	58	163	61	117	28
10%Cu	45	42	162	45	114	21
20% Cu	29	25	161	31	115	14

La entalpía de fusión observada ( $\Delta H_1$ ) fue determinada integrando el pico de calentamiento (Figura 97). También se calculó la entalpía de fusión esperada para los nanocompósitos ( $\Delta H_2$ ) como:

$$\Delta H_2 = \Delta H_{PP} \times \phi \quad \text{Ecuación 6}$$

donde  $\Delta H_{PP}$  es la entalpía de fusión observada del Polipropileno y  $\phi$  es la fracción en peso del polímero presente en el nanocompósito.

El grado de cristalinidad ( $\chi_c$ ) de las muestras se determinó como :

$$\chi_c = [\Delta H_1 / \Delta H_f^\circ] \times 100\% \quad \text{Ecuación 7}$$

donde  $\Delta H_f^\circ$  es la entalpía de fusión teórica de un polímero 100% cristalino. Para el caso del Polipropileno isotáctico el valor es de  $\Delta H_f^\circ = 209 \text{ J/g}$  [3].

De la

Tabla 34, se tiene que las entalpías de fusión de los nanocompósitos tienen valores menores al valor del PP puro. Las entalpías de fusión observadas desde las curvas de DSC ( $\Delta H_1$ ) fueron levemente mayores que las entalpías de fusión esperadas ( $\Delta H_2$ ), las cuales fueron calculadas según la Ecuación 6. Este comportamiento también fue observado por Luyt y colaboradores [171] y se debería a que las nanopartículas de cobre, al situarse en la parte amorfa de la matriz polimérica, actúan como agente de nucleación promoviendo la cristalización [171,172].

En todos los casos, la temperatura de fusión ( $T_f$ ) decrece sutilmente, la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) aumenta y el grado de cristalinidad ( $\chi_c$ ) disminuye con el aumento de la incorporación de nano-relleno. La pequeña disminución de la  $T_f$  correspondería a la fusión de cristales más pequeños o imperfectos, debido a la disminución del tamaño de la estructura cristalina (menor cantidad de polímero) [172]; el aumento del  $T_c$  se debe probablemente a un cambio en el mecanismo de cristalización, pues las nanopartículas se comportan con núcleos de cristalización [171] y el decrecimiento del  $\chi_c$  es que al mismo tiempo que las nanopartículas nuclean cristales también dificultan la movilidad de las cadenas poliméricas y, por ende, retardan el crecimiento cristalino [172].

El mismo estudio se realizó para los análisis DSC al Polipropileno con 10% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre, los valores de entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ), entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusión ( $T_f$ ) y temperatura de cristalización ( $T_c$ ) son obtenidos desde las curvas y enlistados en la Tabla 35.

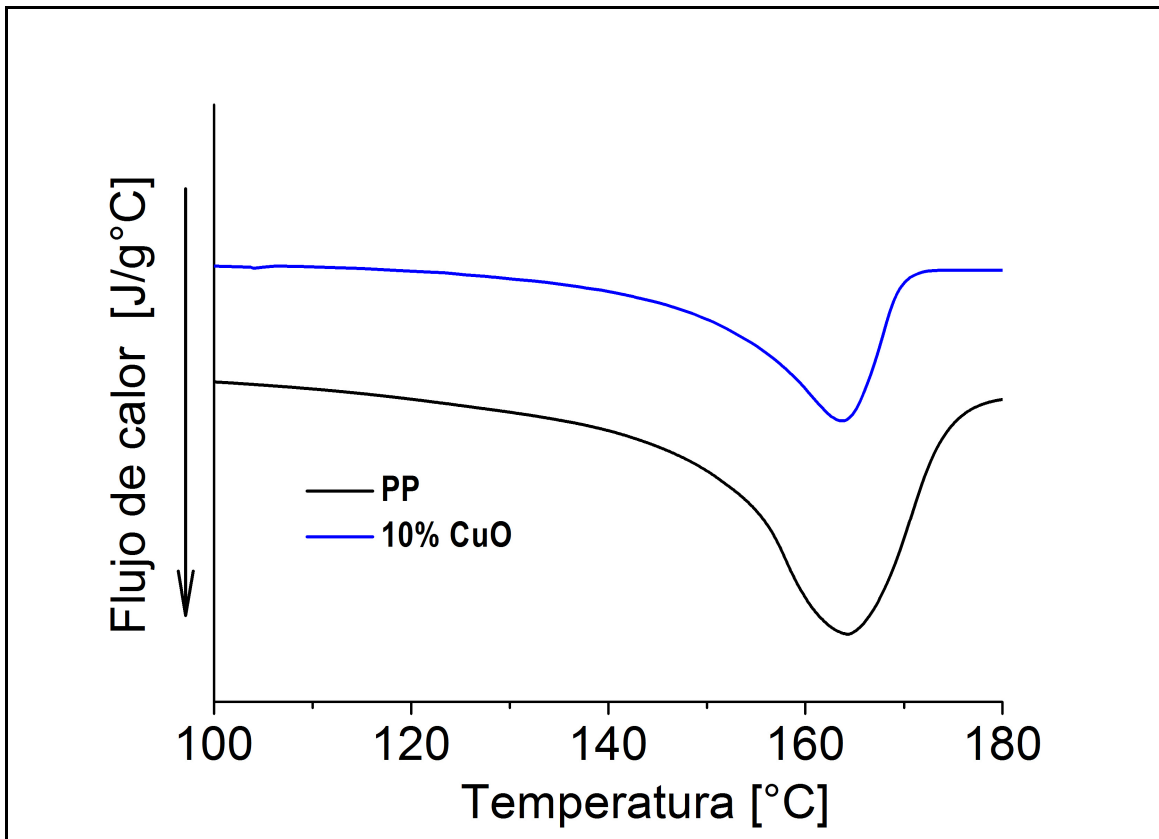


Figura 99. Curvas de fusión del PP puro y del nanocompuesto con 10 % en volumen de nanopartículas de óxido cobre.

La experiencia se realizó bajo las mismas condiciones anteriores, barridos de temperatura desde 25 a 190°C a 20 °C/min (

Figura 99). Al incorporar nanopartículas de óxido de cobre se produce el decrecimiento del pico de fusión. Esto manifiesta que al reemplazar una fracción del polímero disminuye la fracción cristalina disponible en toda la muestra.

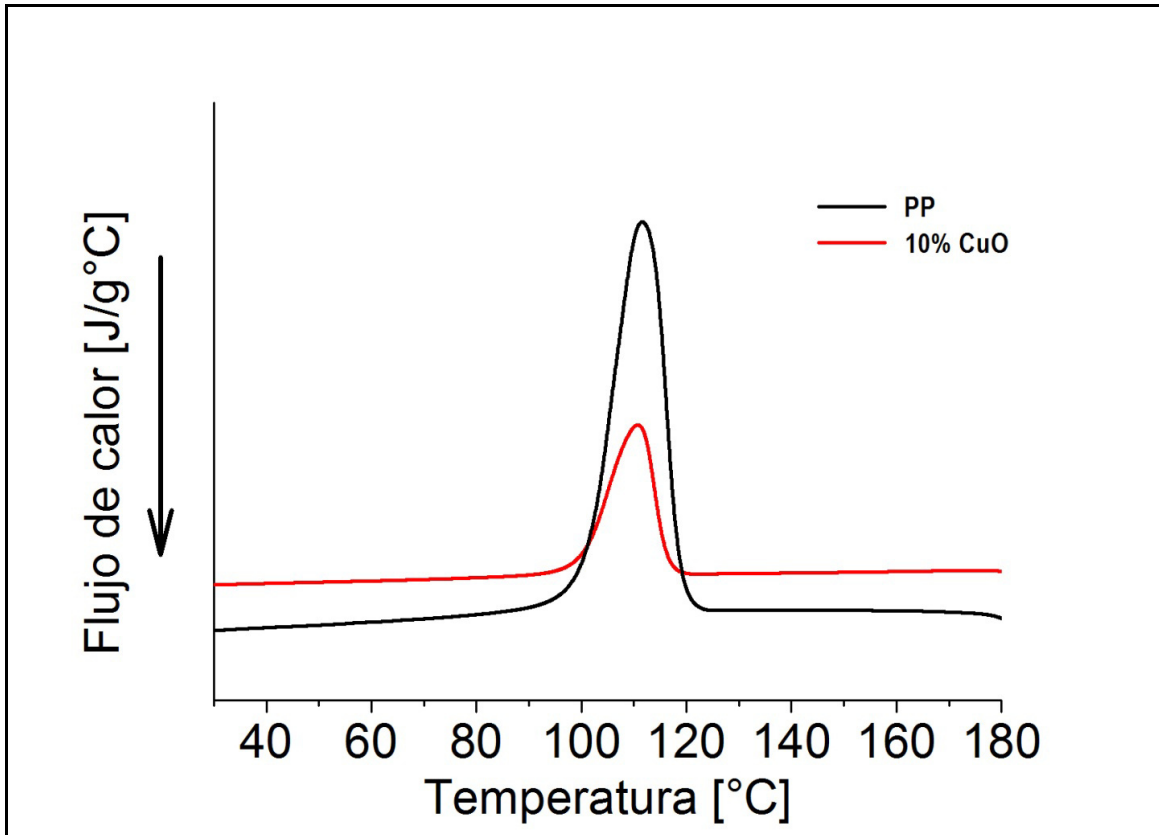


Figura 100. Curvas de cristalización del PP puro y del nanocompósito con 10 % en volumen de nanopartículas de óxido de cobre.

Tabla 35. Valores obtenidos de las curvas de DSC del PP puro y el nanocompósito con 10 % en volumen de nanopartículas de óxido de cobre.

Muestra	$\Delta H_1$ [J/g]	$\Delta H_2$ [J/g]	$T_f$ [°C]	$\Delta H_c$ [J/g]	$T_c$ [°C]	$\chi_c$ [%]
PP	83	-	164	91	111	40
10% CuO	54	52	163	278	112	26

Según se ve en la Tabla anterior, la entalpía de fusión observada ( $\Delta H_1$ ) fue mayor a la esperada ( $\Delta H_2$ ), pues las nanopartículas se comportan como agentes nucleantes. La temperatura de fusión ( $T_f$ ) y su grado de cristalinidad ( $\chi_c$ ) disminuyeron sutilmente, mientras que la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) aumenta. Los resultados obtenidos concuerdan con los registrados para los nanocompósitos con nanopartículas de cobre metálico.

En resumen, las propiedades térmicas se ven afectadas por la incorporación de partículas de cobre de tamaño nanométrico. La temperatura de fusión decrece, pero incrementa la temperatura de cristalización. Además, el grado de cristalinidad de la matriz polimérica disminuye levemente.



## 7.2.- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS EN FUNDIDO

Los estudios reológicos permiten estudiar la respuesta que tiene un polímero en estado fundido tras someterlo a un esfuerzo, cuya respuesta se conoce como viscosidad. La *viscosidad* ( $\eta$ ) representa la resistencia a la deformación del fluido o resistencia del material a fluir, y se define como la razón entre el esfuerzo ( $\sigma$ ) y la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ):

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}}$$

**Ecuación 8**

La reología permite establecer la relación entre el material y su procesamiento, pues las velocidades de deformación (cortante o cizalla) y las temperaturas que se utilizan en las experiencias pueden llegar a coincidir con las manejadas en los procesamientos convencionales de materiales plásticos (Tabla 36). Así, finalmente se evalúan las variaciones de la viscosidad en tales condiciones, determinando los parámetros y leyes que rigen el flujo de materiales termoplásticos.

Tabla 36. Velocidad de deformación de los diferentes métodos de procesamiento de materiales poliméricos [173].

<i>Método de procesamiento</i>	<i>Velocidad de deformación</i> [s <sup>-1</sup> ]
<b>Soplado</b>	10 <sup>2</sup>
<b>Extrusión</b>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>
<b>Inyección</b>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>

Los polímeros tienen un comportamiento *viscoelástico* al tener propiedades intermedias entre los sólidos elásticos y los líquidos viscosos. Esto significa que su comportamiento se rige por ley de Hooke (sólido elástico) en infinitesimales deformaciones y para velocidades de deformación bajas se aproximan a la ley de Newton (líquido viscoso).

Por otra parte, los polímeros muestran *pseudoplasticidad* debido a que su viscosidad varía, pues ésta decrece en función de la velocidad de deformación cortante (a temperatura constante). Por ello, se habla de fluidos no newtonianos al tener *viscosidades aparentes*.

El objetivo de este estudio es determinar las características del procesamiento de los nanocompuestos con nanopartículas de cobre metálico y en estado oxidado. Para la evaluación de dicho comportamiento se emplearon dos técnicas: reología de platos paralelos y reología extensional.

### 7.2.1.-Reología de platos paralelos

Se utilizó un reómetro rotacional (deformación sinusoidal), que consiste en dos platos paralelos, donde uno se mantiene inmóvil y el otro gira. El polímero en estado

fundido se sitúa en el medio de los platos. La ventaja del estudio es que permite obtener información continua de la variación de la viscosidad en función de bajas velocidades de deformación (corte).

Se cuantificó la viscosidad aparente compleja  $\eta^*$ , formada por una componente viscosa,  $\eta'$ , y una elástica  $\eta''$  y se determinó el módulo elástico,  $G'$ , (o de almacenamiento), que corresponde a la energía almacenada por ciclo. También se determinó  $G''$ , o módulo viscoso (o de pérdidas), que es la energía disipada por ciclo. Para ello se estudió un rango de 4 décadas desde  $10^{-2}$  a  $10^2$   $s^{-1}$ , en un reograma isoterma ( $190^\circ C$ ) de manera de evaluar la estabilidad térmica de los materiales

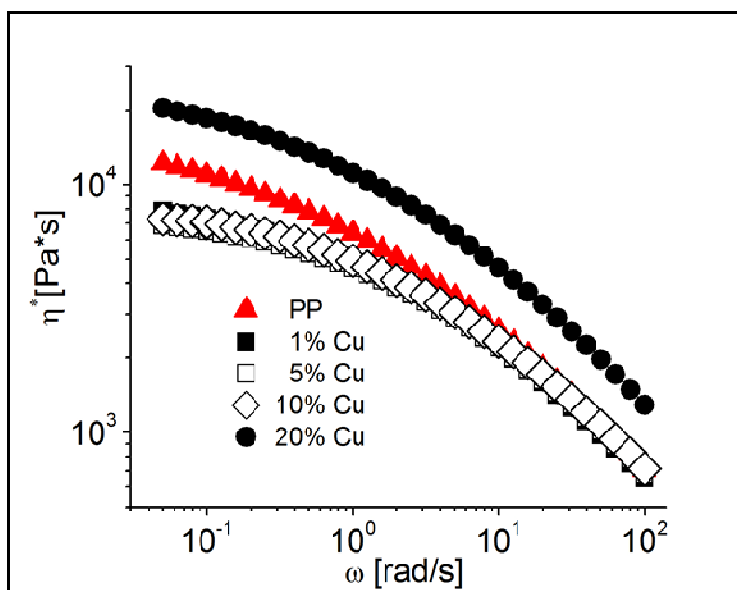


Figura 101. Viscosidad ( $\eta^*$ ) en función de la frecuencia ( $\omega$ ) a temperatura constante de  $190^\circ C$  de PP con 0; 1; 5; 10 y 20% en volumen de nanopartículas de cobre.

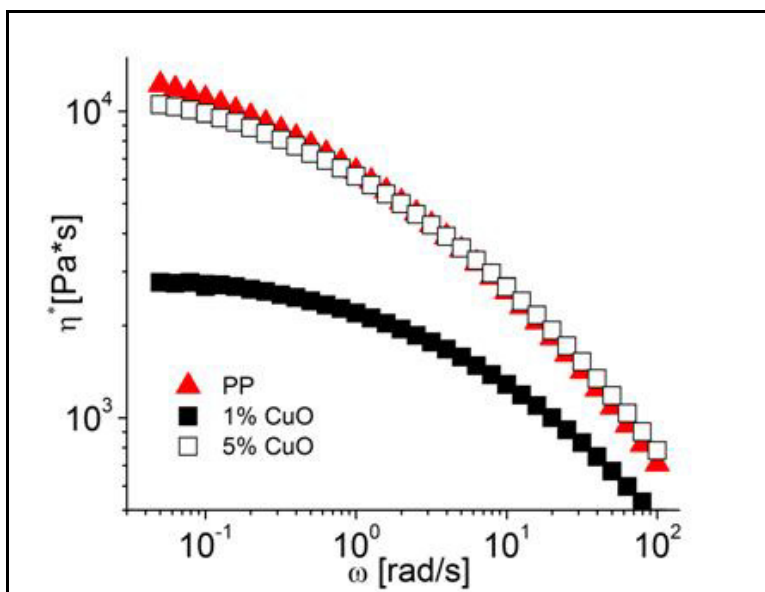


Figura 102. Viscosidad ( $\eta^*$ ) en función de la frecuencia ( $\omega$ ) a temperatura constante de  $190^\circ C$  de: PP puro y PP con 1% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre.

Las gráficas anteriores ( Figura 101 y Figura 102) muestran que en todos los casos la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizalla, por lo que mantienen un comportamiento como pseudoplásticos o fluidificantes (*shear- thinning*), debido a que la orientación de las cadenas crece proporcionalmente a la velocidad de deformación (o frecuencia).

Polipropileno puro fue procesado a 190°C usando las mismas condiciones de preparación de los nanocompuestos, para que todas las muestras tengan la misma historia de procesamiento. Según la Figura 101, los materiales con 1%, 5% y 10% en volumen de nanopartículas de cobre metálico tienen una menor viscosidad ( $\eta^*$ ) que PP puro a bajas frecuencias, no evidenciando una correlación directamente proporcional entre la viscosidad y la fracción volumétrica de nanopartículas para todo el rango de frecuencias. La disminución de la viscosidad a bajas frecuencias es producto de un grado de degradación de la matriz polimérica, consecuencia de, por ejemplo, el corte de las cadenas poliméricas y/o un aumento del volumen libre alrededor de las partículas. El aumento del volumen libre, por la presencia de partículas, hace que el polímero tienda a un comportamiento de fluido. En el rango de altas frecuencias, la viscosidad es equivalente al de PP puro, señalando que el nano-relleno no tiene efectos sobre la matriz polimérica. Como caso particular, el nanocompuesto con contenido 20%, experimenta un aumento de la viscosidad o disminución de la fluidez para todo el rango de frecuencias por sobre el PP puro, demostrando que existe un valor umbral del contenido de fracción volumétrica que disminuye el espacio entre partículas y aumenta la fricción entre ellas.

Por otro lado, en la Figura 102, se ve que el nanocompuesto con 5% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre presenta similares valores de la viscosidad que PP puro en todo el barrido de frecuencias. Sin embargo, un comportamiento singular registró la muestra con tan sólo 1% de relleno, la viscosidad y el módulo elástico experimentan una disminución en todo el rango de frecuencias, aumentando a menores frecuencias. En este caso se evidencia un grado de degradación, que no se observa con un 5% de nanopartículas, posiblemente porque la degradación se ve compensada con el aumento del nano relleno que aumenta el peso molecular.

Según los resultados, en general la respuesta de los materiales en estado fundido al someterlos a deformaciones sinusoidales no se vio afectada por el tipo y la cantidad de nanopartículas de cobre embebidas en Polipropileno. A excepción de la mezcla con 20% en volumen de nanopartículas de cobre metálico, pues su viscosidad aumenta, mientras que la muestra con 1% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre muestra una disminución de la viscosidad.

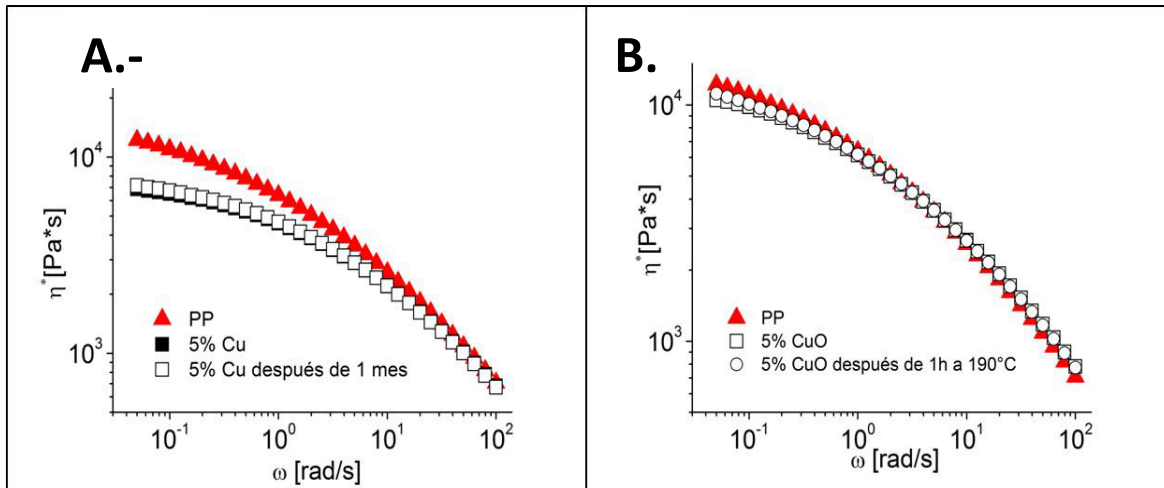


Figura 103. Viscosidad ( $\eta^*$ ) en función de la frecuencia ( $\omega$ ) a temperatura constante de 190°C de: A) PP puro y PP con 5 % en volumen de nanopartículas de cobre antes y después de 30 días de inmersión en el mar; B) PP puro y PP con 5% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre antes y después de 1 hora expuesto a 190°C.

Con el fin de determinar el grado de deterioro que pueden tener estos materiales tras someterlos a condiciones extremas, se testeó la viscosidad de una muestra inmersa en el mar durante 30 días y de otra muestra sometida a una temperatura de 190°C durante 1 hora (Figura 103). En ambos contextos no se observaron cambios con respecto a su estado inicial, indicando que no hay degradación.

Además, se determinó el efecto del nanorelleno sobre el peso molecular del material con respecto al PP puro. El análisis de la información se realizó con la ayuda del **Modelo de Carreau** de tres parámetros, es un modelo empírico muy flexible que describe la variación de la viscosidad de corte de polímeros [174].

$$\eta = \eta_o * [1 + (\beta * \dot{\gamma})^c]^{-1}$$

### Ecuación 9

Con  $\eta$  : viscosidad de corte que es función de la velocidad de corte [Pa\*s];

$\eta_o$  : viscosidad de corte finita y constante correspondiente a la zona de bajas velocidad de corte (región newtoniana) [Pa\*s];

$\dot{\gamma}$  : frecuencia [ $s^{-1}$ ];

$\beta$ : tiempo característico del Modelo de Carreau [s] y

$c$  : parámetro del modelo de Carreau  $\in [0,1]$ .

Es importante notar que si  $\dot{\gamma} = \beta^{-1}$ , entonces  $\eta = \eta_o/2$ .

Al obtener un buen ajuste del modelo, es posible caracterizar a los materiales en las zonas de muy bajas frecuencias conocida como región newtoniana y estimar el valor de  $\eta_o$ .

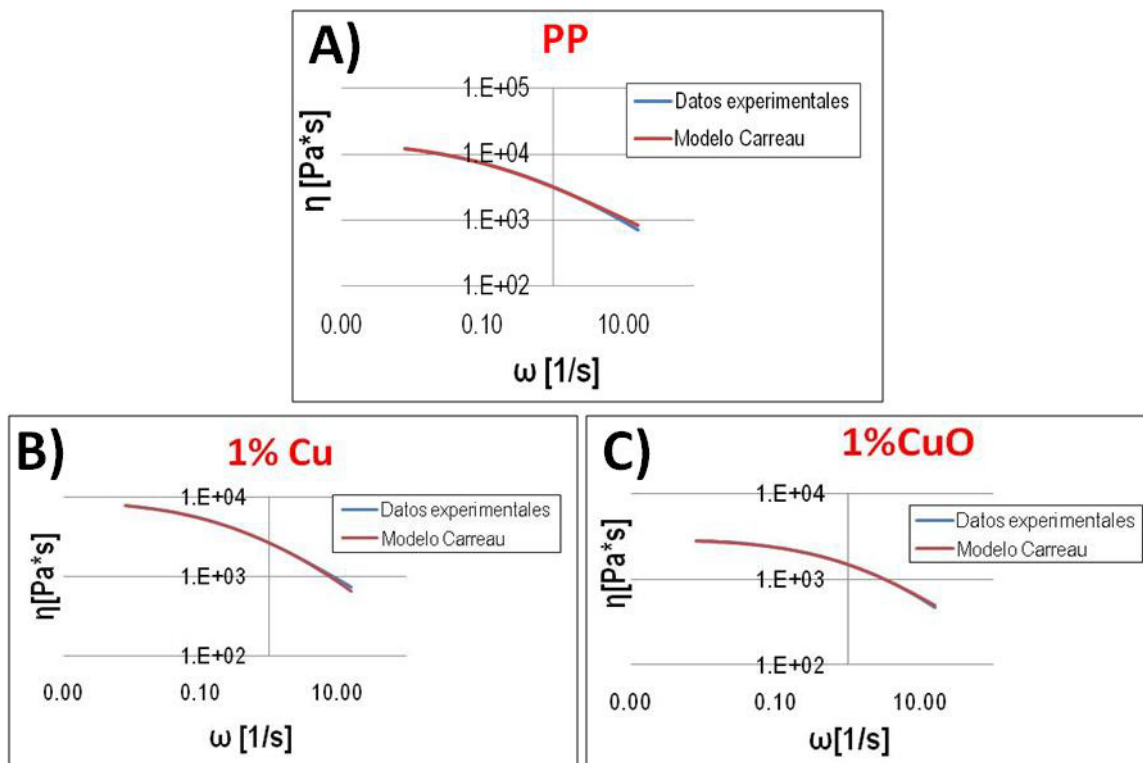


Figura 104. Viscosidad ( $\eta$ ) en función de la velocidad de corte ( $\omega$ ) de A) Polipropileno puro, B) Polipropileno con 1% en volumen de nanopartículas de cobre y C) Polipropileno con 1% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre. Las curvas de color rojo corresponden al ajuste del Modelo de Carreau.

Como se observa en los ejemplos de la Figura 104, las predicciones del Modelo de Carreau coinciden perfectamente con los datos ajustados. Esto ocurrió en todas las muestras estudiadas. De esta manera se justifica su uso en la determinación de los parámetros de Carreau de la

Tabla 37.

Es importante cuantificar si la presencia de relleno nanométrico afecta la degradación de la matriz polimérica. Para ello, se utilizaron los valores de  $\eta_o$  del Modelo de Carreau y la ecuación de Mark-Houwink, que es la expresión que relaciona proporcionalmente la viscosidad newtoneana (viscosidad a bajas cizallas) con el peso molecular del polímero:

$$\eta_o = K(M_w)^a \quad \text{Ecuación 10}$$

Con  $a \in [1;3,5]$ ;  $K$  constante [Pa s (g/mol)] y  $M_w$  peso molecular [g/mol].

Para estimar la variación del  $M_w$  de las muestras de Polipropileno con nanopartículas se usó la siguiente relación derivada de la expresión anterior :

$$\frac{(\eta_o)_{pp}}{(\eta_o)_{muestra}} = \left[ \frac{(M_w)_{pp}}{(M_w)_{muestra}} \right]^a$$

$$(M_w)_{pp} / (M_w)_{muestra} = \left[ \frac{(\eta_o)_{pp}}{(\eta_o)_{muestra}} \right]^{1/a}$$

Con  $a = 3,5$  ; coeficiente determinado por Münstedt y colaboradores [175].

Tabla 37. Parámetros de ajuste al Modelo de Carreau para PP con nanopartículas de cobre y nanopartículas de óxido de cobre. Estimación del descenso del peso molecular ( $M_w$ ) según  $\eta_o$  del Modelo de Carreau y la ecuación de Mark-Houwink

Muestra	$\eta_o$ [Pa*s]	$\beta$ [s]	C	% Descenso $M_w$
PP	15580	12	0,54	—
1% Cu	9063	5	0,56	17
5% Cu	7662	3	0,57	23
5% Cu después de 1 mes en el mar.	8038	4	0,57	21
10% Cu	8237	3	0,59	20
20% Cu	25284	10	0,55	-13
1% CuO	2969	1	0,58	61
5% CuO	12812	7	0,55	6
5% CuO después de 1 h a 190°C	13840	9	0,53	3

En general, los nanocompuestos presentan menores viscosidades newtoneanas que el PP puro. Estos comportamientos se ven reflejados por la poca variación del % de descenso del  $M_w$  ( peso molecular), que da cuenta del grado de degradación de la matriz polimérica en presencia del nano relleno. Un contenido del 1% en volumen de nanopartículas de cobre disminuye en un 17% el peso molecular, mientras que un contenido del 10% en volumen alcanza un decrecimiento del 20% . La elevada fracción sólida de la muestra con 20 % en volumen de cobre metálico es detectado por el reómetro como acrecentamiento del peso molecular, no dando cuenta de los efectos de degradación.

Por otro lado, PP con sólo un 1% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre muestra una alta disminución del 61% del  $M_w$ . Al aumentar la carga en un 5% de CuO se tiene una baja disminución del 6% del peso molecular, pues el aumento de la carga acrecienta el peso molecular, solapando los efectos de degradación. Además , la inmersión en mar durante 30 días y la exposición a 190°C por 1 h, no demuestran considerables cambios.

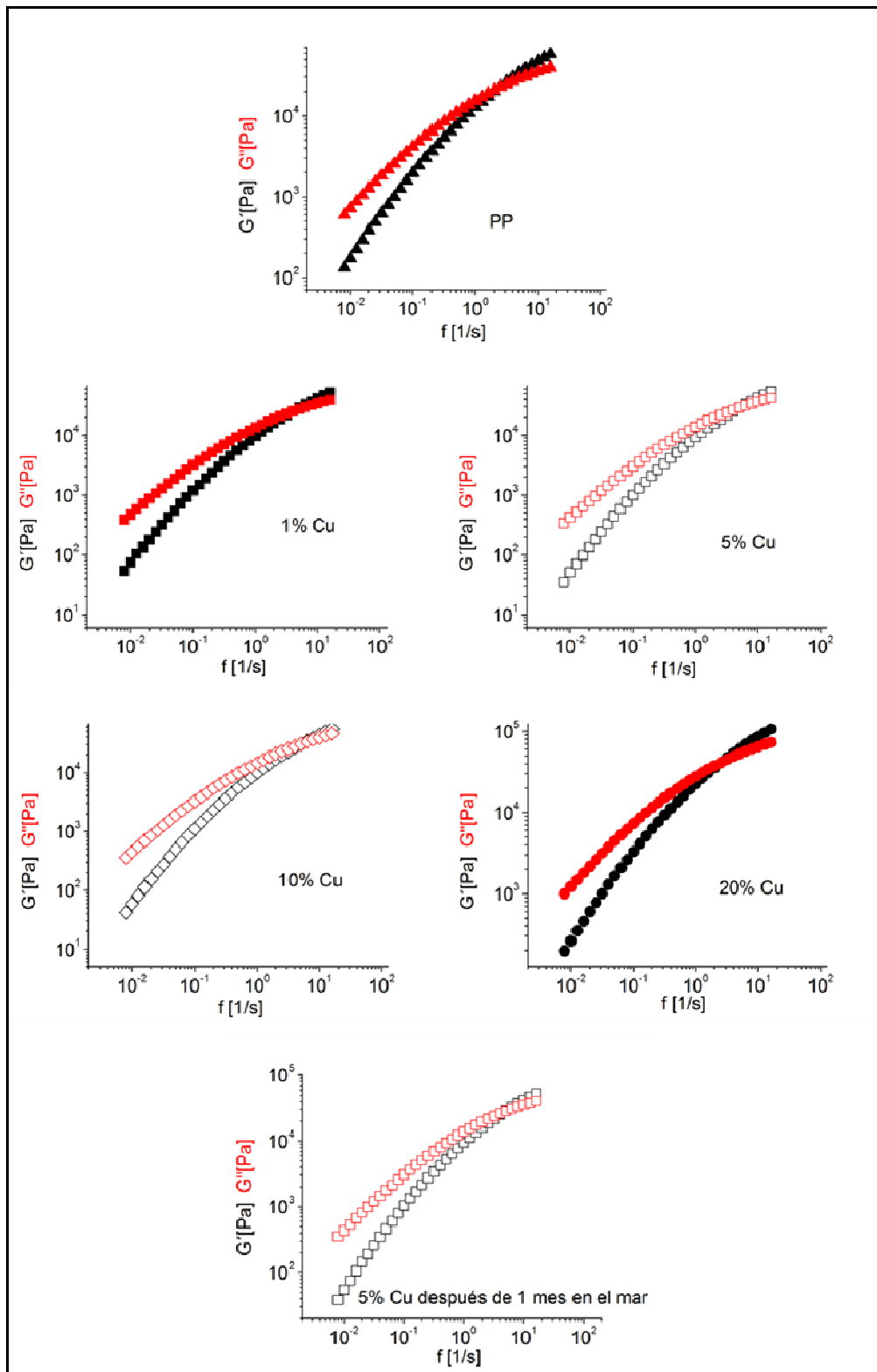


Figura 105. Representación del módulo elástico ( $G'$ ) y módulo viscoso ( $G''$ ) en función de la frecuencia ( $\omega$ ) de PP con 0; 1; 5; 10 y 20% en volumen de nanopartículas de cobre y de PP con 5% en volumen de nanopartículas inmerso por 30 días en el mar.

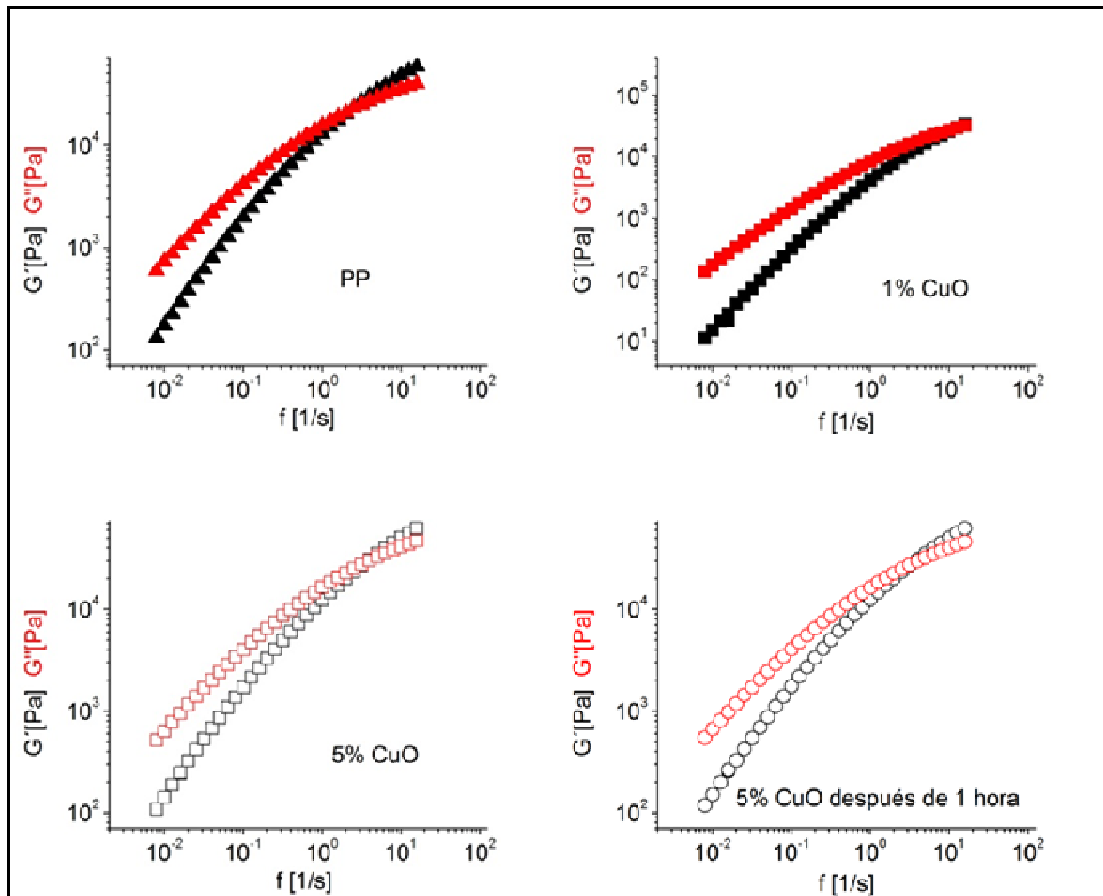


Figura 106. Representación del módulo elástico ( $G'$ ) y módulo viscoso ( $G''$ ) en función de la frecuencia ( $\omega$ ) de PP con 0; 1 y 5 % en volumen de nanopartículas de óxido de cobre y de PP con 5% en volumen de nanopartículas de óxido de cobre previamente expuesto a  $190^\circ C$  por 1 hora.

A todas las muestras se les determinó su módulo elástico  $G'$  y su módulo viscoso  $G''$ . Como se puede observar en el barrido de frecuencia de las Figura 105 y Figura 106 a bajas frecuencias se produce una mayor movilidad de las cadenas poliméricas siendo  $G''$  mayor que  $G'$ , lo que implica que las muestras se comportan como un líquido (fluyen). Al aumentar la frecuencia esta se invierte, en este caso los materiales se comportan como un sólido. Este comportamiento dual también se observa en PP puro, por ello es importante comparar la frecuencia donde  $G'$  y  $G''$  se interceptan que se conoce como tiempo característico o tiempo de respuesta del material ( $\tau = 1/f$ ).



Tabla 38. Tiempos característicos de las muestras donde  $G' = G''$ .

Muestra	$\tau$ [s]
PP	2,5
1% Cu	4,0
5% Cu	5,0
10% Cu	6,3
20% Cu	2,5
5% Cu inmerso por 1 mes en el mar.	5,0
1% CuO	12,6
5% CuO	4,0
5% CuO expuesto a 190°C por 1h.	4,0

Todas las muestras presentan un aumento del tiempo característico con respecto a PP puro. No hay un efecto marcado con respecto al tipo de nanopartícula y la cantidad de relleno. Únicamente la muestra 1%CuO presenta un tiempo característico muy alto, comportándose principalmente como fluido en el rango de frecuencias estudiado.

### 7.2.2.-Reología extensional

La reología extensional determina la viscosidad extensional, es decir, la resistencia de un polímero en estado fundido a extenderse o alargarse bajo un esfuerzo de tracción. Es importante su estudio, porque la viscosidad extensional domina muchos procesos industriales, como el modelo por soplado, la elaboración de películas o *films* por extrusión y el hilado.

En este reómetro se fijan los extremos de un polímero de forma rectangular a dos cilindros (ver Figura 32). El polímero en estado fundido es alargado a diferentes velocidades de deformación a la tracción (frecuencia de giro de los tornillos). La velocidad de deformación y el tiempo se correlacionan por la siguiente ecuación:

$$\varepsilon_H = \varepsilon'_H * t$$

**Ecuación 11**

Con  $\varepsilon_H$  = deformación de Henky;  $\varepsilon'_H$  = velocidad de deformación y  $t$  tiempo de extensión.

En todas las experiencias se mantuvo constante la deformación de Henky ( $\varepsilon_H = 4$ ), evaluándose las siguientes condiciones, a temperatura constante de 180°C:

Tabla 39. Condiciones experimentales. Con  $\varepsilon'_H$  velocidad de deformación y  $t$  tiempo de extensión.

$t$ [s]	$\varepsilon'_H$ [ $s^{-1}$ ]
1	4
10	0,4
100	0,004

Con  $\varepsilon_H = 4$  es posible indicar el porcentaje de elongación que fue impuesto en cada experiencia evaluada, según la ecuación:

$$\varepsilon_H = (L - L_0) / L_0$$

**Ecuación 12**

Con  $L$  = largo final y  $L_0$  = largo inicial. Entonces, si  $\varepsilon_H = 4$  se tiene que:

$$(L - L_0) / L_0 = 4$$

$$L / L_0 - 1 = 4$$

$$L / L_0 = 5$$

Esto significa que se impuso una elongación de 500% en cada experiencia. Se evaluaron los nanocompuestos con 1, 5, 10 y 20 % en volumen de nanopartículas de cobre metálico.

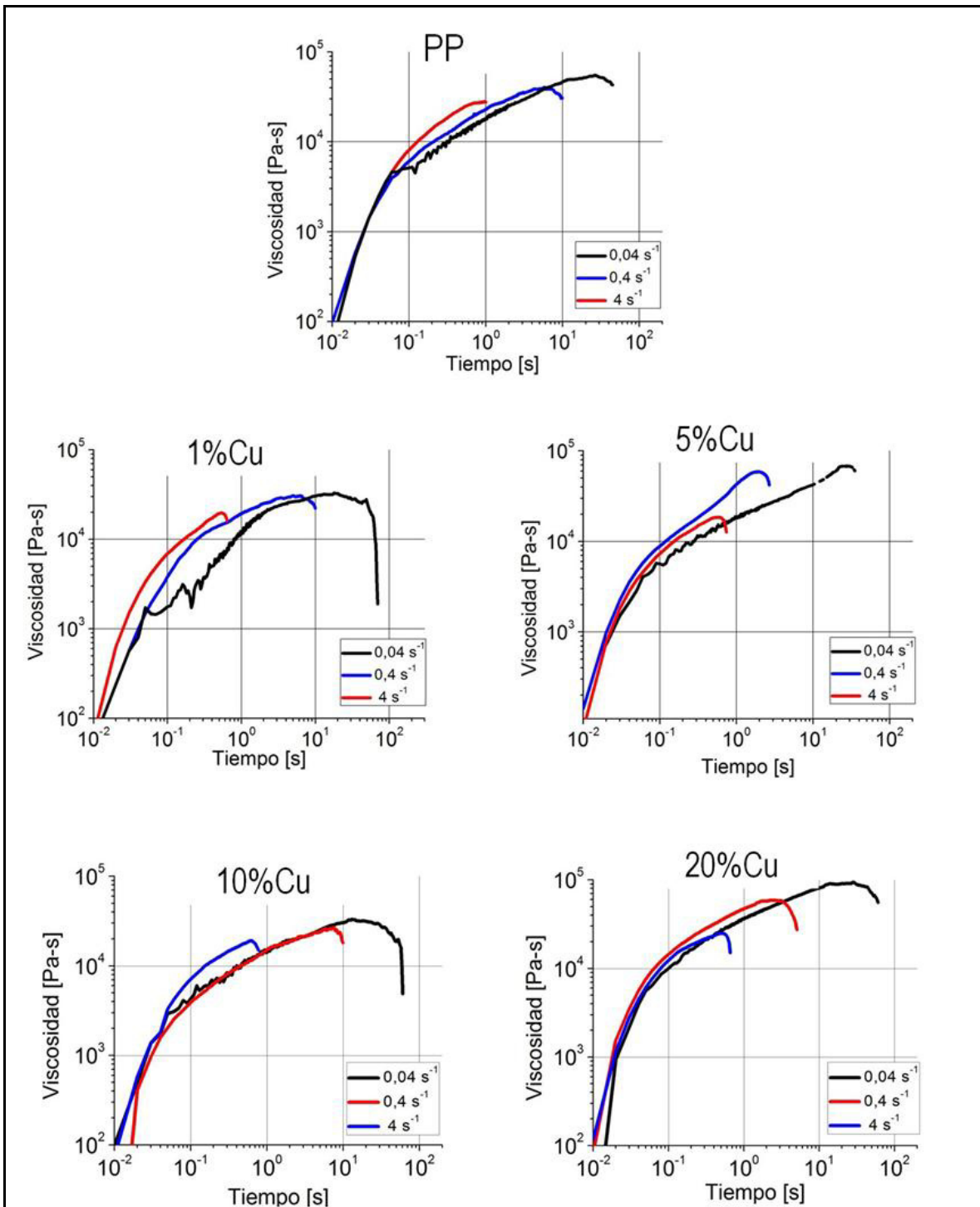


Figura 107. Elongación extensional a diferentes velocidades de deformación de PP con nanopartículas de cobre metálico.

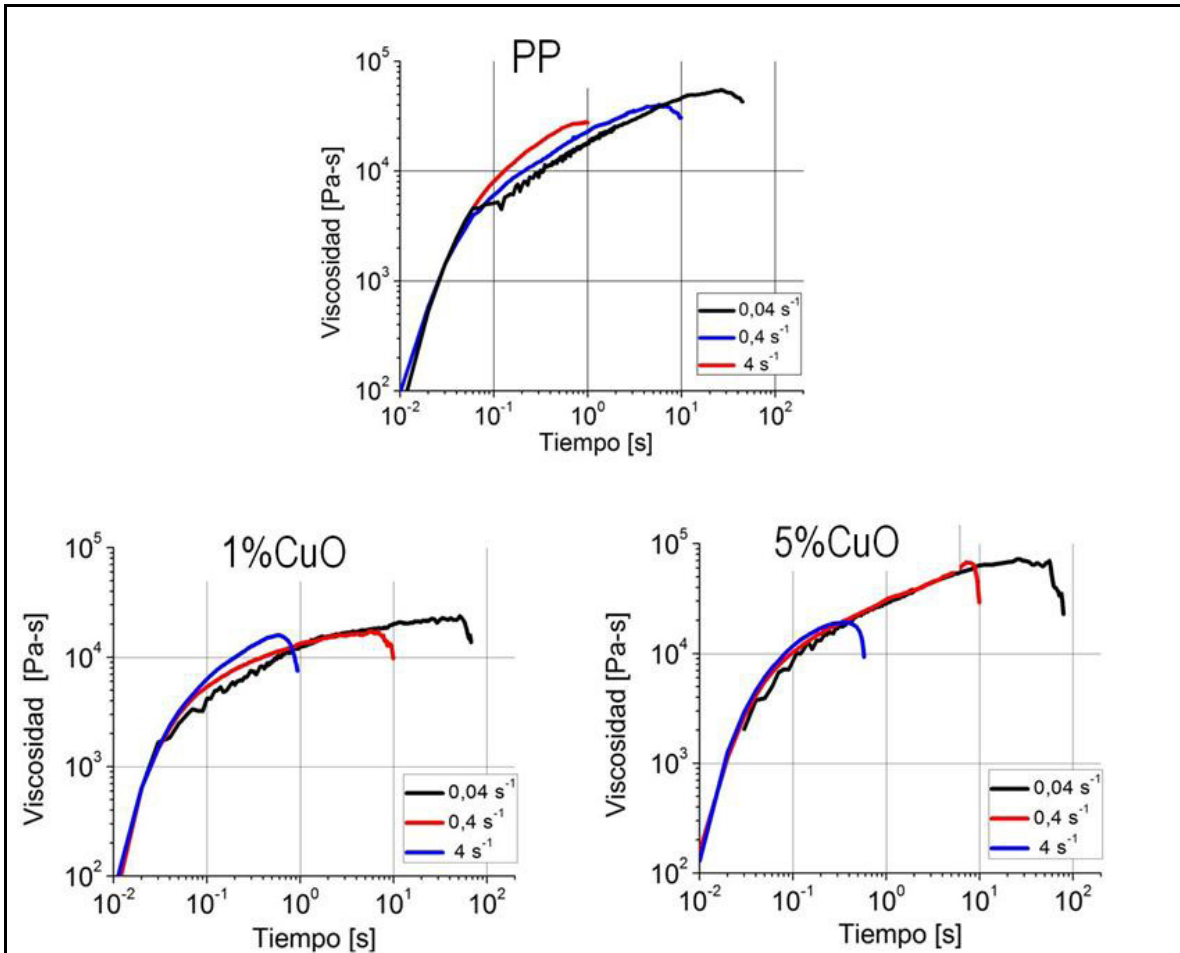


Figura 108. Elongación extensional a diferentes velocidades de deformación de PP con nanopartículas de óxido de cobre.

Las Figura 107 y Figura 108 exhiben las curvas de viscosidad extensional uniaxial de los nanocompuestos a diferentes velocidades de deformaciones. En general el endurecimiento por deformación de los nanocompuestos es similar al nivel de endurecimiento del PP (muestra control). Las extensibilidades en estado fundido de las muestras de PP independiente del tipo de nanopartículas son iguales o levemente menores al control en las diferentes velocidades de deformación.

En suma, todas las muestras estudiadas mantienen los niveles de endurecimiento por deformación de la matriz polimérica pura bajo las velocidades de deformación estudiadas. Esto indica que el comportamiento de procesamiento de los nanocompuestos no variaría al ser procesados industrialmente mediante modelo por soplado, extrusión de películas o hilado.

## CAPÍTULO 8: MATERIALES HÍBRIDOS

En acuerdo con las demandas de funcionalidad y procesabilidad, las nanopartículas deben tener buena dispersión y estabilidad térmica. Sin embargo, con las diferentes rutas de síntesis, incluyendo métodos de radiación, técnicas de microemulsión, reducción sonoquímica, ablación láser y depósito químico por vapor, entre otras, ellas se agregan, causando el deterioro de sus propiedades físicas y químicas.

Las nanopartículas se atraen mutuamente por su alta energía superficial, mediante fuerzas de van der Waals o enlaces químicos [176], lo que las lleva a formar *clusters* o agregados de mayor tamaño, que pueden llegar a escalas mayores que los nanómetros. Para solucionar el problema de agregación, dos metodologías serán estudiadas:

- 1) Sobre un material de soporte o portador (carrier) se sintetizarán nanopartículas en base a cobre [121].
- 2) Nanopartículas en base a cobre sintetizadas se recubrirán por compuestos orgánicos [120].

### 8.1.- NANOPARTÍCULAS EN BASE A COBRE SOPORTADAS EN SÍLICE (NPSCU/SI)

#### 8.1.1.-. Caracterización

Como material de soporte se utilizaron nanopartículas de sílice ( $\text{SiO}_2$ ), que fueron sintetizadas de acuerdo al método convencional sol-gel (ver sección 4.1.1). Nanopartículas en base a cobre se depositaron sobre la superficie de la sílice a partir de la reducción de cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) siguiendo el procedimiento estudiado por Kim y colaboradores [121]. En la Figura 109 se esquematiza el mecanismo tentativo del depósito de cobre:

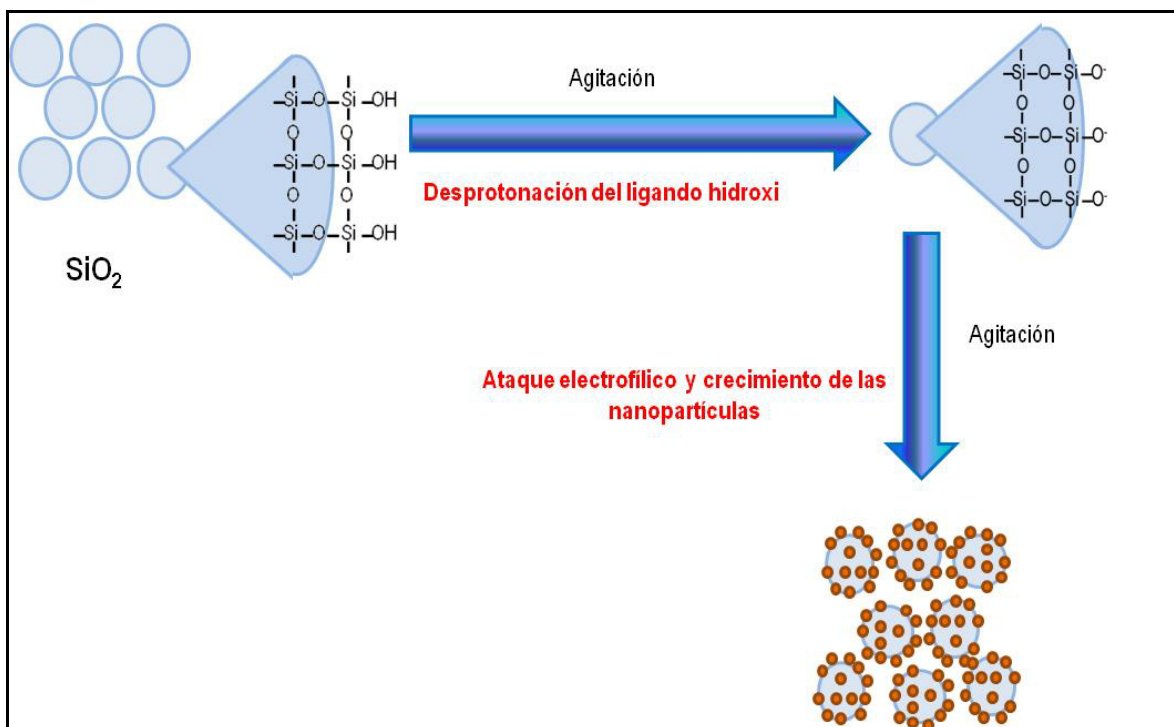


Figura 109. Mecanismo tentativo del depósito de Cu sobre la superficie de nanopartículas de SiO<sub>2</sub>. [121]

De acuerdo al mecanismo anterior, el cobre se deposita selectivamente en los grupos hidroxilo (-OH) terminales de la sílice. Estos grupos tienen la capacidad de reducir a los iones de cobre. En consecuencia la eficacia del mecanismo dependerá de la proporción en que se encuentren los diferentes grupos superficiales de la sílice. Según la Figura 110 los silanoles aislados seguidos de los silanoles germinales incitarían el mecanismo propuesto.

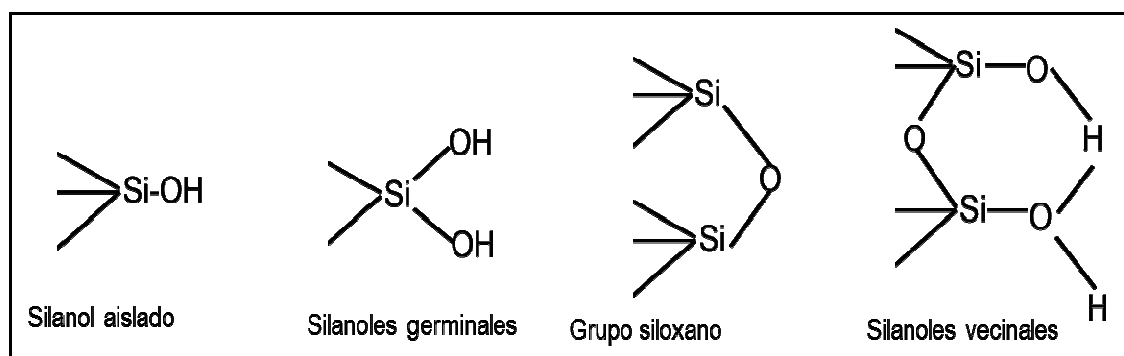
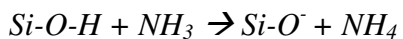


Figura 110. Diferentes tipos de grupos superficiales de la sílice sol-gel.

Se ha reportado que la sílice sol-gel tiene una concentración máxima de 8 grupos hidroxilo (-OH) por nm<sup>2</sup> [177] que podrían estar disponibles para la reducción de los iones de cobre.

A continuación se expone el mecanismo de síntesis reportado, que consiste en tres etapas [178].

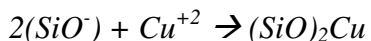
### Etapa 1: Desprotonación del ligando hidroxilo



#### Reacción 25

La eficiencia del proceso de reducción puede decrecer con el consumo de los grupos hidroxilo (-OH).

### Etapa 2: Ataque electrofílico



#### Reacción 26

El ión metálico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) ataca la parte nucleofílica ( $\text{SiO}^-$ ).

### Etapa 3: Crecimiento de las nanopartículas sobre la superficie de la sílice

El crecimiento de las nanopartículas se debe a la adición de más iones  $\text{Cu}^{+2}$  sobre la superficie de la sílice. Finalmente, se obtiene un material híbrido, que consiste en sílice como soporte y nanopartículas en base a cobre soportadas. La Figura 111 ilustra la estructura final del híbrido.

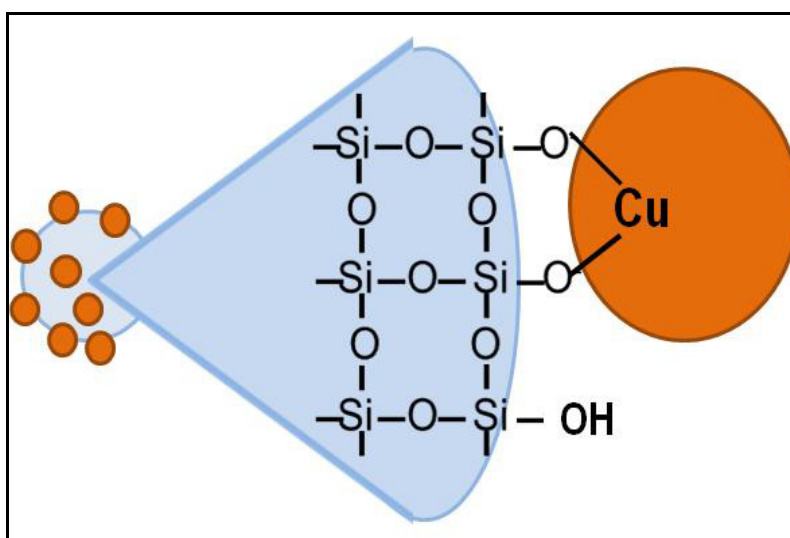


Figura 111. Estructura del híbrido compuesto de sílice sol-gel como soporte y nanopartículas en base a cobre como material soportado.

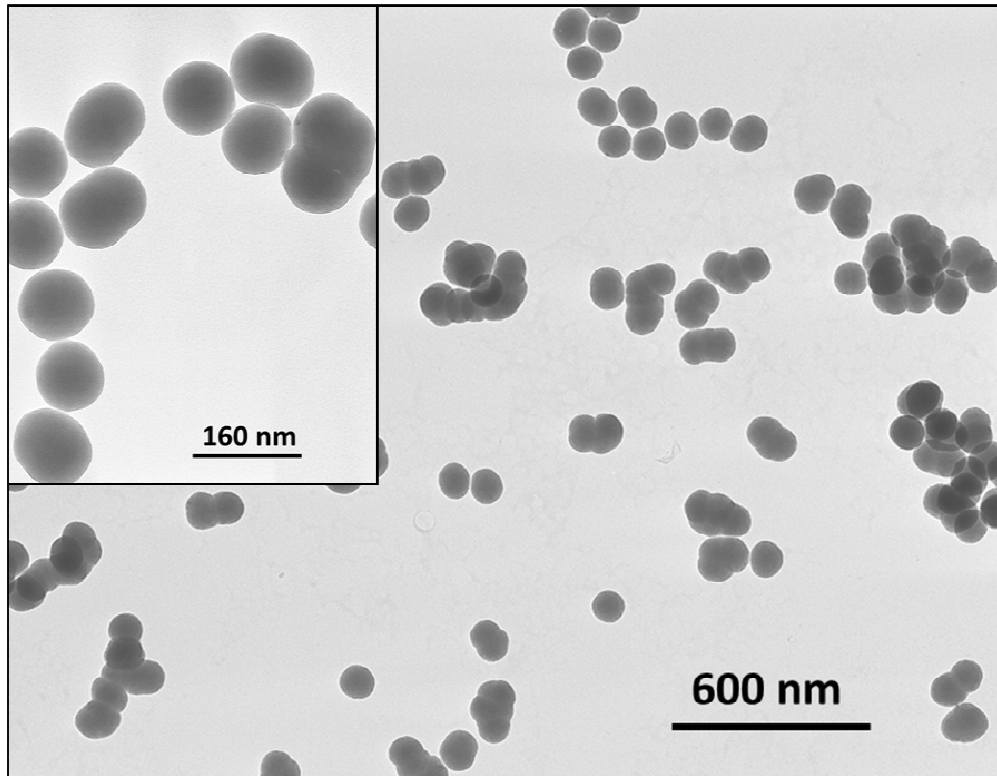


Figura 112. Imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de nanopartículas de sílice sol-gel.

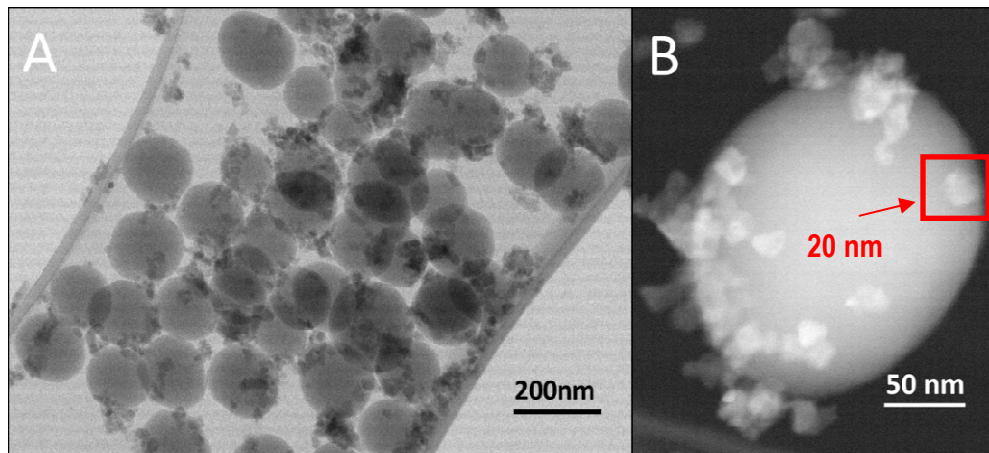


Figura 113. Imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de NPsCu/Si. A) Aglomerados de nanopartículas híbridas, B) nanopartícula híbrida aislada (Imagen de Campo Oscuro).

Se observa que la sílice sol-gel presenta una morfología esférica (Figura 112) y estrecha distribución de tamaños. Su diámetro promedio se estimó en 106,8 nm y su desviación estándar fue de 8,2 nm. Una vez modificada la superficie de la sílice, se forman nanoestructuras (Figura 113) que tienen un tamaño aproximado de 20 nm, que se distribuyen heterogéneamente en la superficie y muestran un poco de agregación.



El híbrido fue sometido a análisis ICP (Plasma Acoplado Inductivamente) y sus resultados se observan en la Tabla 40. Se confirma que las nanoestructuras están formadas en base a cobre.

Tabla 40. Resumen de los análisis de ICP para NPsCu/Si.

ICP % w/w		
Cu	Si	Otros elementos (O, Cl, H)
13,29	31,82	54,89

Se estudió su patrón de difracción para identificar la composición de las nanoestructuras soportadas (Figura 114). No se observaron las reflexiones características del cobre metálico (estado de oxidación cero), podría encontrarse en cantidades pequeñas indetectables por el equipo de difracción (no identifica compuestos bajo el 3% p/p) o simplemente la metodología no logró la reducción a cobre metálico.

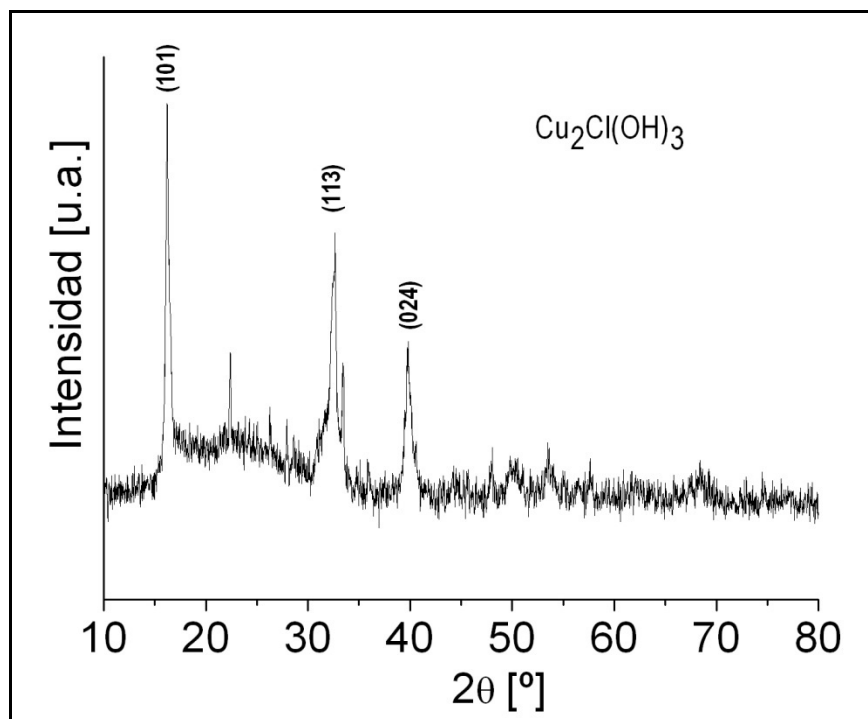


Figura 114. Difractograma del híbrido NPsCu/Si.

Las principales reflexiones en  $2\theta = 16,19; 32,48$  y  $39,71^\circ$  corresponden a los planos (101), (113) y (024) de la paratacamita u oxiclورو de cobre ( $\text{Cu}_2\text{Cl}[\text{OH}]_3$ ) con estructura cristalina romboédrica. Este compuesto es una sal de color verde azulado que puede presentarse en cuatro estructuras polimórficas: atacamita, botalaquita, clinoatacanita y paratacamita [179]. También se observa un pico ancho cercano a los  $25^\circ$  el cual corresponde a la sílice amorfa ( $\text{SiO}_2$ ). Existen antecedentes de que el oxiclورو de cobre en

su forma cristalina botalaquita presenta actividad antibacterial contra el patógeno *Staphylococcus aureus* [179]. Además, se utiliza popularmente como fungicida.

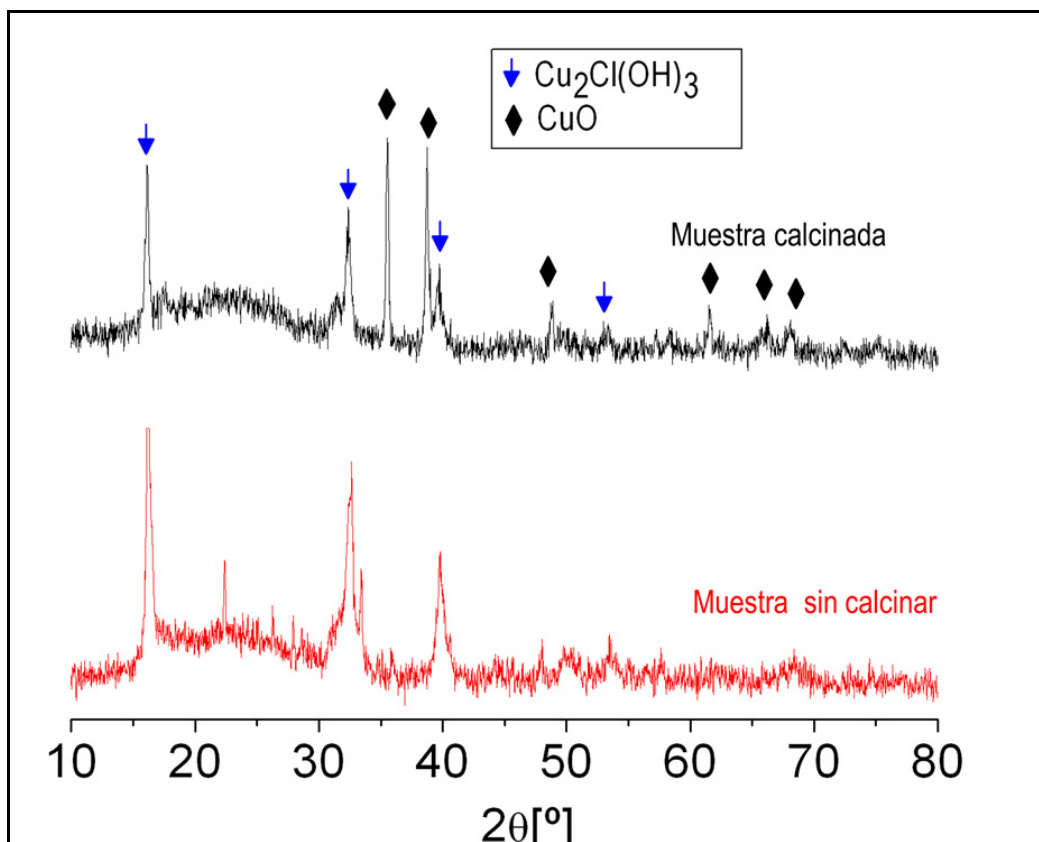


Figura 115. Difractograma del híbrido NPsCu/Si calcinado y sin calcinar.

En el difractograma de la muestra calcinada (Figura 115) se conservan las reflexiones asociadas al compuesto  $\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$  y se confirma la presencia de la fase  $\text{CuO}$  cuyas reflexiones principales  $2\theta=35,33; 38,68$  y  $48,74^\circ$  corresponden a los planos (-111), (111) y (-202) del óxido cúprico que cristaliza en una estructura monoclínica o corresponden a los planos (11-1), (111) y (20-2) de la estructura cristalina llamada Tenorita. Al someter la muestra a una alta temperatura, las señales de la paratacamita fueron menos intensas y más estrechas lo que significa que parte del compuesto  $\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$  fue reducido a  $\text{CuO}$ .



Figura 116. Imagen de A) nanopartículas híbridas de NPsCu/Si sin calcinar y B) nanopartículas híbridas de NPsCu/Si calcinadas.

Los resultados obtenidos por difracción concuerdan con la coloración de los polvos (Figura 116) las nanopartículas híbridas sin calcinar adoptan la coloración verde azulado del compuesto  $\text{Cu}_2\text{Cl}[\text{OH}]_3$ , mientras los polvos calcinados contienen una mezcla de colores, el verde azulado se combina con el negro característico del  $\text{CuO}$ .

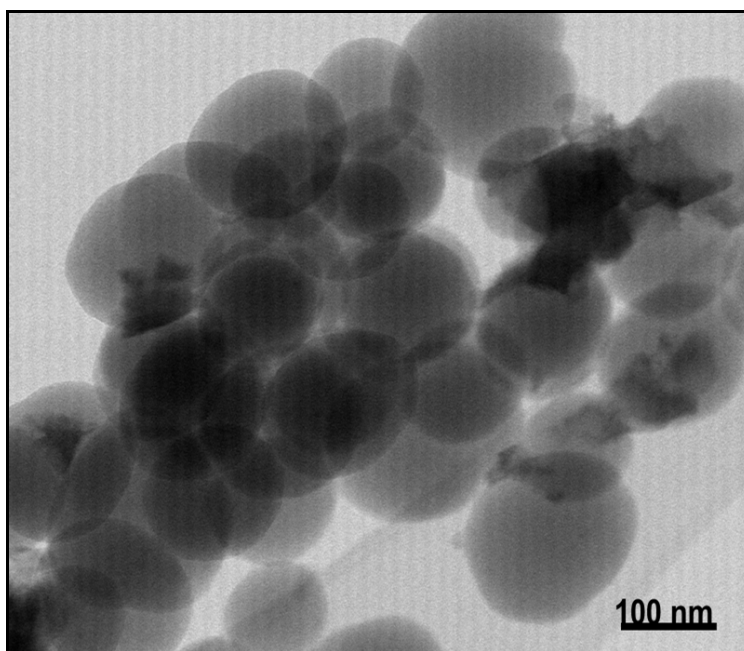


Figura 117. Imagen TEM de NPsCu/Si calcinadas a  $400^\circ\text{C}$  por 4 h.

En la imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de la muestra calcinada se observa un cambio drástico en la morfología superficial. Un crecimiento de los aglomerados a causa de su posible coalescencia. Este comportamiento puede ser atribuido a la Temperatura de Tamman [64], que se define como la mitad de la temperatura de fusión:

$$T_T = 0,5 T_f$$

**Ecuación 13**

Calentar los metales por sobre su Temperatura de Tamman ( $T_T$ ) favorece su sinterización<sup>14</sup>. La  $T_T$  del CuO es 600°C, no obstante, al tratarse de nanopartículas su temperatura de fusión decrece drásticamente. El oxiclورو de cobre tiene una temperatura de fusión de 220°C, mientras que la sílice tiene gran resistencia térmica (punto de fusión: 1400-1600°C). Calcinarse a 400°C se explicaría la presencia de clústeres descamados de la superficie de la SiO<sub>2</sub>.

Un posible mecanismo para la descamación se sugiere en la Figura 118 basado en lo reportado por Tang y colaboradores [180] para la descamación de nanopartículas de plata soportadas en sílice. Inicialmente, los compuestos nanométricos están firmemente enlazados a la superficie de la sílice, pero con el incremento de la temperatura, la superficie de estos compuestos se funden, formando una estructura tipo *core-shell*, con un centro sólido y una superficie líquida. Entonces, decrece el contacto entre la capa líquida de los compuestos y la superficie sólida de la sílice amorfa debido a la no mojabilidad. Finalmente, los compuestos descamados se sinterizan.

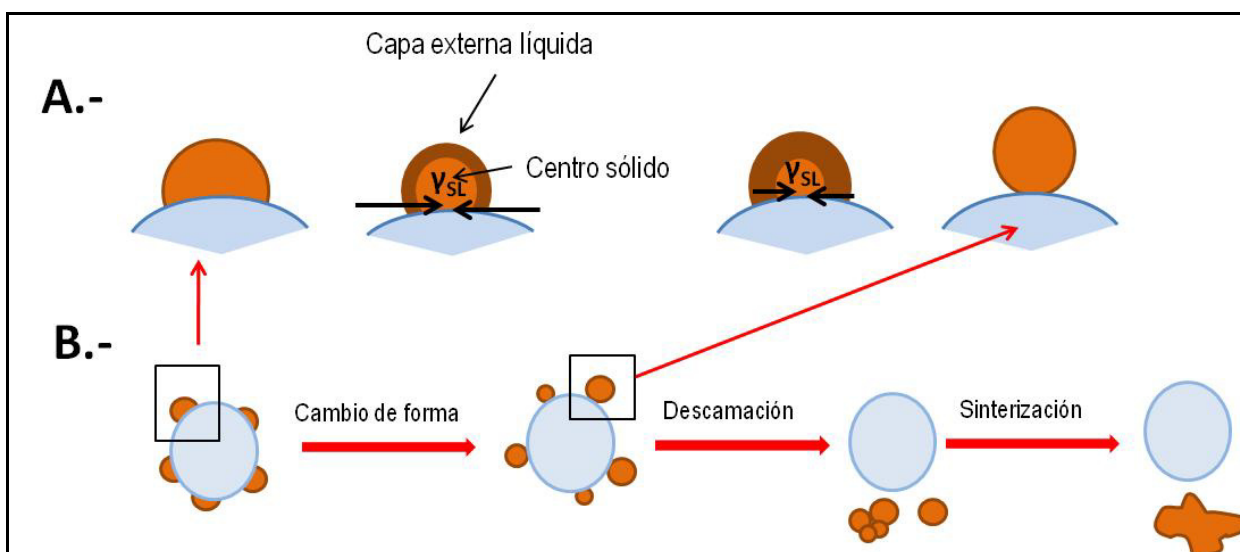


Figura 118. Esquema de la evolución de forma y descamación de los compuestos soportados.

A) Cambio de forma de los compuestos soportados; B) Sinterización de los compuestos soportados.

Siendo  $\gamma_{sl}$  la tensión tangencial de interface entre tres fases: fase líquida de los compuestos, fase sólida de los compuestos y fase sólida de la sílice.

En conclusión, los compuestos soportados en sílice presentan una temperatura de fusión menor a 400°C. Esta temperatura conduce a la descamación de estos compuestos, a un cambio en su forma desde partículas semiesféricas a grandes partículas irregulares y a un cambio en su composición química.

<sup>14</sup> Las partículas coalescen por difusión al estado sólido a muy altas temperaturas, pero por debajo del punto de fusión. En el proceso, se produce difusión atómica entre las superficies de contacto de las partículas, lo que provoca que resulten químicamente unidas.

### 8.1.2.-Estudio de la liberación de iones desde las partículas

Se cuantifico la liberación de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) desde la muestra sin calcinar en un ambiente controlado. Una cantidad de 0,05 g se vertió en 40 mL de agua desionizada. La Figura 119 muestra el porcentaje de iones liberados hasta un periodo de 17 días, también se incluye la curva de liberación desde nanopartículas de cobre metálico comercial de 20 nm, bajo las mismas condiciones.

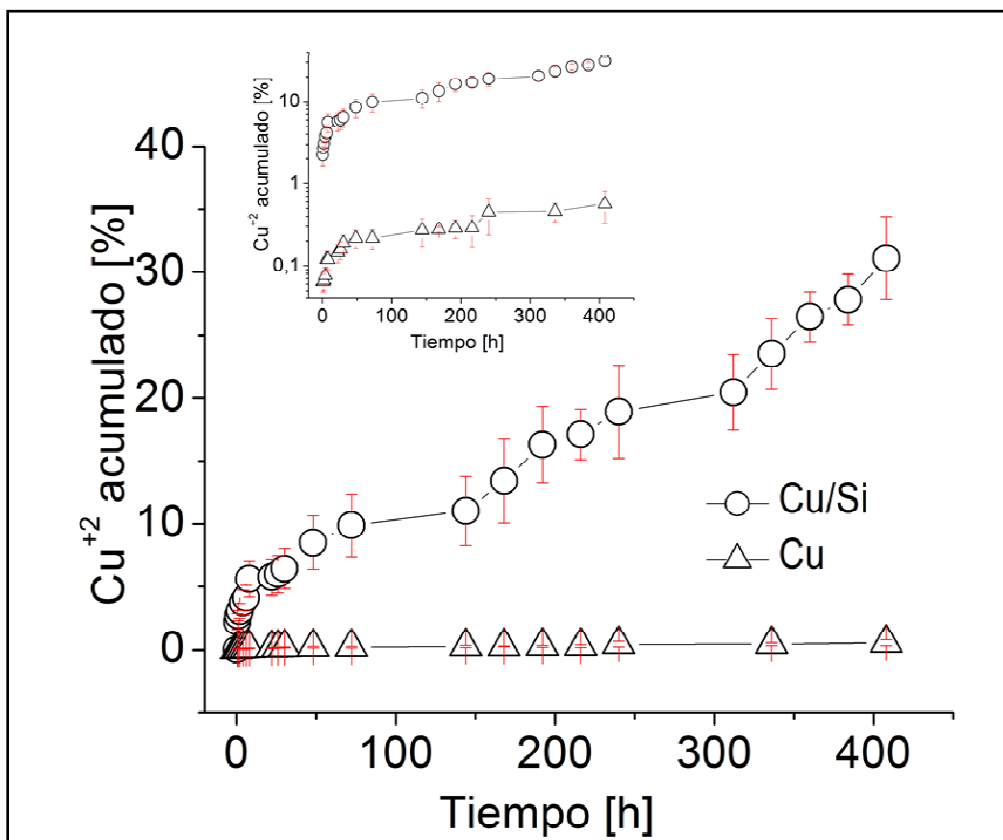


Figura 119. Porcentaje de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) liberados desde las partículas híbridas (Cu/Si) en función del tiempo, comparadas con las nanopartículas de cobre (Cu).

La Figura 119 representa el porcentaje de liberación acumulada de  $\text{Cu}^{+2}$  desde las muestras, expresado por la ecuación:

$$Cu^{+2}[\%] = ([Cu]_t/[Cu]_o) \times 100\% \quad \text{Ecuación 14}$$

donde  $[Cu]_t$  es la concentración de iones disueltos acumulados hasta el tiempo  $t$  y es  $[Cu]_o$  la concentración de cobre inicial de las muestras.

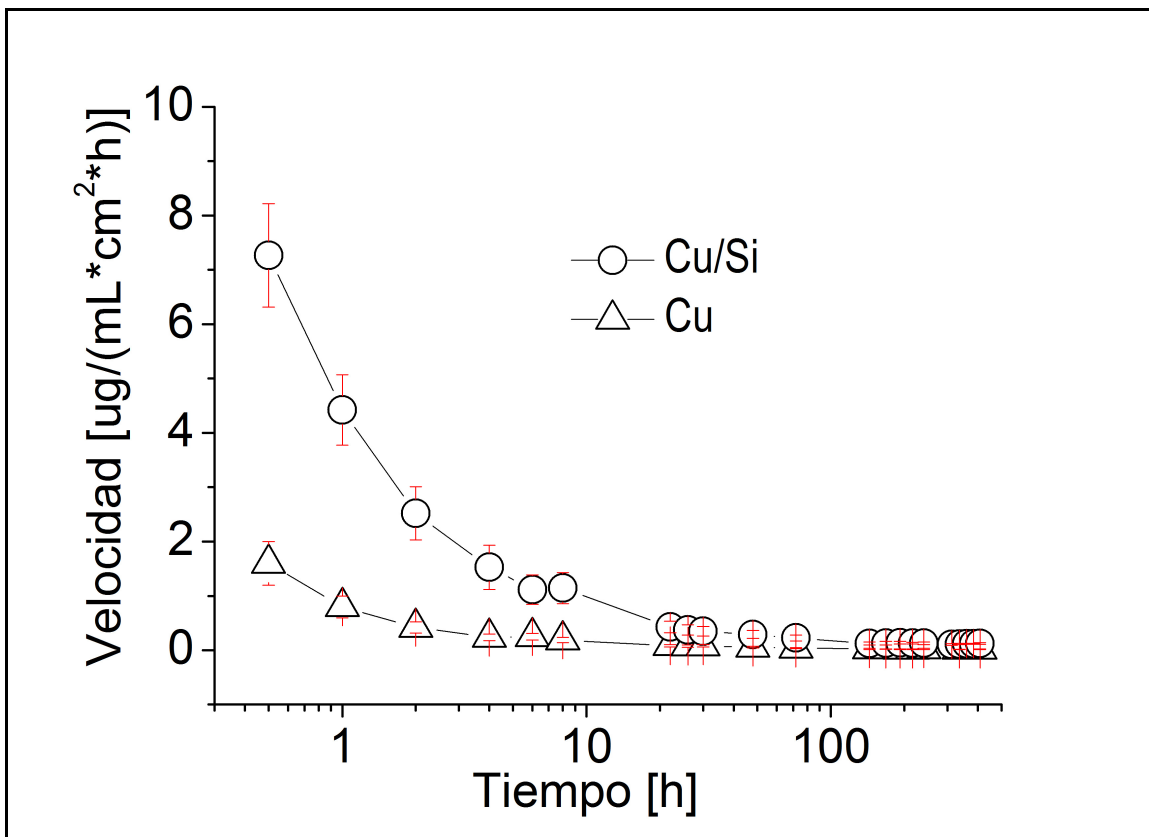


Figura 120. Velocidad de liberación de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) acumulados desde las partículas híbridas (Cu/Si) en función del tiempo, comparadas con nanopartículas de cobre (Cu).

Desde la Figura 119 se infiere que la liberación desde el híbrido incrementa rápidamente con el incremento del tiempo de inmersión hasta liberar un 30% de su contenido de cobre a las 400 horas (aprox. 17 días), mientras que las nanopartículas muestran una liberación muy lenta, liberando sólo el 0,5% durante el mismo período. Este comportamiento se debe a la diferencia en los mecanismos de formación de iones de cobre. El compuesto  $\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$  tiene una solubilidad en agua de 1,19 mg/mL a pH 6,6 (siendo más soluble a pH ácidos), mientras que el cobre en estado metálico (estado de oxidación cero) necesita de un proceso de corrosión de varias etapas, para liberar los iones cúpricos. Por otro lado, la sílice es un material hidrófilo, que favorecería el contacto del agua con la sal que soporta. Esto se confirma en la gráfica de velocidad *versus* tiempo (Figura 120), donde claramente existe una rápida disolución de la sal de cobre durante las primeras horas de exposición en el agua (aprox. 6 veces más rápida), pero ambas muestras tienden a una velocidad constante luego de su primer día de inmersión.

### 8.1.3.-Estudio de la liberación de iones desde los compósitos

Previamente, se ha reportado que la nano sílice en Polipropileno (PP) no tiene buena dispersión debido a la fuerte interacción de las nano esferas de naturaleza hidrofílica, a diferencia de la pobre interacción que tienen con la matriz hidrofóbica de PP [181]. Por ello se elaboraron nanocompósitos con 1% en volumen de NPsCu/Si previamente secadas al vacío por 3 horas a 170°C y sin secar, de manera de observar los efectos del pre-tratamiento de secado en la formación de aglomerados (Figura 121).

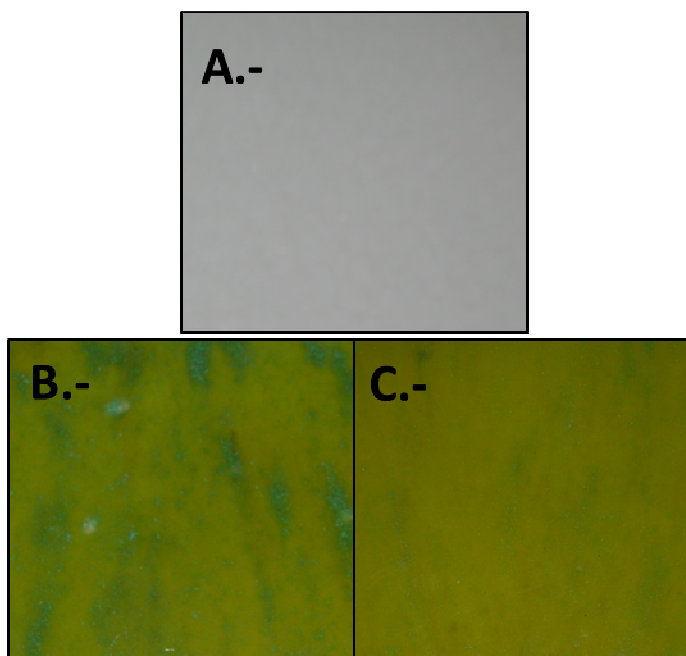


Figura 121. Imágenes de A) PP puro; B) PP con 1volumen de NPsCu/Si sin secar y C) PP con 1% en volumen de NPsCu/Si pre-secadas.

Evidentemente, se observa que al agregar nano partículas híbridas sin secar a la matriz de Polipropileno, el nanocompósito presenta graves problemas de aglomeración (Figura 121.B). Como consecuencia de la mala dispersión, disminuye el área disponible para la liberación de cobre. Por ello, para el estudio se escogió el nanocompósito elaborado con las partículas pre-secadas.

Se estudió el patrón de XRD (Figura 122), para corroborar si se formaron nuevas fases cristalinas debido al cambio en la coloración del relleno. Se nota que a excepción de los picos del Polipropileno (PP), el resto de las reflexiones son anchas denotando que el nanocompósito tiene un relleno muy poco cristalino. Se mantienen los picos de la paratacamita ( $\text{Cu}_2\text{Cl}[\text{OH}]_3$ ), lo que significa las partículas son estables durante el procesamiento y que el nuevo compuesto es el resultado de una mezcla del PP con el relleno híbrido. Sin embargo, existen otras reflexiones que podrían asociarse a cobre cero (Cu), aunque son poco intensos y muy anchos.

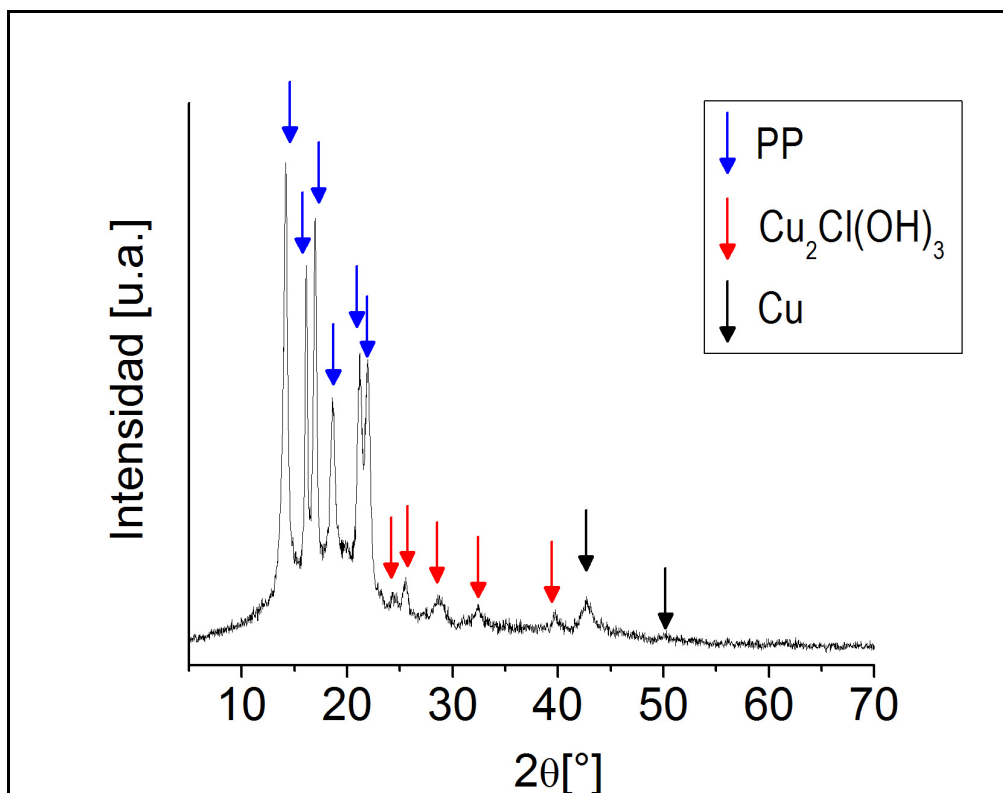


Figura 122. Difractograma de PP con 1% en volumen de NPsCu/Si secadas.

Se midió la liberación de iones desde el nanocompósito de Polipropileno (PP) con 1% en volumen de NPsCu/Si y se le comparó con el que contenía 1% en volumen de NPsCu comerciales. Placas de  $3 \times 2 \text{ cm}^2$  y 1 mm de espesor fueron sumergidas en 40 mL de agua desionizada durante 10 días.



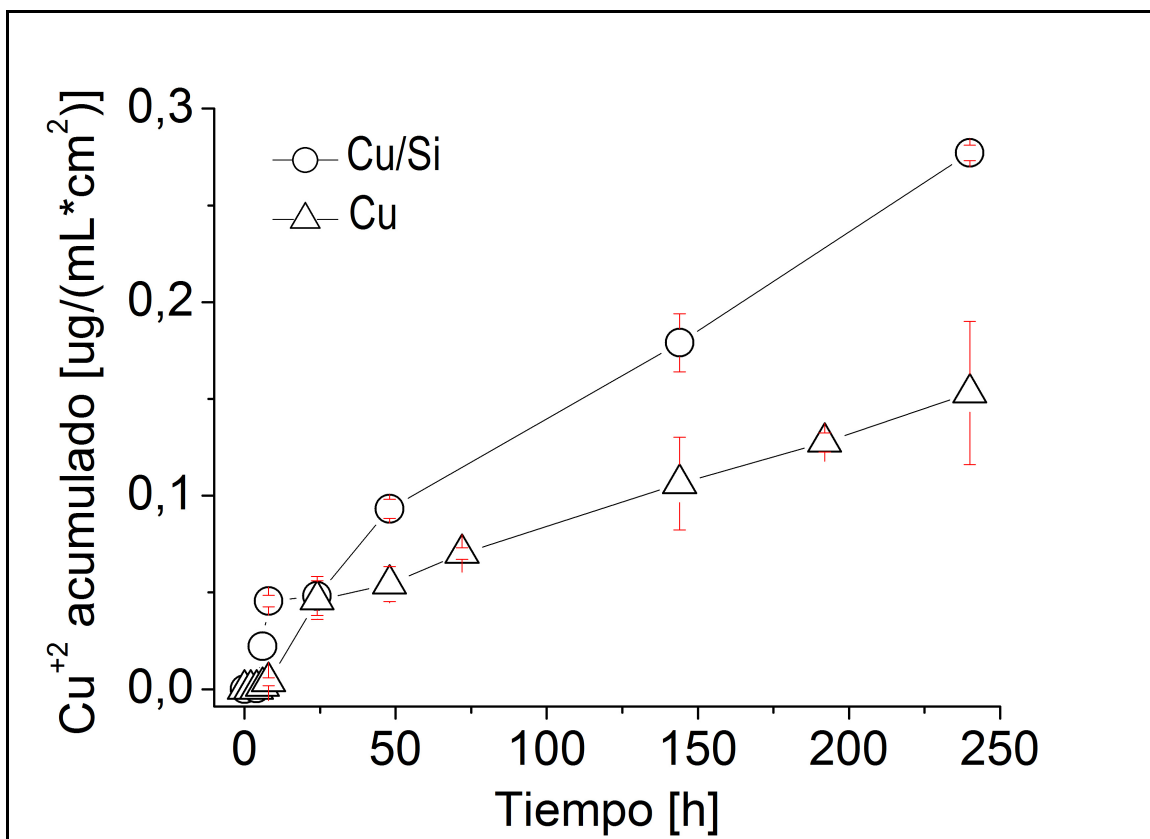


Figura 123. Iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) liberados desde 1% en volumen de partículas híbridas (NPsCu/Si) embebidas en PP en función del tiempo, comparadas con 1% en volumen de nanopartículas de cobre (NPsCu) embebidas en PP.

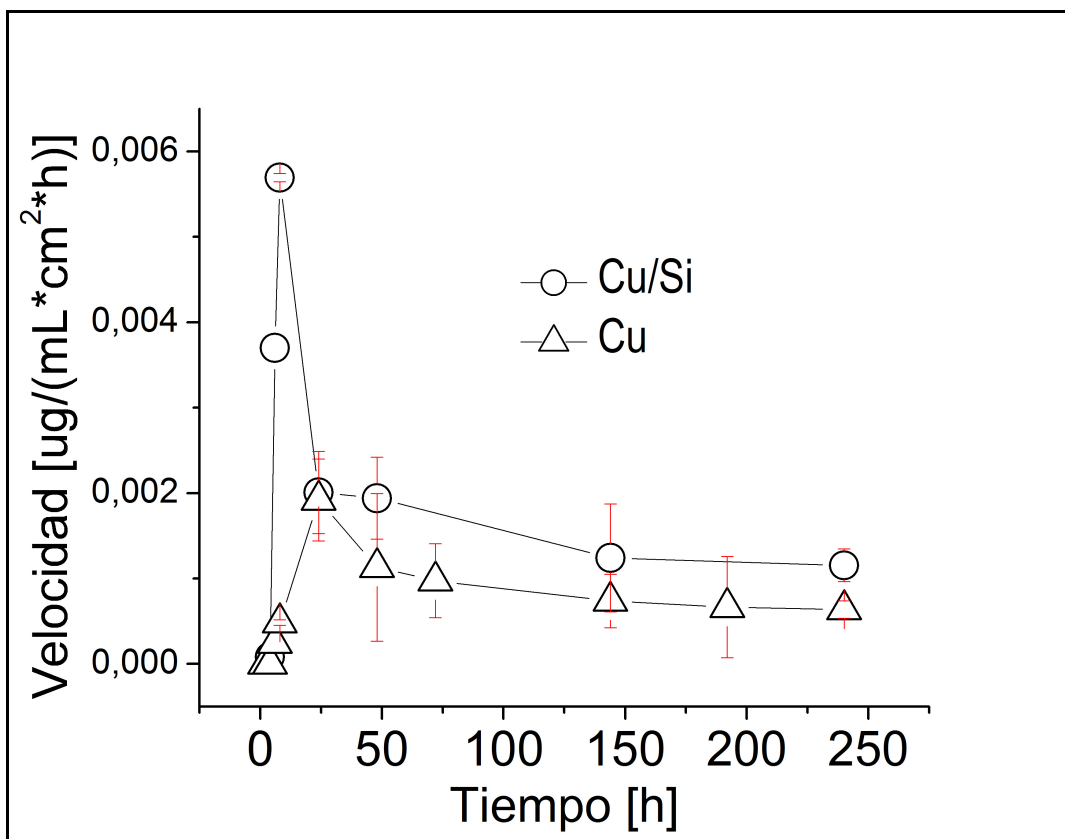


Figura 124. Velocidad de liberación de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) de 1% en volumen de partículas híbridas (NPsCu/Si) embebidas en PP en función del tiempo, comparadas con 1% en volumen de nanopartículas de cobre (NPsCu) embebidas en PP.

Tal como en el caso de las partículas híbridas, el compuesto de PP con carga de NPsCu/Si muestra mejor desempeño en la liberación de iones que el PP con NPsCu, aun cuando este último tiene mayor contenido de cobre elemental (Figura 123 y Figura 124). En este caso, la diferencia se puede explicar debido a que el mecanismo de formación de iones cúpricos desde cobre metálico es más lento que la disociación del compuesto  $\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$ , como se demostró anteriormente. También es importante mencionar que la tasa de liberación disminuyó drásticamente en ambos casos en comparación con las partículas solas (sin una matriz), debido a que la matriz polimérica actúa como barrera de difusión. NPsCu/Si en PP libera un 6% con respecto a la partícula sola, mientras que NPsCu en PP libera un 15% con respecto a la partícula sola, luego de 240 h. A pesar de ello, las partículas híbridas presentan mayor liberación que las metálicas, promovidas en parte por el carácter hidrófilo de la sílice, que incita la difusión de mayor cantidad de agua a través de los espacios libres del polímero.

En resumen, 1) se obtuvieron partículas híbridas, conformadas por nanoestructuras de paratacamita soportadas en sílice nanométrica, 2) las nanoestructuras de paratacamita se dispersaron homogéneamente en la sílice, 3) con las partículas híbridas presecadas se obtiene un nanocompuesto de apariencia homogénea y 4) este nanocompuesto tiene mayor liberación de iones que PP relleno de nanopartículas de cobre. En vista de lo anterior, la actividad antimicrobial de PP relleno con las partículas híbridas sintetizadas

podría ser mejor que aquel PP relleno de nanopartículas de cobre, a causa de la mayor liberación de iones.

## 8.2.- NANOPARTÍCULAS DE COBRE FUNCIONALIZADAS SUPERFICIALMENTE (NP FUNC)

### 8.2.1.- Caracterización

La metodología utilizada para la funcionalización de las nanopartículas de cobre fue similar a la desarrollada por Anyaogu y colaboradores [153]. Se empleó cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) como precursor de átomos metálicos y n-Hexanotiol o HT ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{S}$ ) como estabilizador.

En presencia de metanol y ácido acético, las nanopartículas de cobre fueron preparadas por reducción de  $\text{CuCl}_2$  usando borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). Luego, una monocapa de HT se adsorbe químicamente mediante enlaces covalentes (quimisorción) a la superficie de las nanopartículas, como consecuencia de la pérdida del hidrógeno por parte del grupo sulfuro de hidrógeno ( $\text{HS}^-$ ), según se ilustra en la

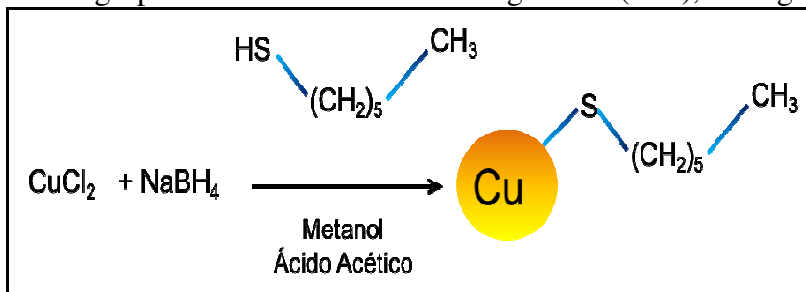


Figura 125:

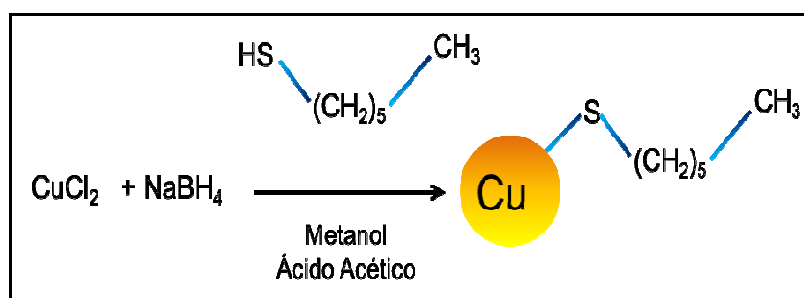
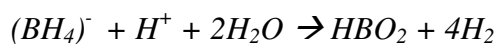


Figura 125. Esquema tentativo de la síntesis de NPsCu-F [153]

Esta síntesis permite la obtención de nanopartículas, debido a que el  $\text{NaBH}_4$  se oxida fácilmente en presencia de agua a una especie borato no reductor [182]:



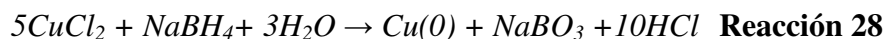
#### Reacción 27

La velocidad de oxidación del borohidruro es mayor que la reducción de los iones  $\text{Cu}^{+2}$ , por ello las velocidades de nucleación son relativamente altas comparadas con las

velocidades de crecimiento y como resultado se produce gran cantidad de partículas de pequeño tamaño.

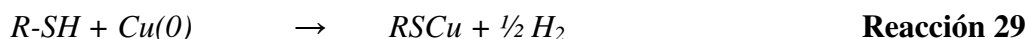
Para la síntesis del coloide de Cu se propone el siguiente mecanismo:

1) **Reducción del  $\text{CuCl}_2$**

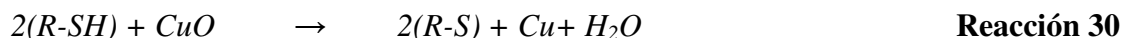


2) **Absorción del *n*-Hexanotiol [183]:**

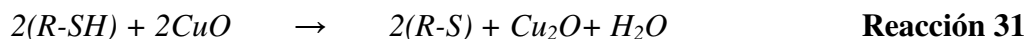
Para el caso de  $\text{Cu}(0)$ , la adición de los tioles se produce por la eliminación del hidrógeno terminal :



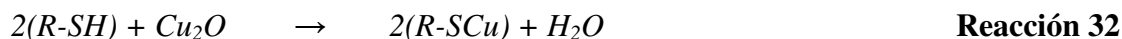
Si el cobre está pasivado, es decir, cubierto por una capa de  $\text{CuO}$ , los tioles no se absorben directamente en la superficie del óxido. Primero, se disminuye la capa de óxido con la formación de un di-sulfuro, siguiendo la reacción:



O mediante la reacción:



Esta reacción continúa hasta reducir toda la capa de  $\text{CuO}$ , luego la monocapa de tioles se absorbe según la reacción:



El objetivo de la modificación superficial es evitar la formación de aglomerados de nanopartículas utilizando el principio de repulsión estérica y, además, generar una protección para evitar la corrosión del cobre. La repulsión estérica se produce cuando se aproximan partículas que poseen una barrera física a su alrededor. Esta barrera está constituida por una capa de macromoléculas adsorbidas en la superficie (Figura 126).

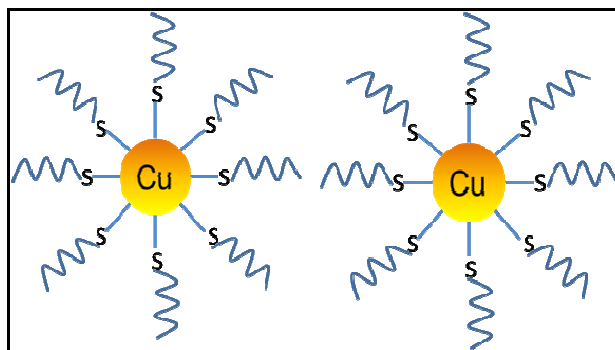


Figura 126. Representación de la repulsión estérica de las NPs-Cu-F.

Las partículas fueron sintetizadas siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.1.2 y finalmente se caracterizaron las *Func1*, *Func2* y la *Func3* (ver Tabla 14 del Capítulo Materiales y Métodos).

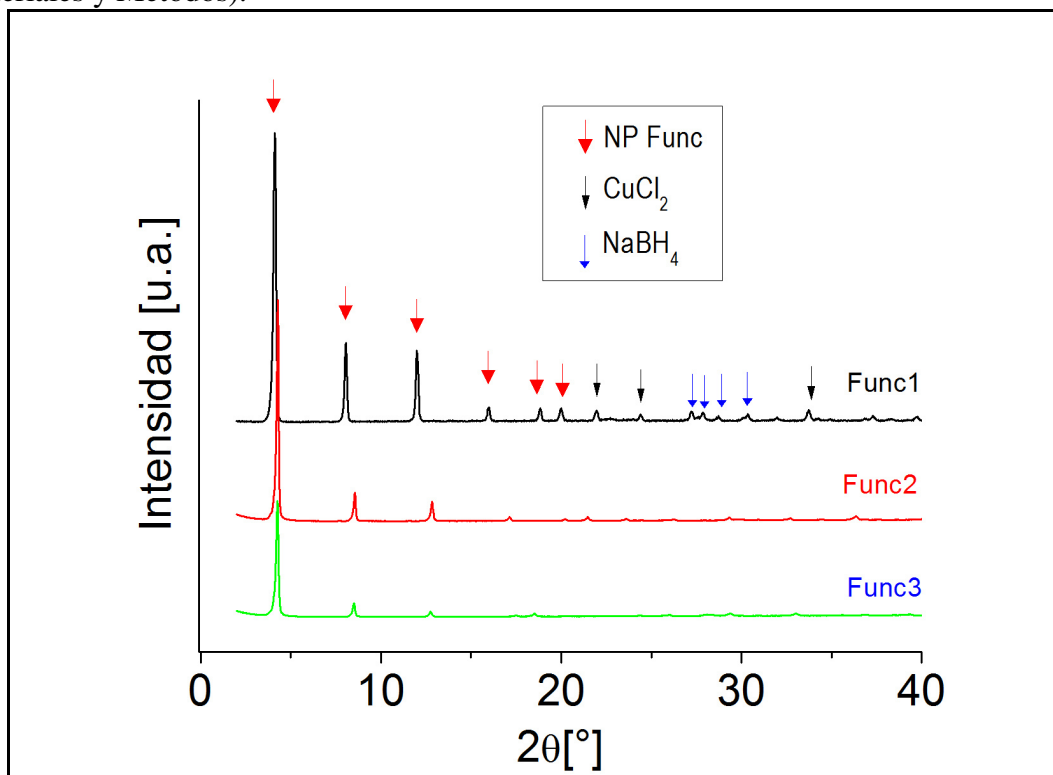


Figura 127. DRX de nanopartículas de cobre funcionalizadas superficialmente por n-Hexanotiol. *NP Func*: nanopartículas de cobre funcionalizadas superficialmente.

En las tres muestras se encontraron reflexiones de Bragg a bajo ángulo, según se observa en la Figura 127. Estos picos son indexados a la ordenación de los clústeres de nanopartículas funcionalizadas, que da lugar a una celda unidad de mayor tamaño y menor simetría, llamada súper-red o súper celda. Su formación es atribuida a la intercalación de las cadenas de hexanotioles adsorbidas sobre los clústeres de cobre contiguos, es decir, se produce un arreglo periódico de clústeres funcionalizados a causa de la repulsión de las cadenas de hexanotioles vecinos (Figura 128) y aumenta la distancia interplanar. En la

**Tabla 41** los principales picos pueden ser indexados a una celda cúbica centrada en las caras (FCC) [153,183,184,185,186]

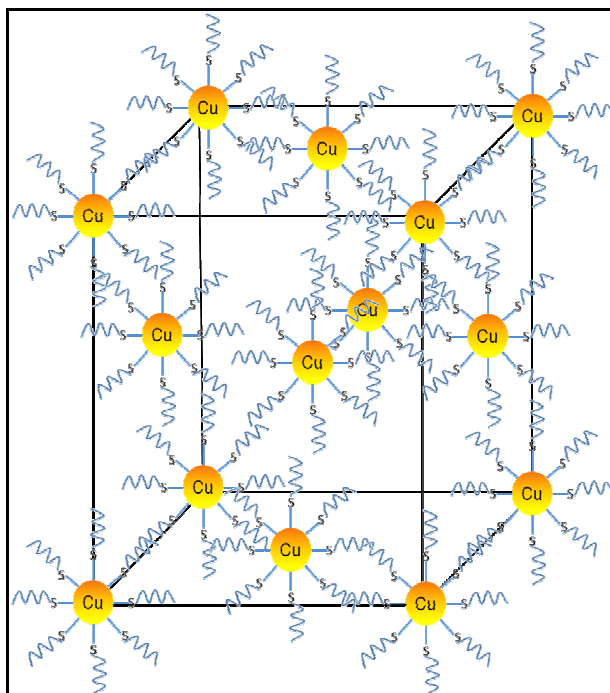


Figura 128. Esquema posible de una súper red FCC de nanopartículas funcionalizadas.

Tabla 41. Indexación de los picos de Bragg a bajo ángulo de las funcionalizaciones Func1, Func2 y Func3 [153,183,184,185,186].

Func1				Func2				Func3			
2θ	h	k	l	2θ	h	k	l	2θ	h	k	l
4,09	2	2	2	4,25	2	2	2	4,18	2	2	2
8,13	3	3	3	8,53	3	3	3	8,56	3	3	3
11,9	7	1	0	12,89	7	1	0	12,72	7	1	0

Por otro lado, no se detectaron los picos de la celda FCC del cobre metálico ni picos de óxidos de cobre. Esto podría deberse a la formación compacta de una monocapa de Hexanotioles sobre los nanoclusters de cobre. Como consecuencia, se formaría una estructura tipo *core-shell*, con un núcleo inorgánico de cobre y un recubrimiento orgánico de tioles.

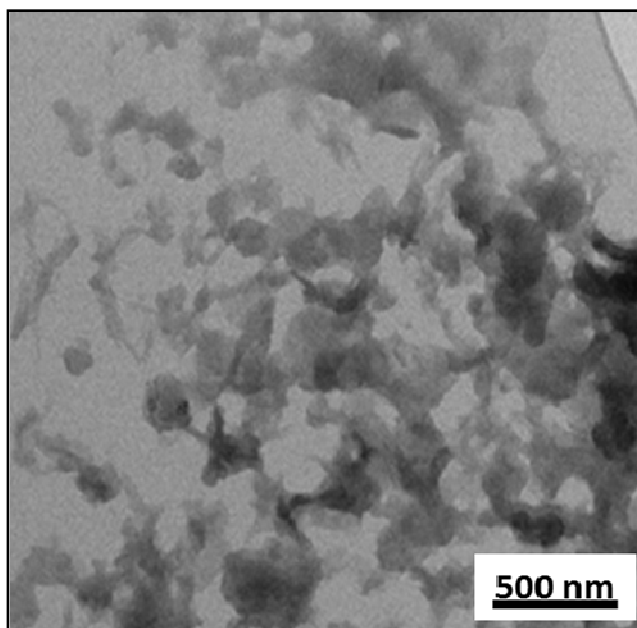


Figura 129. Imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de *Func3*.

En la Figura 129 se muestra la imagen de la *Func 3* en escala nanométrica. Se observa que las partículas se encuentran muy agregadas y no tienen una forma definida, ni tamaño regular. Esto podría hacer referencia a un exceso del recubrimiento orgánico, o hexanotioles, lo que se confirmaría por la ausencia de reflexiones asociadas a compuestos de cobre, según lo observado en el DRX de las *Func1*, *Func2* y *Func3*.

Un estudio anterior, señaló que sobre 180°C las monocapas de los alcanotioles se desorben completamente [183]. Por ello, para determinar la presencia de cobre en las funcionalizaciones, se realizó la calcinación de las muestras a una temperatura de 500°C durante dos horas (ver Tabla 42).

Tabla 42. Porcentaje de inorgánico en las partículas funcionalizadas.

Muestra	Masa inicial [g]	Masa final [g]	Inorgánico [%]
Func1	0,504	0,212	42,1
Func2	0,085	0,027	31,8
Func3	0,508	0,253	49,8

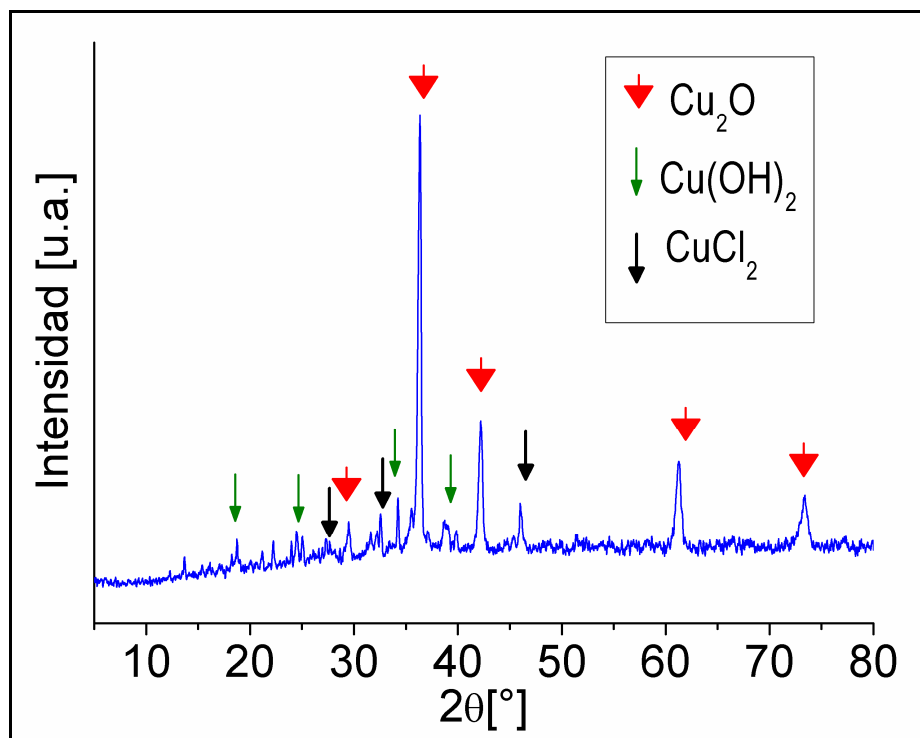


Figura 130. Difractograma de la Func3 calcinada.

Para el análisis DRX se escogió la muestra *Func3* calcinada debido a la escasa presencia de reactivos sin reaccionar (según Figura 127). A través del difractograma se identificó un óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) y los compuestos hidróxido de cobre ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) y cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ). Luego, y de acuerdo al difractograma y los resultados de la calcinación, es posible reafirmar que compuestos de cobre se encuentran recubiertos por cadenas orgánicas del hexanotiol.

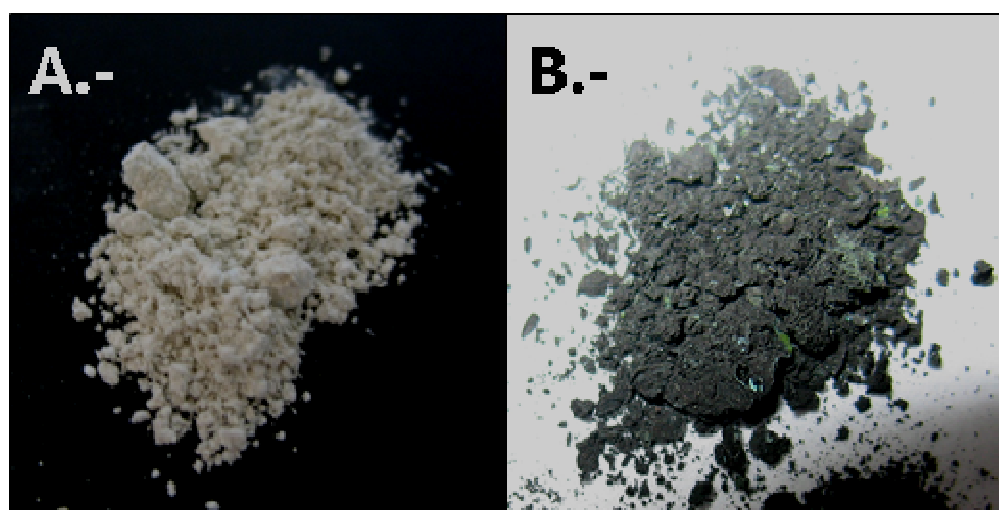


Figura 131. Polvos correspondientes a: A) Muestra *Func 3* y B) Muestra *Func 3* calcinada.



La coloración de los polvos de la muestra *Func3* antes y después de calcinar (Figura 131) coincide con los estudios de DRX. Como se aprecia inicialmente, los polvos son de coloración blanca comprobando que los tioles recubren los compuestos de cobre. Luego de la calcinación se aprecia una coloración verdosa amarillenta correspondiente a  $\text{CuCl}_2$  sin reaccionar, sin embargo es menos obvia la presencia de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  de color azul pálido y el rojo-violeta del  $\text{Cu}_2\text{O}$ , por lo que las proporciones de ambos compuestos deberían ser bajas.

#### 8.2.2.- Estudio de la liberación desde las partículas

Se cuantificó la liberación de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) durante 10 días desde la muestra *Func3* y se comparó con las NPsCu comerciales de 20 nm. Una cantidad de 0,05 [g] se vertió en 40 mL de agua desionizada a temperatura ambiente.

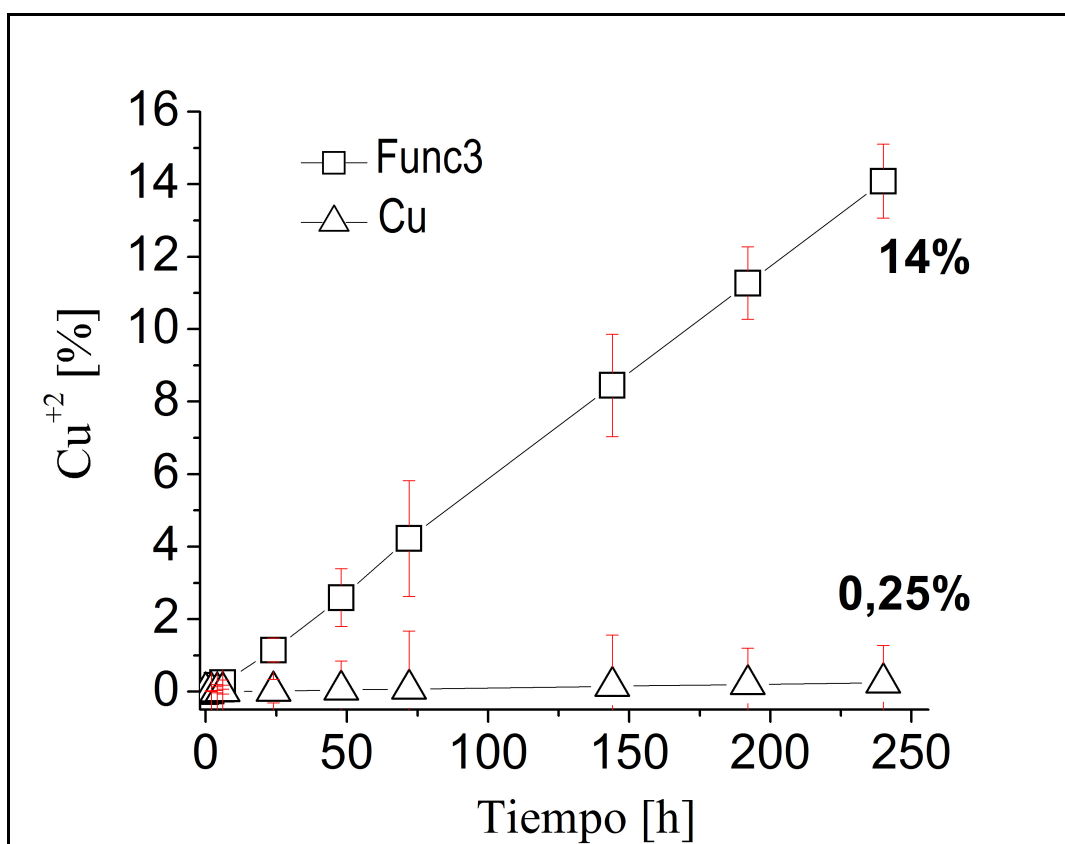


Figura 132. Porcentaje de iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) liberados desde las partículas funcionalizadas (Func3) en función del tiempo, comparadas con las nanopartículas de cobre (Cu).

La Figura 132 representa el porcentaje de liberación acumulada de  $\text{Cu}^{+2}$  desde las muestras. Se puede apreciar que la liberación de cobre desde ambos tipos de partículas es continua hasta las 250 h (día 10). La liberación desde las partículas *Func3* se acrecienta velozmente hasta liberar un 14% de su contenido de cobre *versus* sólo el 0,25% de la liberación de las nanopartículas de cobre (NPsCu) bajo las mismas condiciones. A pesar de que la muestra *Func3* se encuentra recubierto por material orgánico (tioles), la liberación de iones confirma que poseen cobre en su interior.

### 8.2.3.- Estudio de la liberación desde los compósitos

Se elaboraron nanocompósitos con 1% en volumen de la muestra *Func3* (Figura 133). Las imágenes muestran un cambio en la coloración de la matriz original de PP, tornándose en un compuesto salmón-café, que no corresponde a la coloración blanca original de las *Func3* utilizadas como relleno. Esto ocurriría porque el mezclado por fundido se realiza a 190°C y sobre los 180°C las mono-capas de los tioles se desorben [182]. Por otro lado, es muy importante notar que no se aprecian aglomerados y la coloración es homogénea en toda la muestra.

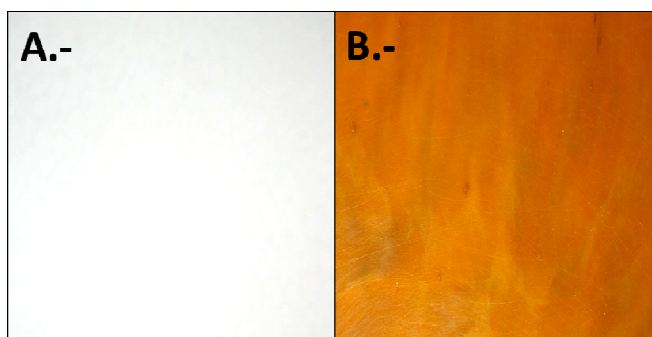


Figura 133. Imágenes de A) PP puro y B) PP con 1% en volumen de la muestra *Func 3*.

En el patrón DRX del nanocompósito no se identifican nuevas fases cristalinas (Figura 134), los peaks corresponden a Polipropileno y a las nanopartículas funcionalizadas, según el trabajo de Anyaogu y colaboradores [153].

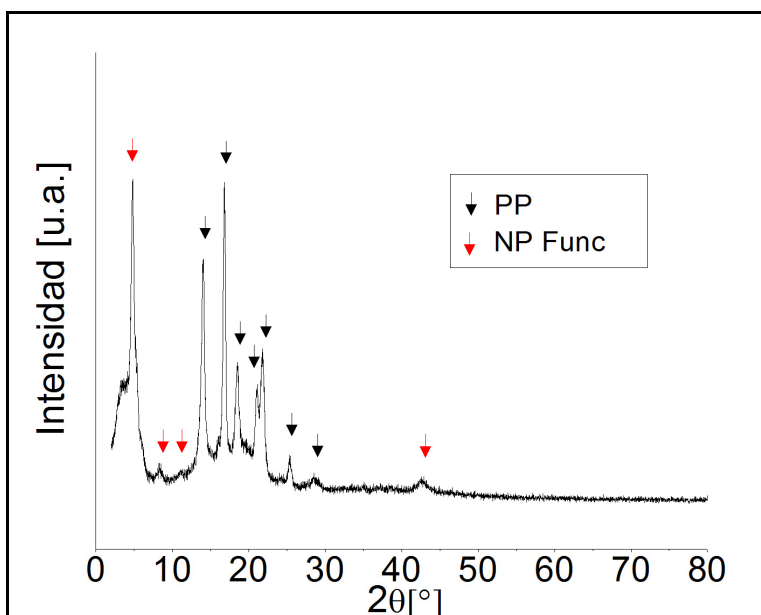


Figura 134. Difractograma del nanocompósito polimérico con 1% en volumen de NP *Func 3*.

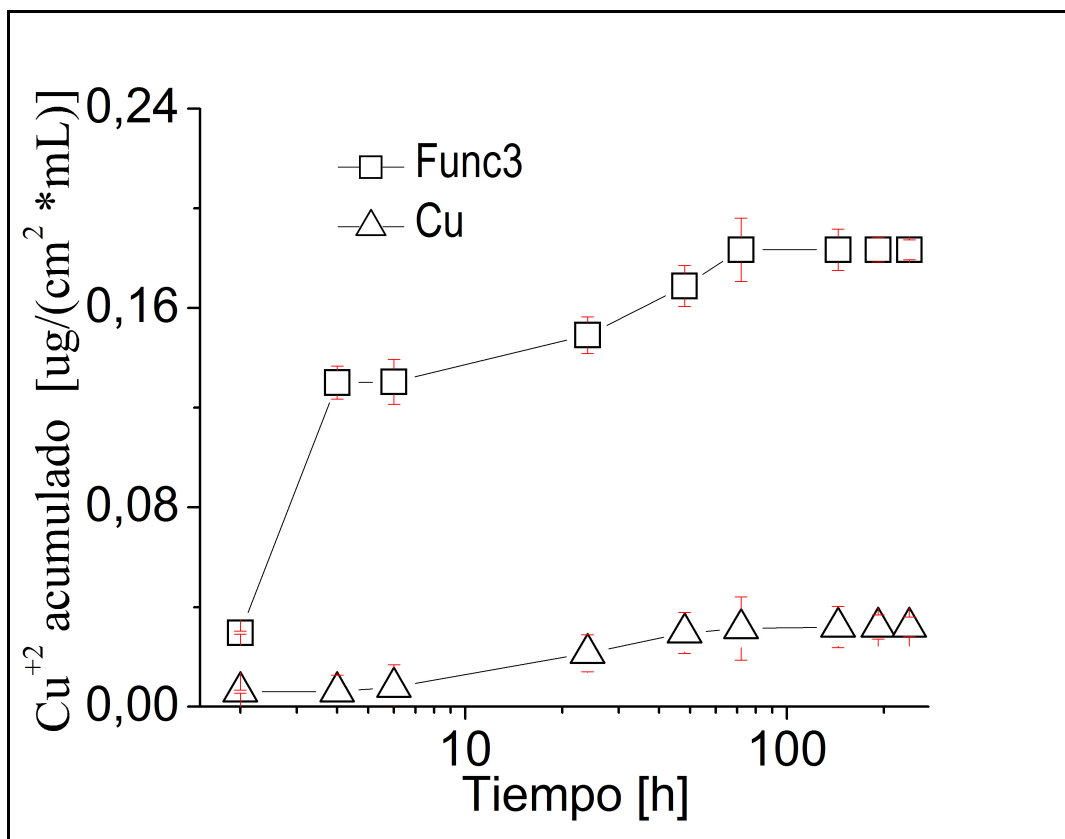


Figura 135. Iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ) liberados desde 1% en volumen de partículas funcionalizadas (Func3) embebidas en PP en función del tiempo, comparadas con 1% en volumen de nanopartículas de cobre (Cu) embebidas en PP.

La Figura 135 muestra los perfiles de liberación de iones en el tiempo de los nanocompuestos con partículas funcionalizadas y con nanopartículas de cobre comerciales. Es claro que las partículas funcionalizadas embebidas en PP exhiben mayor liberación. Esto sucede porque, como se ha explicado por el análisis de DRX, las partículas funcionalizadas contienen sales de cobre, las cuales se disocian en iones en forma más rápida.

En síntesis, partículas funcionalizadas embebidas en PP muestran un perfil de liberación de iones mayor a las que tienen nanopartículas de cobre comerciales en PP. Las partículas funcionalizadas mostraron buena dispersión dentro de la matriz (Figura 133) a causa de: 1) la repulsión estérica de los HT que recubren a los compuestos de cobre y 2) la compatibilidad de las cadenas poliméricas con los HT, ambos de naturaleza apolar. Lo anterior se confirmó al demostrar que libera más de iones que el compuesto con nanopartículas de cobre comerciales. En vista de lo anterior, es posible concluir que polímeros rellenos con partículas funcionalizadas tienen mejor actividad antimicrobial, que aquellos rellenos con nanopartículas de cobre.

## CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación, se puede concluir que:

- Polipropileno (PP) con nanopartículas de cobre metálico (NPsCu), con nanopartículas de óxido de cobre (NPsCuO) o con micropartículas de cobre metálico (MPsCu) tienen actividad antibacteriana frente a las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Estos nanocompuestos eliminan hasta el 99,9% de las colonias bacterianas en un intervalo de 90 a 240 min de exposición. Su actividad antibacteriana depende de la bacteria, además del tamaño, tipo y contenido del relleno.
- Polipropileno (PP) con nanopartículas de cobre metálico (NPsCu) o con nanopartículas de óxido de cobre (NPsCuO) presentan actividad *antifouling*. PP con NPsCu disminuyen el *biofouling* hasta en un 90%, mientras que PP con NPsCuO exhiben una reducción de hasta un 30%. Todos los nanocompuestos fueron inmersos en el mar durante dos meses.
- La actividad antibacteriana y *antifouling* se relaciona con la capacidad de liberar iones cúpricos ( $\text{Cu}^{+2}$ ). Bajo las mismas condiciones, PP con NPsCu exhiben mayor liberación de iones que PP con NPsCuO, y por lo tanto mayor actividad biocida.
- Se lograron sintetizar partículas híbridas formadas por nanoestructuras de paratacamita ( $\text{Cu}_2\text{Cl}[\text{OH}]_3$ ) soportadas en sílice nanométrica (NPsCu/Si), estas partículas no se dispersan bien en PP. También, se sintetizaron partículas híbridas formadas por compuestos de cobre funcionalizados superficialmente con cadenas orgánicas de tioles (NP Func), estas partículas presentan buena dispersión en PP. Ambas partículas híbridas, puras o embebidas en PP, tienen alta liberación de cobre. La liberación de partículas basadas en cobre incrementa en el siguiente orden: NPsCuO, NPsCu, NPsCu/Si y NP Func.
- La liberación de iones desde los compósitos depende del tamaño del relleno de cobre y la matriz polimérica. Rellenos de cobre metálico nanométricos disponen de mayor área por unidad de volumen para la liberación de iones. Además, matrices hidrófilas o con bajo porcentaje de cristalinidad favorecen la liberación de iones, por su capacidad de absorber agua o contar con una gran zona amorfa que facilita el transporte de agua, oxígeno e iones, respectivamente.

En base a lo anterior, se concluye que compósitos formados por una matriz polimérica y nanopartículas en base a cobre presentan actividad antimicrobial y *antifouling*. Estos novedosos materiales pueden ser diseñados a la medida, escogiendo la matriz polimérica, el tipo de relleno en base a cobre y su cantidad, además pueden ser procesados convencionalmente.

Sus aplicaciones potenciales incluyen desde el reemplazo de superficies presentes en hospitales, como medida complementaria en la reducción de las Infecciones

Intrahospitalarias (IIIH), hasta la sustitución de estructuras plásticas expuestas en ambientes marinos, previniendo el *biofouling* marino.

## CAPÍTULO 10: BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] Galli, P., Vecellio, G. 2004. Polyolefins: The most promising large-volume materials for the 21st century. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, (42): 396-415.
- [2] Global Commercial Analysis: Polyolefins [En línea]  
<http://www.chemsystems.com> [Consulta: Noviembre 2012]
- [3] Mark, J. E. 2007. *Physical Properties of Polymer Handbook*. 2 ed. Estados Unidos. Springer.
- [4] Sastri, V.S. 2010. *Plastic in Medical Devices: Properties, Requirements and Applications*. Editor Elsevier. Estados Unidos.
- [5] NGP Europe. Polyolefins for use in medical devices [En línea]  
<http://www.ngphrama.eu.com>. [Consulta: Marzo 2012]
- [6] Portnoy, R.C. 2002. Polypropylene for Medical Applications. [En línea]
- [7] Kenawy, E., Worley, S.D., Broughton, R. 2007. The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review. *Biomacromolecules* 8(5): 1359- 1384.
- [8] Samuel, S.O., Kayode, O.O, Musa, O.I., Nwigwe, G.C., Aboderin, A.O., Salami, T.A.T., Taiwo, S.S. 2010. Nosocomial infections and the challenges of control in developing countries. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology* 11(2):102 -110.
- [9] Wilks, S., Michels, H., Keevil, C. 2005. The Survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *International Journal of Food Microbiology* 105 (3):445-454.
- [10] Brenner, P., Nercelles, P., Pohlenz, M. Otaíza, F. 2003. Costo de las infecciones intrahospitalarias en hospitales chilenos de alta y mediana complejidad. *Revista Chilena de Infectología* 20(4): 285-290.
- [11] Breur, R. 2001. *Fouling and Bioprotection of metals*. Holanda, TNO Industrial Technology.
- [12] Directorio de acuicultura y pesca [En línea]  
<http://www.directorioaqua.com> [Consulta: 10 enero 2012]

- 
- [13] Cisternas, F., Durán, G., Polgatiz, C., Weintraub, A. 2009. Programación Matemática para el Uso Eficiente de Mallas de Cultivo en una Empresa Salmonera. *Revista Ingeniería de Sistemas* 23: 27-47.
- [14] Dürr, S. y Thomason, J.C. 2010. *Biofouling*. Reino Unido, Blackwell Publishing Ltd.
- [15] Borkow, G., Gabbay, J. 2005. Copper as a biocidal tool. *Current Medical Chemistry* 12(18): 2163-2175.
- [16] U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries [En línea] <http://www.usgs.gov> [Consulta: 10 enero 2012]
- [17] Corporación Nacional de Cobre (CODELCO) [En línea] <http://www.codelco.cl> [Consulta: Octubre 2012]
- [18] Dreher, F., Harrison, B.J., Hostýnek, J.J., Maibach, H.I., Michels, H.T., Milanino, R., y colaboradores. 2006. Copper and Skind. En: Hostýnek, J.J., Maibach, H.I. (Eds.) *Informa Healthcare*. Nueva York, Londres, p. 1-289.
- [19] Damm, C., Münstedt, H., Rösh, A. 2007. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver-nanocomposites. *Journal of Material Science* 42: 6067-6073.
- [20] Comisión Chilena del Cobre <http://www.cochilco.cl> [Consulta: 01 agosto 2013]
- [21] Michels, H.T., Noyce, J.O., Keevil, C.W. 2009. Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper. *Letters in Applied Microbiology* 49:191-195.
- [22] United States Environmental Protection Agency (US EPA) [En línea] <http://www.epa.gov> [Consulta: 10 enero 2012]
- [23] Procobre-Centros de Promoción del Cobre [En línea] <http://www.procobre.cl> [Consulta: 05 marzo 2012]
- [24] Michels, H.T., Anderson D.G. 2007. The Antimicrobial Properties of Copper Alloys and their Potential Applications. *Proceedings of the Sixth International Copper-Cobre Conference* (1): 121-133.
- [25] Noyce, J.O., Michels, H., Keevil, C.W. 2006. Use of Copper Cast Alloys To Control *Escherichia coli* O157 Cross-Contamination during Food Processing. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6):4239-4244.

- 
- [26] Espirito Santo, C., N. Taudte, D. H. Nies, and G. Grass. 2008. Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:977-986.
- [27] Zhu , I. , Elguindi , J. , Rensing , C., Ravishankar, S. 2012. Antimicrobial activity of different copper alloy surfaces against copper resistant and sensitive *Salmonella enterica*. *Food Microbiology* 30 (1) 303-310.
- [28] Mikolay , A., Huggett, S., Tikana ,L., Grass, G., Braun, J.,Nies, D.H. 2010. Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial. *Applied Microbial and Cell Physiology* 87: 1875-1879.
- [29] Casey A.L., Adams, D.; Karpanen, T.J., Lambert P.A., Cookson, B.D., Nightingale, P., Miruszenko,L., Shillan, R., Christian , P.,Elliot, T.S.J. 2010. Role of copper in reducing hospital environment contamination. *The journal of hospital infection* 74(1):72-77.
- [30] Mehtar , S., Wiid, I., Todorov, S.D. 2008.The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. *The Journal of hospital infection* 68(1):45-51.
- [31] Espirito Santo, C. Wen Lam, E., Elowsky, C.G., Quantana, D. et al. 2011. Bacterial Killing by Dry Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 77(3): 794-802.
- [32] Warnes, S. L., Keevil C. W. 2011. Mechanism of Copper Surface Toxicity in Vancomycin-Resistant Enterococci following Wet or Dry Surface Contact. *Applied and Environmental Microbiology* 77(17): 6049-6059.
- [33] Warnes, S.L., Green, S.M., Michels, H.T. ,Keevil, C.W. 2010. Biocidal Efficacy of Copper Alloys against Pathogenic Enterococci Involves Degradation of Genomic and Plasmid DNAs. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (16) : 5390-5401.
- [34] BioMérieux . 2007. BioMérieux confirms its commitment to the fight against Hospital Acquired Infections. Press Releases [En línea]  
<http://www.biomerieux.com>
- [35] Klevens, R.M., Edwards, J.R., Richards ,C.L., et al. 2007 Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Report* 122:160-6.
- [36] Wenzel, R., Edmond, M. 2001. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerging Infectious Diseases Journal* 7:174-177



- 
- [37] Scott et al. 2009. Guidelines for Field Triage of Injured Patients Recommendations of the National Expert Panel on Field Triage National Center for Injury Prevention and Control (CDC) report.
- [38] Klevens , R.M., Morrison , M.A. Nadle, J. 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 298: 1763-1771.
- [39] Antimicrobial Copper  
<http://www.antimicrobialcopper.com>
- [40] Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg ,E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284:1318-22
- [41] CopperBioHealth  
<http://www.copperbiohealth.com>
- [42] Borkow, G. 2010. Copper oxide Impregnated Wound Dressing: Biocidal and Safety Studies. Wounds 22(12): 301-310.
- [43] Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology. 2002. Por Edward J. Massaro et al. Totowa, New Jersey, Humana Press.
- [44] Ahmed, Z., Idowu, B.D., Gall, S., Brown, R.A. 2004. Stabilization of cables of fibronectin with micromolar concentrations of copper: in vitro cell substrate properties. Biomaterials 25:803-812.
- [45] Superintendencia de Servicios Sanitarios (SISS) [En línea]  
<http://www.siss.gob.cl> [Consulta: 05 Noviembre 2012]
- [46] Oster, G., Oster, G.K. 1974. Free radical production by metallic copper. Contraception10:273-280.
- [47] Oster ,G.K.1972. Chemical reactions of the copper intrauterine device. Fertil Steril 23:18–23.
- [48] Trevors, J.T., Cotter, C.V. 1990. Review: Copper toxicity and uptake in microorganisms. Journal of Industrial Microbiology 6:77-84.
- [49] Brock Biología de los microorganismos. 2003. Por Michael T. Madigan “et al”. 10<sup>a</sup> ed. Madrid. Pearson.
- [50] Teitzel, G.M., Geddie,A., De Long, S.K., Kirisits, M.J., Whitlry,M., PArsek, M.R. 2006. Survival and Growth in the Presence of Elevated Copper: Transcriptional Profiling of Copper-Stressed *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology 188(20):7242-7256.

- 
- [51] Avery, S.V., Howlett, N.G., Radice, S. 1996. Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Applied Environmental Microbiology* 62 (11):3960-3966.
- [52] Lebedev, V.S., Veselovskii, A.V., Deinega, E., Fedorov, I. 2002. The role of reactive oxygen species in copper-induced permeability of plasma membranes in *Escherichia coli*. *Biophysics* 47:295-299.
- [53] Summers, A.O. y Silver, S. 1978. Microbial transformations of metals. *Annual Review Microbiology* 32: 637-672.
- [54] Francis, R. 2010. *The corrosion of Copper and Its Alloys: A Practical Guide for Engineers*. Texas, Press Nace.
- [55] Grass, G., Rensing, C., Soloiz, M. 2011, Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5): 1541-1547.
- [56] Omae, I. 2003. General Aspects of Tin-Free Antifouling Paints. *Chemical Reviews* 103:3431–3448.
- [57] 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. *Journal of Antimicrobial Agents* 33:587-90.
- [58] Midander K, Cronholm P, Karlsson HL, Elihn K, Möller L, Leygraf C, Wallinder IO. 2009. Surfaces Characteristics, Copper release, and Toxicity of Nano- and Micro- Sized Copper and Copper(II) Oxide Particles : A Cross-Disciplinary Study. *Small* 5:389-99.
- [59] Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M. 2007. Does the antimicrobial activity of silver nanoparticles depend on the shape of nanoparticles? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1712-1720.
- [60] Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., Yacaman, M.J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16: 2346- 2353.
- [61] Yoon, K., Byeon, J.H., Park, J. , Hwang, J. 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus Subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science Total Environmental* 373:572-575.
- [62] Zhang, N., Gao, Y., Zhang, H., Feng, X. , Cai, H., Liu, Y. 2010. Preparation and characterization of core-shell structure of SiO<sub>2</sub>@Cu antibacterial agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81:537-543.

- 
- [63] Xu, K., Wang, J.X., Kang, Chen, J.F. 2009. Fabrication of antibacterial monodispersed Ag-SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles with high concentration. *Material Letters* 63: 31-33.
- [64] Jeon, H., Yi, S., Oh, S. 2003. Preparation and antibacterial effects of Ag-SiO<sub>2</sub> thin films by sol-gel method. *Biomaterials* 24: 4921-4928.
- [65] Akhavan, O., Ghaderi, E., 2009. Bactericidal effects of Ag nanoparticles immobilized on surface of SiO<sub>2</sub> thin film with high concentration. *Current Applied Physics* 9 (6): 1381-1385.
- [66] Gelves, G., Lin, B., Haber, J., Sundararaj, U. 2008. Enhancing dispersion of copper nanowires in melt-mixed polystyrene composites. *Journal of Polymer Science :Part B:Polymer Physics* 46:2064-2078.
- [67] Ruparelia, J. P., Chatterjee, A.K., Duttgupta, S.P., Mukherji, S. 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia* 4:707-716.
- [68] Comisión Chilena del Cobre  
<http://www.cochilco.cl> [Consulta: 01 agosto 2013]
- [69] Nanostructured & Amorphous Materials, Inc.  
<http://www.nanoamor.com> [Consulta: 01 enero 2012]
- [70] Applied Nanotech, Inc.  
<http://www.appliednanotech.net> [Consulta: 01 enero 2012]
- [71] Fusetani, N., Clare, A. S.2006. *Antifouling compounds*. Berlin, Springer.
- [72] International Maritime Organization [En línea]  
<http://www.imo.org> [Consulta: 26 de enero 2013]
- [73] Silkina, A., Bazes, A., Vouvé, F., Le Tilly, V., Douzenel, P., Mouget J.L., et al. 2009. Antifouling activity of macroalgal extracts on *Fragilaria pinnata* (Bacillariophyceae): A comparison with Diuron. *Aquatic Toxicology* 94: 245 – 254.
- [74] Yebra D.M. et al. 2004.Review. Antifouling technology – past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50: 75-104.
- [75] Rajbir, S., Debarati, P., Rakesh K., J. 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *TRENDS in Microbiology* 14(9): 389-397.
- [76] Flemming, H.C. 1995. Sorption sites in biofilms. *Water Science and Technology* 32 : 27-33.

- 
- [77] Nazar, J. 2007. Biofilms bacterianos. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello* 67:61-72.
- [78] Characklis, W.G., Marshall, K.C. 1990. *Biofilms*. New York, Wiley.
- [79] Bitton, G., Marshall, K.C. 1980. *Adsorption of Microorganisms to Surfaces*. New York, Wiley.
- [80] Costerton, J.W., Geesey, G.G., Jones, P.A. 1988. Bacterial Biofilms in Relation to Internal Corrosion. *Monitoring and Biocide Strategies. Material Performance* 27(4): 49-53.
- [81] Bott, T.R. 1979. Biological fouling of heat transfer surfaces. *Effluent and Water Treatment Journal* 19 :453-461.
- [82] Efid, K.D. 1976. The interrelation of Corrosion and Fouling of Metals in Sea Waters. *Materials Performance* 15 (4):16-25.
- [83] Efid, K.D., Anderson D. 1975. Sea Water Corrosion of 90-10 and 70-30 Copper Nickel Alloys-14 Year Exposure. *Materials Performance* 14(11): 37-40.
- [84] Lennox, T.J., Peterson, M.H., Groover, R.E. 1971. De-alloying of copper alloys and response to cathodic protection in quiescent sea water. *Materials Protection and Performance* 10 (7):31-37.
- [85] Swain, G.W., Farrar, R.A., Hutton, S.P. 1982. The use of controlled copper dissolution as an anti-fouling system. *Journal of Materials Science* 17:1079-1094.
- [86] Banfield, T. 1980. Marine finishes: part 2. *Journal of the Oil and Colour Chemists Association* 69 : 93-100.
- [87] Polan, N. W. 1987. Copper and Copper Alloy in ASM handbook – Corrosion. Editores Davis, J. R., Destefani, J. D., ASM International, OH, pp. 610 -616.
- [88] Well, F.E. 1984. International copper research association .Project report 348.
- [89] Singh, N., Turner, A. 2009. Leaching of copper and zinc from spent antifouling paint particles. *Environmental Pollution* 157: 371-376.
- [90] Voulvoulis, N., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N. 1999. Review : Alternative antifouling biocides. *Applied Organometallic Chemistry* 13: 135-143.

- 
- [91] Sandberg, J., Odenvall, I., Leygraf, C., Virta, M. 2007. Release and chemical speciation of copper from anti-fouling paints with different active copper compounds in artificial seawater. *Materials and Corrosion* 58(3): 165-172.
- [92] Cieslewicz, J. M. and Schweitzer, P. A. 1989. Copper and Copper Alloys in Corrosion and Corrosion Protection Handbook, Ed. Schweitzer, P. A., Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 125 – 152.
- [93] ASM Handbook Corrosion. 1987. Por R. Ackerman et al. 9a ed. USA , ASM International. Vol 13.
- [94] Braun, M. , Nobe, K. 1973. Electrodeposition Kinetics of Copper in Acidic Chloride Solution. *Journal of the Electrochemical Society* 120 (10):1666-1670.
- [95] Leckie, H. P. 1970. The Anodic Polarization Behavior of Copper. *Journal of Electrochemical Society* 117 (12): 1479-1483.
- [96] Klein, P. A., Hays, R. A. , Ferrara, R. J. .1991. The Effect of Electrolytic Chlorination on the Crevice Corrosion Behavior of 70/30 Copper-Nickel and Nickel-Copper Alloy 400. Proc. Corrosion/91, the NACE Annual Conference and Corrosion Show, Cincinnati, Ohio.
- [97] Feng, Y., Siow, K.-S., Teo, W.K., Tan, K.L., Hsieh, A.K. 1997. Corrosion Mechanisms and Products of Copper in Aqueous Solutions at Various pH Values. *Corrosion* 53 (5):389-398.
- [98] Melchers, R. E. 2001. Temperature Effect on Seawater Immersion Corrosion of 90:10 Copper-Nickel Alloy. *Corrosion* 57 (5):440-451.
- [99] Beech, I.B. 2004. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms-current understanding and state-of-the art methods of study. *International Biodeterioration and Biodegradation* 53:177-183.
- [100] Beech, I.B., Sunner, J. 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology* 15:181-186.
- [101] Copper: Environmentak dynamics and Human Exposure Issues. 2001. Por P.G. Georgopoulos et al. New Jersey. The International Copper Association.
- [102] Scott, D.A. 2002 Copper and Bronze in Art, Corrosion, Colorants, Conservation, Getty Publications, Los Angeles.
- [103] Taylor, R.J., MacLeod ,I.D.1985. A Comparison of Corrosion Rates Deduced from Shipwreck Material and from Electrochemical Methods. *Corrosion* 41: 100-104.

- 
- [104] Bianchi, G., Fiori, G., Longhi, P., Mazza, F. 1978. Horse Shoe Corrosion of Copper Alloys in Flowing Sea Water: Mechanism and Possibility of Cathodic Protection of Condenser Tubes in Power Stations. *Corrosion* 34:396-406.
- [105] Kear, G., Barker, B.D., Walsh, F.C. 2004. Electrochemical corrosion of unalloyed copper in chloride media – a critical review. *Corrosion Science* 46: 109-135.
- [106] Sathiyarayanan, S., Sahre, M., Kautek, M. 1999. In-situ grazing incidence X-ray diffractometry observation of pitting corrosion of copper in chloride solutions. *Corrosion Science* 41 (10): 1899–1909.
- [107] MacLeod, I. 1991. Identification of Corrosion Products on Non-Ferrous Metal Artifacts Recovered from Shipwrecks. *Studies in Conservation* 36:222-234.
- [108] Selwyn, L. 2004 *Metals and Corrosion, A Handbook for the Conservation Professional*, Canadian Conservation Institute, Ottawa.
- [109] Xia , X., Xie ,C., Cai ,S., Yang ,Z., Yang ,X. 2006. Corrosion characteristics of copper microparticles and copper nanoparticles in distilled water. *Corrosion Science* 48: 3924-3932.
- [110] Cai ,S., Xia ,X., Xie ,C.2005. Corrosion behavior of copper/LDPE nanocomposites in simulated uterine solution. *Biomaterials* 26: 2671-2976.
- [111] Xu ,T., Lei ,H. , Cai ,S.Z., Xia ,X.P., Xie ,S.C.2004. The release of cupric ion in simulated uterine: new material nano-Cu/low-density polyethylene used for intrauterine devices. *Contraception* 70: 153-7.
- [112] Mah ,T.F., Pitts, B., Pellock , B. 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426: 306-310.
- [113] Banidotti Group  
<http://www.badinotti.com> [Consulta: 15 abril 2013]
- [114] Wenco Sur  
<http://www.wencosur.cl/> [Consulta: 15 abril 2013]
- [115] The Plastic Portal  
<http://www.plasticseurope.org/> [Consulta: 15 abril 2013]
- [116] Kanekura, k. Tsujita, Y., Yoshimizu, H., Okamoto, S., Kanusada, H., Goto,m. 2005. Characterization and transport properties of novel aliphatic polyamide with ethyl branch. *Journal of Applied Polymer Science* 98: 1955-1960.
- [117] Robertson, G.L. 2006. *Food packaging principles and practice*. CRC press.

- 
- [118] Groover, M.P. 1997. *Fundamentos de Manufactura Moderna*. Pearson. México.
- [119] Paul, D.R., Roberson, L.M. 2008. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. *Polymer* 49(15) : 3187-3204.
- [120] Cioffi, N., Torsi, L., Ditarantano, G., Tantalillo, L. Ghibelli, L. Sabbatini, L., Blevè-Zacheo, T., D` Alessio, M., Zambonin, P.G.; Traversa, E. 2005. Copper Nanoparticles/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. *Chemistry of Materials* 17: 5255- 5262.
- [121] Kim, Y., Lee, D., Cha, H., Kim, C., Kang, Y. 2006 . Preparation and Characterization of the Antibacterial Cu Nanoparticle Formed on the Surface of SiO<sub>2</sub> Nanoparticles. *Journal of Physics B*110: 24923-24928.
- [122] Ozdemir, M., Yuteri, C., Sadikoglu, H. 1999. Surface Treatment of Food Packaging Polymers by Plasmas. *Food Technology* 53(4):54-58.
- [123] Biswas, A., Oktas, O.C., Kanzow, J., Saees, U., Strunskus, T., Zaporozhchenko, V., faupe, F. 2004. Polymer-metal optical nanocomposites with tunable particle plasmon resonance prepared by vapor phase co-deposition. *Materials Letters* 58(9): 1530-1534.
- [124] Lin, B.; Gelves, G., Haber, J., Pötschk, P.; Sundararaj, U. 2008. Electrical, Morphological and Rheological Study of Melt Mixed Polystyrene/Copper Nanowire Nanocomposites. *Macromolecular Materials and Engineering* 293(7): 631-640.
- [125] Xia, X., Cai, S., Xie, C. 2006. Preparation, structure and thermal stability of Cu/LDPE nanocomposites. *Materials Chemistry and Physics*. 95(1):122-129
- [126] Burke, N., Stöver, H., Dawson, F., Lavers, J. Jain, P.K., Oka, H. Preparation and characterization of polymer-coated magnetic nanoparticles. *IEEE Transactions on Magnetics* 37(4):2660-2662.
- [127] Esumi, K., Takei, N., Yoshimura, T. 2003 Antioxidant-potentiality of gold-chitosan nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 32:117-123.
- [128] Xia, X., Xie, C., Cai, S., Wen, F., Zhu, C., Yang, X. 2006. Effect of the loading and size of copper particles on the mechanical properties of novel Cu/LDPE composites for use in intrauterine devices. *Materials Science and Engineering A* 429 (1-2) :329-333.
- [129] Stoeva, S.I. , Zaikovski, V., Prasad, B.L.V., Stoimenov, P.K., Sorensen , C. M., Klabunde, K.J. 2005. Reversible transformations of gold nanoparticles morphology. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* 21(23): 10280-10283.

- 
- [130] R. Vaia, G. price, P. Ruth, H. Nguyen, J. Lichtenhan .1999. Polymer/layered silicate nanocomposites as high performance ablative materials. *Applied Clay Science* 15:67-92.
- [131] Sinha Ray, S., Biswas, M. 2001. Recent progress in preparation and evaluation of montmorillonite/polymer nanocomposites. *Advanced Polymer Science* 155: 167-221.
- [132] Giannelis , E.P. 1998. Polymer-layered silicate nanocomposites: Synthesis, properties and application . *Applied Organometalic Chemistry* 12: 675-680.
- [133] Xu , R., Manias, E. , Snyder, A.J., Runt, J. 2001. New Biomedical Poly(urethane urea)-Layered Silicate Nanocomposites. *Macromolecules* 34: 337-339.
- [134] Bharadwaj, R.K. 2001. Modeling the barrier properties of polymer-layered silicate nanocomposites. *Macromolecules* 34: 9189-9192.
- [135] Gilman, J., Jackson, C., Morgan, A.,Harris, Jr. R., Manias, E. , Giannelis, E., Wuthenow, M.. Hilton , D., Phillips,S. 2000. Flammability Properties of Polymer Layered-Silicate Nanocomposites. Polypropylene and Polystyrene Nanocomposites. *Chemistry of Materials* 12 :1866-1873.
- [136] Bourbigot, S., LeBras , M., Dabrowski , F., Gilman , J., Kashiwagi, T. . 2000. PA-6 clay nanocomposite hybrid as char forming agent in intumescent formulations. *Fire Materials* 24:201-208.
- [137] Cho, Y.W., Cho, Y.N., Chung, S.H., Yoo, G., Ko, S.N. 1999. Water soluble chitin as a wound healing accelerator. *Biomaterials* 20 :2139-2145.
- [138] Tanaka, T., Montanari, G. ,Mülhaupt ,R .2004. Polymer nanocomposites as dielectrics and electrical insulation—perspectives for processing technologies, material characterization and future application *IEEE Transactions and Electrical Insulation* 11 (5):763-784.
- [136] T. Fornes, D. R. Paul, 2003. Modeling properties of nylon 6/clay nanocomposites using composite theories *Polymer* 44 (14) :4993-5013.
- [140] Lee, H., Fasulo, P. ,Rodgers, W. , Paul, D.R. . 2006. TPO based nanocomposites. Part 2. Thermal expansion behavior. *Polymer* 47 : 3528-3539.
- [141] Kim,S.H., Kim, S.C.. 2007. Synthesis and properties of poly(ethylene terephthalate)/clay nanocomposites by in situ polymerization. *Journal Applied Polymer Science* 103:1262-1271.



- 
- [142] Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E. 2004. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 25 :4383-4391.
- [143] Sandler, J., Kirk, J., Kinloch, I., Shaffer, M., Windle, A. . 2003. Ultra-low electrical percolation threshold in carbon-nanotube-epoxy composites. *Polymer* 44:5893-5899.
- [144] Poblete, V., Alvarez, M., Fuenzalida, V. 2009. Conductive Copper-PMMA Nanocomposites: Microstructure, Electrical Behavior, and Percolation Threshold as a Function of Metal Filler Concentration. *Polymer Composites* 30 :328-333.
- [145] Hung, H.S., Hsu, S.H. 2007. Biological performances of poly(ether)urethane-silver nanocomposites. *Nanotechnology* 18:475101 (9 pp).
- [146] Damm, C., Münstedt, H., Rösch, A. 2008. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. *Materials Chemistry Physics* 108:61-66.
- [147] Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., y colaboradores. 2004. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 25 :4383-4391.
- [148] Zhang, W., Zhang, Y.H., Ji, J.H., Zhao, J., Yan, Q., Chu, P.K. 2006. Antimicrobial properties of copper plasma-modified polyethylene. *Polymer* 47: 7441-7445.
- [149] Breuer, O., Sundararaj, U. 2004. Big returns from small fibers: A review of polymer/carbon nanotube composites. *Polymer Composites* 25 :630-645.
- [150] Alexandre, M., Dubois, P., Sun, T., Garces, J., Jérôme, R. 2002. Polyethylene-layered silicate nanocomposites prepared by the polymerization-filling technique: synthesis and mechanical properties. *Polymer* 43 : 2123-2132.
- [151] Ray, S., Okamoto, M. 2003. Polymer/ layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Progress in Polymer Science* 28 :1539-1641.
- [152] Palza, H., Vergara, R., Zapata, P. 2010. Improving the Thermal Behaviour of Polypropylene by Addition of Spherical Silica Nanoparticles. *Macromolecular Materials and Engineering* 296:899-905.
- [153] Anyaogu, K., Fedorov, A., Neckers, D. 2008. Synthesis, characterization, and antifouling potential of functionalized copper nanoparticles. *Langmuir* 24:4340-4346.

- 
- [154] Marcos, C., Blancas, C. Transiciones de fase de Polipropileno isotáctico de reactor y de Reología controlada, nucleados con ácido pimélico , bajo cristalización dinámica. 2006. Revista Iberoamericana de Polímeros 7 (1):43-66.
- [155] Machado, G., Denardina, E., Kinastb, E., Gonçalvesc, M., Luca ,M., Teixeira ,S., Samios , D. 2005. Crystalline properties and morphological changes in plastically deformed isotactic polypropylene evaluated by X-ray diffraction and transmission electron microscopy. European Polymer Journal 41 (1) :129-138.
- [156] Michels HT, Wilks SA, Keevil W. The antimicrobial effects of copper alloys surfaces on the bacterium, E. coli 0157:H7. Plenary Lectures, Economics and Applications of Copper. Volume I. In: Lagos GE, Sahoo M, Camus J editors. Santiago, Chile, 2003.
- [157] Kühn KD. Bone Cements: Up-To-Date Comparison of Physical and Chemical Properties of Commercial Materials. In: Springer editors. Berlin, London. 2000.
- [158] Palza, H., Gutiérrez, S., Delgado, K., Salazar, O., Fuenzalida, V., Avila, J., Figueroa, G., Quijada, R. 2009. Toward Tailor-made Biocide Materials Based on Polypropylene/Copper Nanoparticles. Macromolecular Rapid Communications 31(6):563-567.
- [159] Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., y colaboradores. 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. Toxicology Letters 163: 109-120.
- [160] Roseman, T., Higuchi, W.I. 1970. Release of medroxyprogesterone acetate from a silicone polymer. Journal of Pharmaceutical Sciences 59 (3):353-357.
- [161] Leal ,S.M., Fonseca ,E., Ferreira ,C.A., Bohrz ,S.M. 2009. Studies on the Properties of Rice-Husk-Filled-PP Composites – Effect of Maleated PP. Materials Research 12:333-338.
- [162] Kunz, A.N., Brook, I. 2010 Emerging resistant Gram negative aerobic bacilli in hospital-acquired infections. Chemotherapy 56: 492–500.
- [163] Rice, L.B. 2007. Emerging issues in the management of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Cleveland Clinic Journal of Medicine 74: S12–S20.
- [164] Smita, M., Sanjay, K.N. 2007. Effect of clay exfoliation and organic modification on morphological, dynamic, mechanical and thermal behavior of melt-compounded polyamide-6 nanocomposites. Polymer Composites 28:153-162.

- 
- [165] Cai, S., Xia, X., Xie, C. 2005. Researcher on Cu<sup>2+</sup> transformations of Cu and its oxides particles with different sizes in the simulated uterine solution. *Corrosion Science* 47:1039-1047.
- [166] Zaikab, G.D. 2011. Marine microbes digest plastic. *Nature News* doi:10.1038/news.2011.191  
<http://www.nature.com/news/2011/110328/full/news.2011.191.html>
- [167] Singh, N., Turner, A. 2009. Leaching of copper and zinc from spent antifouling paint particles. *Environmental Pollution* 157: 371-376.
- [168] Chapman, R.G., Ostuni, E., Liang, M.N., Meluleni, G. y colaboradores. 2001. Polymeric thin films that resist the adsorption of proteins and adhesion of bacteria. *Langmuir* 17:1225-1233.
- [169] Powell, C. 2006. Corrosion and biofouling resistance evaluation of 90-10 copper-nickel. Copper Development Association, UK.
- [170] Monzollillo, J. Thiele, E. Tuthill, A. 1976. CA 706 Copper-Nickel Alloy Hulls: the copper mariner experience and economics, New York, November 11-13.
- [171] Luyt, A.S., Molefi, J.A., Krump, H. 2006. Thermal, mechanical and electrical properties of copper powder filled low-density and linear low-density polyethylene composites. *Polymer Degradation and Stability* 91: 1629-1636.
- [172] Xia, X., Cai, S., Xie, C. 2006. Preparation, structure and thermal stability of Cu/LDPE nanocomposites. *Materials Chemistry and Physics* 95:122-129.
- [173] Wilks, Edward S. 2001. *Industrial polymers handbook*. Wiley VCH.
- [174] Han, Chang. 2007. *Rheology and Processing of Polymeric Materials*, Oxford University Press, New York. Vol1.
- [175] Auhl, D., Stange, J., Münstedt, H. et al. 2004. Long-Chain Branched Polypropylene by Electron Beam Irradiation and Their Rheological Properties. *Macromolecules* 37:9465-9472.
- [176] Hunter, R.J. 1987. *Foundations of Colloid Science*. Oxford University Press, New York. Vol1.
- [177] Fink, G., Steinmetz, B., Zechlin, J., Przybyla, C., Tesche, B. 2000. Propene Polymerization with Silica-Supported Metallocene/MAO Catalysts. *Chemical Reviews* 100(4): 1377-1390.

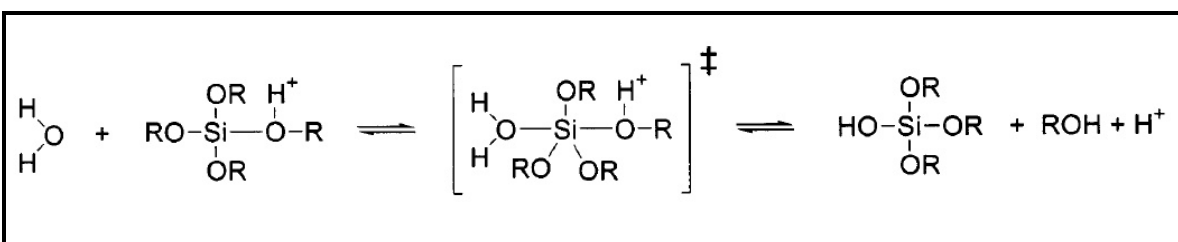
- 
- [178] Kim, Y.H., Kim, C.W., Cha, H.G., Lee, D.K., Jo, B.K., Ahn, G.W., et al. Bulklike Thermal Behavior of Antibacterial Ag-SiO<sub>2</sub> Nanocomposites. *Journal of Physical Chemistry C* 113: 5105-5110.
- [179] Hsiao, M.T., Chen, S.F., Shieh, D.B., Yeh, C.S. 2006. One-Pot Synthesis of Hollow Au<sub>3</sub>Cu<sub>1</sub> Spherical-like and Biomineral Botallackite Cu<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub>Cl Flowerlike Architectures Exhibiting Antimicrobial Activity. *Journal of Physical Chemistry B* 110: 205-210.
- [180] Tang, S., Zhu, S., Lu, H., Meng, X. 2008. Shape evolution and thermal stability of Ag nanoparticles on spherical SiO<sub>2</sub> substrates. *Journal of Solid State Chemistry* 181: 587-592.
- [181] Asuka, K., Liu, B., Terano, M., Koh-hei, N. 2006. Homogeneously Dispersed Poly(propylene)/SiO<sub>2</sub> Nanocomposites with Unprecedented Transparency. *Macromolecular Rapid Communications* 27(12):910-913.
- [182] Rodríguez LL. 2007. Obtención de nanopartículas y nano-ordenamientos metálicos empleando la química de los compuestos de inclusión. Tesis de Doctor en Química. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- [183] Sung, M.M., Sung, K., Kim, Ch.G., Lee, S.S., Kim, Y. 2000. Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on Oxidized Copper Surfaces. *Journal of Physical Chemistry B* 104:2273-2277.
- [184] Aslam, M., Gopakumar, G., Shoba, T.L., Mulla, I.S., Vijayamohan, K., Kulkarni, S.K., Urban, J., Vogel, W. 2002. Formation of Cu and Cu<sub>2</sub>O Nanoparticles by Variation of the Surface Ligand: Preparation, Structure, and Insulating-to-Metallic Transition. *Journal of Colloid and Interface Science* 255:79-90.
- [185] Chen, L., Zhang, D., Chen, J., Zhou, H., Wan, H. 2006. The use of CTAB to control the size of copper nanoparticles and the concentration of alkylthiols on their surfaces. *Materials Science and Engineering A* 415:156-161.
- [186] Ang, T.P., Wee, T.S.A., Chin, W.S. 2004. Three-Dimensional Self-Assembled Monolayer (3D SAM) of n-Alkanethiols on Copper Nanoclusters. *Journal of Physical Chemistry B* 108:11001-11010.

# CAPÍTULO 11: ANEXOS

## ANEXO A: FUNDAMENTOS DEL PROCESO SOL-GEL

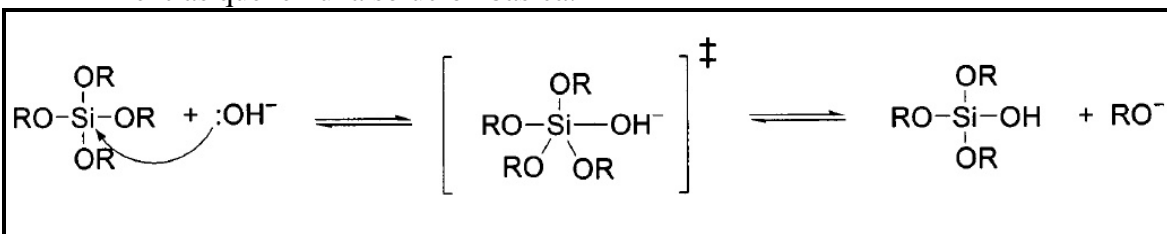
El método más usado para la preparación de distintas estructuras a base de sílice es el proceso sol-gel. El proceso sol-gel consiste en la hidrólisis y condensación de precursores alcóxido, como por ejemplo  $\text{Si}(\text{OEt})_4$  (tetraetil ortosilicato o TEOS).

La hidrólisis de un alcóxido del tipo  $\text{Si}(\text{OR})_4$ , donde R es un grupo alquil ( $\text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$  o  $\text{C}_3\text{H}_7$ ), se inicia con la incorporación de agua y su mecanismo depende si se opera bajo condiciones ácidas o básicas. En una solución ácida se tiene:



Esquema 1. Mecanismo de reacción de hidrólisis en medio ácido.

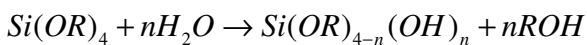
Mientras que en una solución básica:



Esquema 2. Mecanismo de reacción de hidrólisis en medio básico.

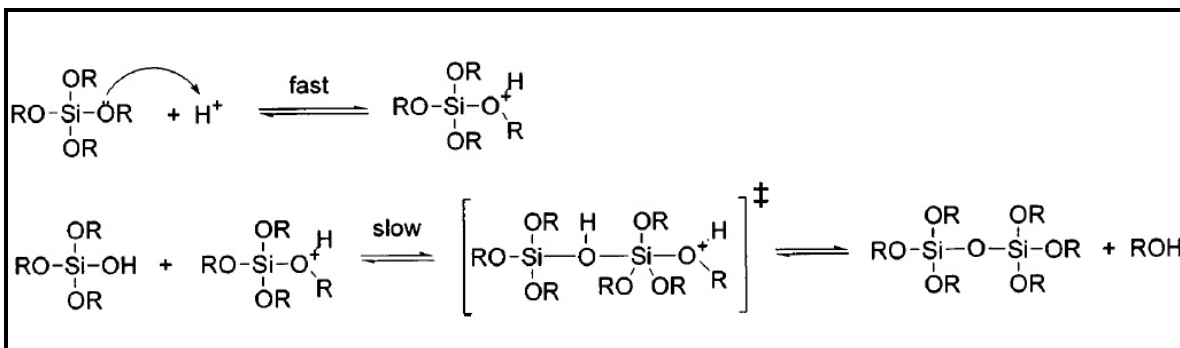
Al ir progresando la condensación, pequeñas redes de siloxanos (Si-O) en tres dimensiones, van formándose. La reacción de condensación puede verse influenciada mediante la adición de un electrólito o a través de un cambio de pH de la solución. Controlando estos dos factores, se favorece ya sea el crecimiento de las partículas o el entrecruzamiento de estas para formar cadenas [186]. De esta forma, mediante esta técnica se puede obtener un **sol** de partículas de tamaño controlado, o un **gel**, donde los espacios intersticiales de las cadenas son ocupados por el solvente de la solución.

Para que ocurra la condensación es necesario que las moléculas del precursor hidrolicen, de modo que dos grupos silanoles de moléculas distintas tengan la posibilidad de unirse. La reacción de hidrolisis depende de la relación  $\text{Si}/\text{H}_2\text{O}$ , pues más de un grupo alcóxi puede ser sustituido:



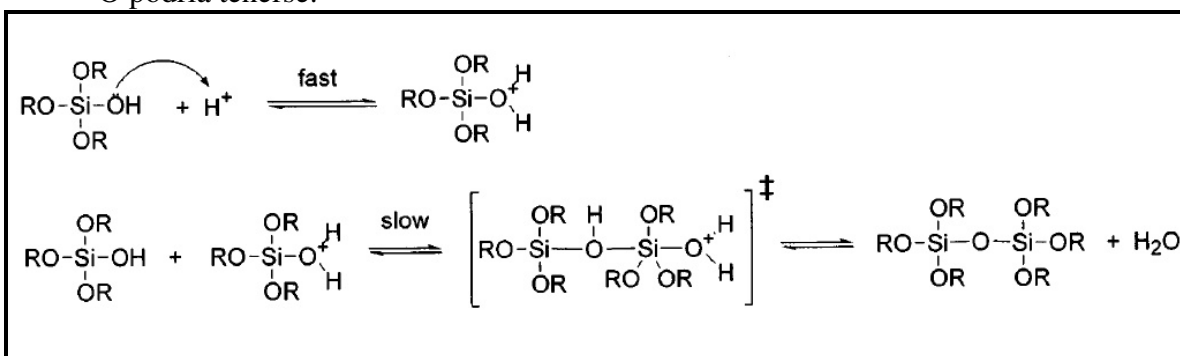
**Reacción 33**

El mecanismo de condensación también varía según el medio, bajo condiciones ácidas se tiene:



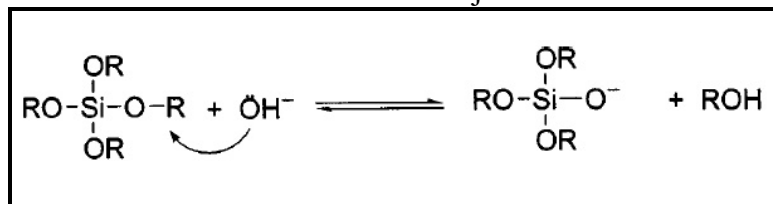
Esquema3. Mecanismo de reacción de condensación en medio ácido.

O podría tenerse:



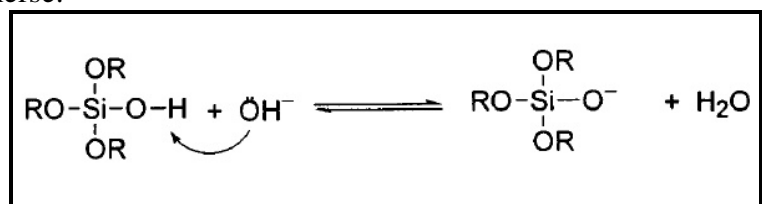
Esquema 4. Mecanismo de reacción de condensación en medio ácido.

Estos mecanismos de condensación cambian bajo condiciones básicas:



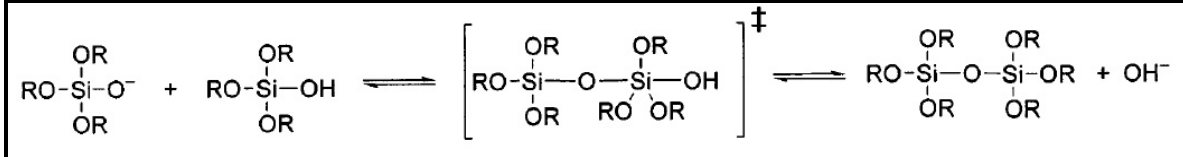
Esquema 5. .Etapa inicial del mecanismo de reacción de condensación en medio básico.

O podría tenerse:



Esquema 6. Etapa inicial del mecanismo de reacción de condensación en medio básico.

Para finalmente obtener:



Esquema 7. Etapa final del mecanismo de reacción de condensación en medio básico.

Las diferencias entre las reacciones catalizadas en medio ácido o básico determinan la morfología de la partícula, según se ilustra en la Figura 136.

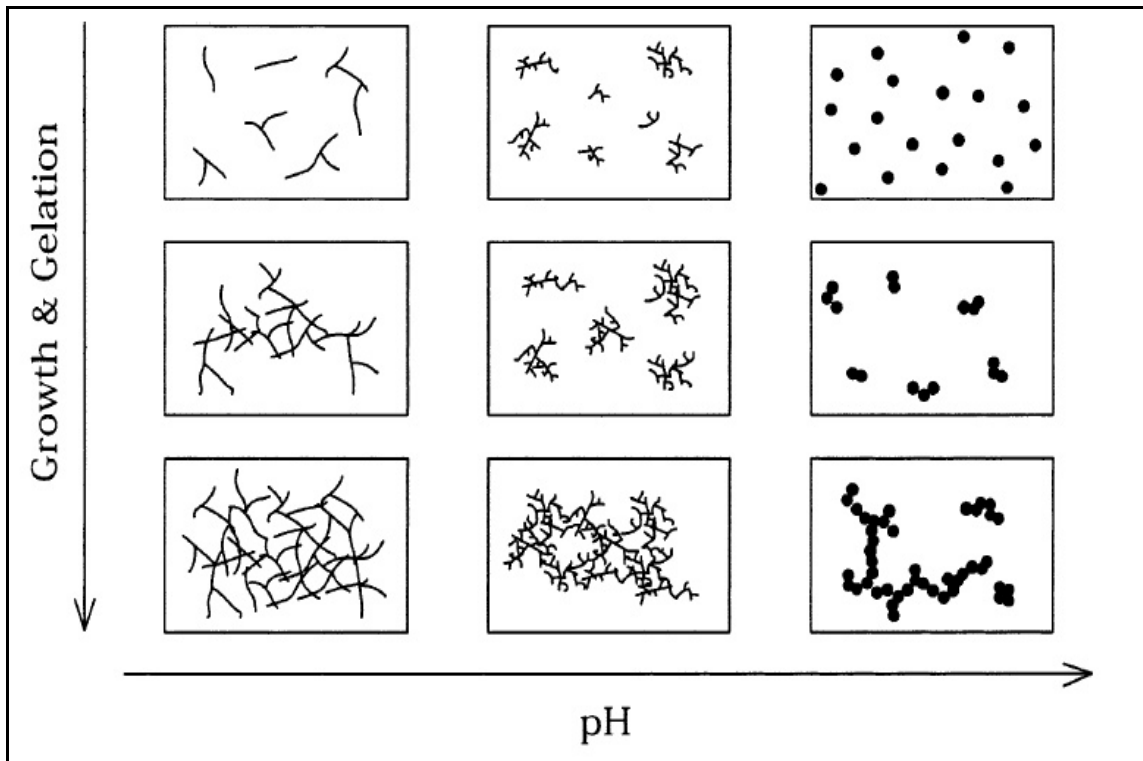


Figura 136. Efectos del pH en la morfología de la partícula en reacciones sol-gel [186].

El proceso sol-gel es masivamente utilizado para la obtención industrial de sílice. Las razones son la versatilidad de la técnica, pues permite controlar la pureza, homogeneidad, porosidad, tamaño y estructura de la sílice [186,186] y la economía, ya que opera a bajas temperaturas[186].

---

## ANEXO B: FUNDAMENTOS DE LAS ESPECTROFOTOMETRÍA

Para cuantificar la liberación de iones de cobre se utilizó la técnica de colorimetría que permite crear complejos coloreados en soluciones incoloras. A las soluciones coloreadas se les mide la absorbancia (Abs) a una longitud de onda apropiada en un espectrofotómetro UV visible modelo JENWAY 6320D. El equipo mide la luz absorbida por las soluciones coloreadas que dependerá directamente de la concentración de iones que hay en la muestra, la absorbancia (Abs) relaciona la intensidad de la luz que incide en la muestra ( $I_I$ ) con la que se transmite ( $I_T$ ), mediante la siguiente relación matemática:

$$Abs = \log (I_I / I_T)$$

**Ecuación 13**

Se mide la absorbancia relativa de una muestra respecto a un blanco, que contiene el disolvente no coloreado, a una cierta longitud de onda en el intervalo visible-ultravioleta. La cantidad de luz absorbida por la muestra dependerá de la cantidad de moléculas coloreadas presentes en ellas, por lo tanto, la absorbancia está relacionada con la concentración ( $C$ ). Además la absorbancia depende de otros factores como la longitud de celda atravesada por la luz ( $l$ ), el tipo de solución y la longitud de onda del haz incidente. Estos parámetros se relacionan entre sí mediante la ley de Beer-Lambert:

$$Abs = \epsilon_{\lambda} * l * C$$

**Ecuación 14**

Donde  $\epsilon_{\lambda}$  es el coeficiente de extinción molar de la muestra a la longitud de onda  $\lambda$  y se determina mediante la calibración del equipo.



---

## ANEXO C: CURVAS DE CALIBRACIÓN

Las siguientes curvas relacionan linealmente la concentración de la muestra con la absorbancia obtenida en el espectrofotómetro UV visible:

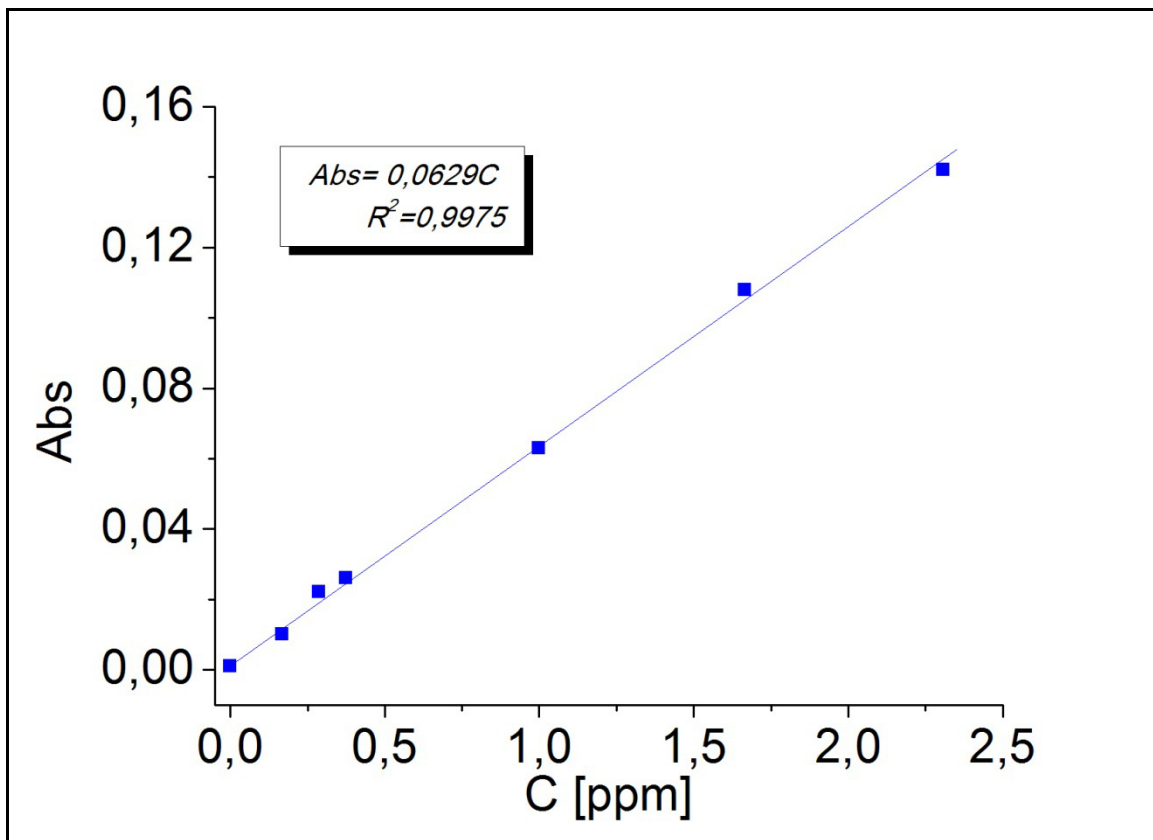


Figura 137. Curva de calibración del espectrofotómetro para bajas concentraciones.

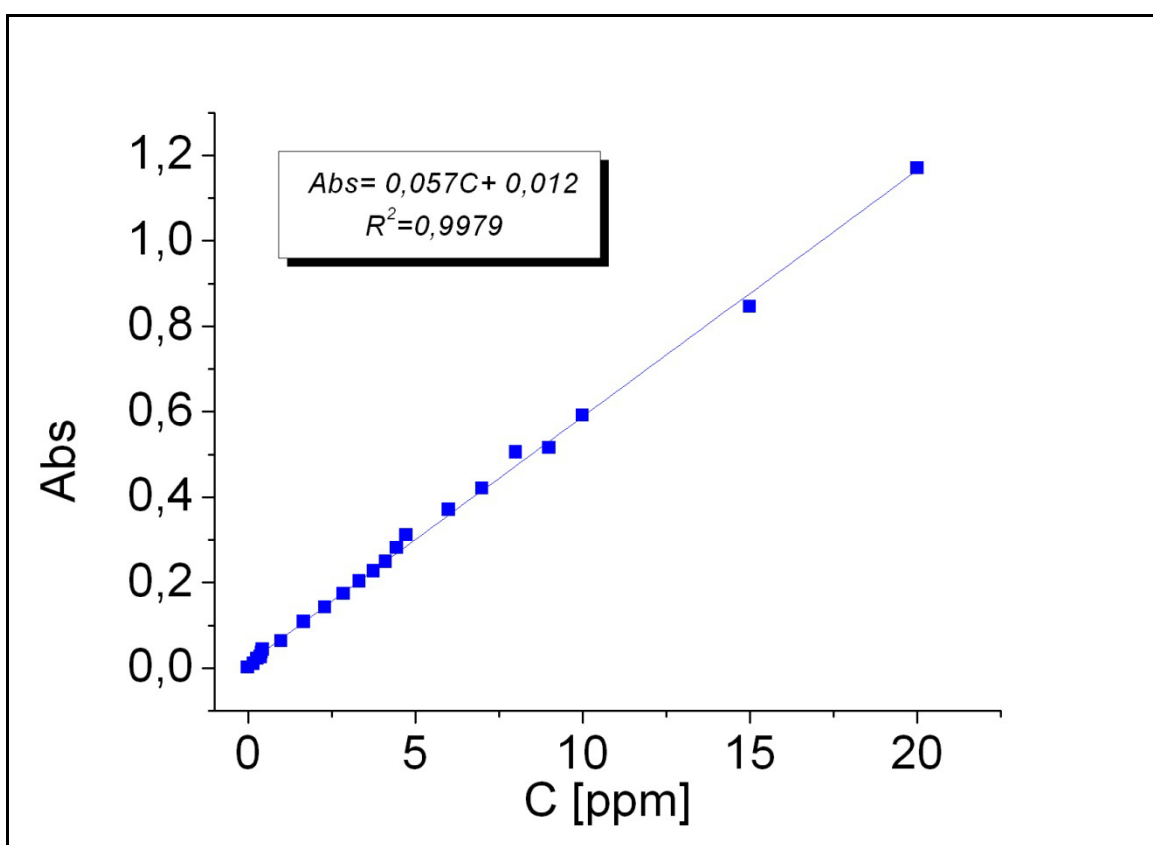


Figura 138. Curva de calibración del espectrofotómetro para altas concentraciones.