

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO CON COBRE Y
ÁCIDO SALICÍLICO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA

KEVIN ALEXIS HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

Ensenada, Baja California, México, Febrero del 2020

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO CON COBRE Y ÁCIDO SALICÍLICO

Tesis

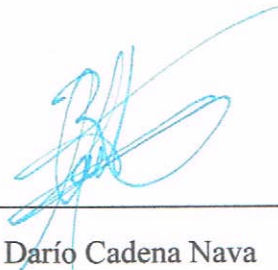
Para cubrir los requisitos necesarios para obtener el título de

Bioingeniero

Presenta:

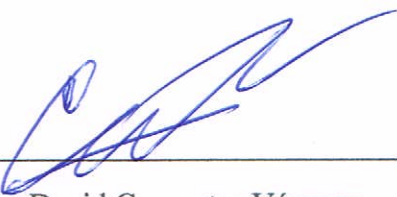
KEVIN ALEXIS HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

Aprobada por:



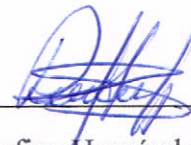
Dr. Rubén Darío Cadena Nava

Director de tesis



Dr. David Cervantes Vásquez

Co-director



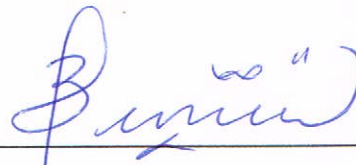
Dra. Rufina Hernández Martínez

Sinodal



Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez

Sinodal



Dra. Eunice Vargas Viveros

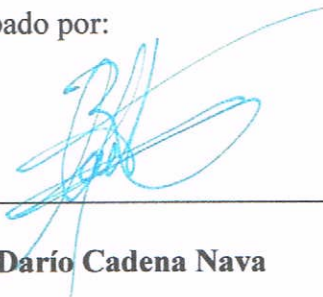
Sinodal

Resumen

De la tesis de Kevin Alexis Hernández Hernández, presentada como requisito para la obtención del título de BIOINGENIERO. Ensenada, Baja California. Febrero de 2020.

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO CON COBRE Y ÁCIDO SALICÍLICO

Resumen aprobado por:



Dr. Rubén Darío Cadena Nava

Director



Dr. David Cervantes Vásquez

Co-director

Las nanociencias y la nanotecnología tienen fundamento en el estudio de los fenómenos que ocurren a nanoescala y en los nanomateriales (con tamaños de 1-100 nm), los cuales tienen diversas aplicaciones en áreas diferentes. La producción de nanomateriales puede ser larga y por lo tanto susceptible al error humano. Con un sistema semi-automatizado estos materiales se producirían más eficientemente. Por otra parte, diferentes estudios han demostrado que las nanopartículas de quitosano pueden ser una alternativa para el combate de plagas en cultivos. El quitosano es un polímero natural derivado de la quitina, el cual es biocompatible, biodegradable y no tóxico. Por lo anterior, en este trabajo se propone la modificación de protocolos reportados en literatura para la síntesis de nanopartículas a base de quitosano con cargas de ácido salicílico o cobre, el cual pueda ser reproducible, gracias a un sistema de goteo semiautomático por medio de microcontroladores, con la idea de obtener nanopartículas cargadas que puedan usarse para la protección de cultivos contra hongos y bacterias patógenas. La caracterización de las nanopartículas de quitosano se realizó mediante DLS, FTIR y TEM. Las nanopartículas de quitosano (CS NPs) sintetizadas mostraron un tamaño de 46 ± 8.3 nm y un potencial zeta de 30.3 ± 5.2 mV, las nanopartículas de quitosano con cobre (CuCS NPs) mostraron un tamaño de 29 ± 5.8 nm y un potencial zeta de 41.4 ± 4.1 mV, las nanopartículas de quitosano con ácido salicílico (SACS NPs) mostraron un tamaño de 49.5 ± 16.2 nm y un potencial zeta de 44.2 ± 4.3 mV, finalmente las

nanopartículas de quitosano con cobre y ácido salicílico (CuSACS NPs) mostraron un tamaño de 41.4 ± 14.6 nm y un potencial zeta de 29.8 ± 17.3 mV. En los ensayos de inhibición con *Staphylococcus aureus*, las nanopartículas que presentaron mejor actividad fueron las SACS NPs a concentraciones de 0.2 y 1 mg/mL.

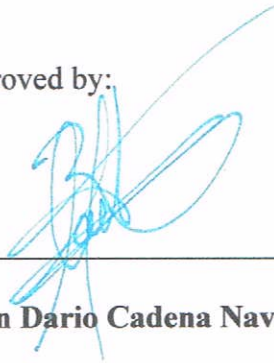
Palabras claves: Quitosano, cobre, ácido salicílico, nanopartículas.

Abstract

From the thesis of Kevin Alexis Hernández Hernández, presented as a requirement to get the BIOENGINEER title. Ensenada, Baja California. February, 2020.

SYNTHESIS OF CHITOSAN NANOPARTICLES WITH COPPER AND SALICYLIC ACID

Abstract approved by:



Dr. Rubén Darío Cadena Nava

Advisor



Dr. David Cervantes Vásquez

Co-Advisor

Nanosciences and nanotechnology are based on the study of phenomena that occur at the nanoscale and also on nanomaterials (with dimensions of 1-100 nm), which have different applications in different areas. Production of nanomaterials can be long and therefore susceptible to human error. With a semi-automated system these materials would be produced more efficiently. On the other hand, different studies have shown that chitosan nanoparticles can be an alternative for the control of pests in crops. Chitosan is a natural polymer derived from chitin, which is biocompatible, biodegradable and non-toxic. Therefore, this work proposes the modification of protocols reported in the literature for the synthesis of chitosan-based nanoparticles with loads of salicylic acid or copper, which can be reproducible, thanks to a semi-automatic drip system through microcontrollers, with the idea of obtaining charged nanoparticles that can be used for the protection of cultures against fungi and pathogenic bacteria. The characterization of the chitosan nanoparticles was performed using DLS, FTIR and TEM. Synthesis of chitosan nanoparticles (CS NPs) showed a size of 46 ± 8.3 nm and a zeta potential of 30.3 ± 5.2 mV, chitosan nanoparticles with copper (CuCS NPs) showed a size of 29 ± 5.8 nm and a zeta potential of 41.4 ± 4.1 mV, chitosan nanoparticles with salicylic acid (SACS NPs) showed a size of 49.5 ± 16.2 nm and

a zeta potential of 44.2 ± 4.3 mV, finally chitosan nanoparticles with copper and salicylic acid (CuSACS NPs) showed a size of 41.4 ± 14.6 nm and a zeta potential of 29.8 ± 17.3 mV. In the inhibition assays with *Staphylococcus aureus*, nanoparticles that exhibited the best activity were the SACS NPs at concentrations of 0.2 and 1 mg/mL.

Keywords: Chitosan, copper, salicylic acid, nanoparticles.

Dedicatoria

A mi padre Julio que sin ti no sería la persona que hoy soy, gracias por apoyar las decisiones que tomé y estar conmigo en los momentos más difíciles para mí, por afrontarlos a mi lado, por educarme y nunca rendirte. A mi madre Belén por todo tu amor incondicional, por dejarme crecer y salir de casa, poder experimentar por cuenta propia, por poner tu fe en mí. A mis tíos Rufi y César por tomarme como un hijo y creer en mí, haciendo que aprendiera de mis experiencias, recibíendome siempre con los brazos abiertos, por hacer mi estancia en Ensenada menos solitaria de lo que podría haber sido. A mis abuelitos, Gaspar, Antonia, Julia y Juan los cuales me vieron crecer, aunque algunos de ustedes tuvieron que partir antes de poder ver quien hoy soy. A mis hermanas Evelin y Julia por cuidar de Milanese, Olsen y Chayote y por todo el amor infinito que les tengo, les deseo que se sigan superando día a día. A mis amigos, Román, Toyes, Aleksy, Juan Carlos y Arturo por hacer mis días más divertidos, tenerme confianza para cualquier situación y apoyarme en los momentos más difíciles.

Todos ustedes son una inspiración para mí, haciendo que quiera superarme día a día. Aunque nos encontremos lejos, siempre tendré en mente sus enseñanzas para dar lo mejor de mi persona.

Kevin Alexis.

Agradecimientos

A mi director de tesis el Dr. Rubén Cadena por haberme guiado a lo largo de este trabajo y aceptarme como su estudiante, gracias por brindarme libertad a lo largo de este proyecto y por todas sus enseñanzas, eternamente agradecido por todo su apoyo.

A mi co-director de tesis el Dr. David Cervantes Vásquez y a mi sinodales la Dra. Rufina, la Dra. Dora Luz y la Dra. Eunice por la revisión del trabajo de tesis y sus comentarios respecto al trabajo.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente al departamento de Bionanotecnología, a todos los que me apoyaron en el laboratorio especialmente a Kendra, Santino y Lalo, además de aquellos quienes hicieron mi estancia en el laboratorio un lugar caluroso, les deseo mucho éxito en cualquier lugar donde se encuentren, amigos míos.

A los técnicos académicos del laboratorio de Bionanotecnología Itandehui Betanzo y Katrin Quester.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, especialmente a los departamentos de fitopatología y microbiología.

Al técnico académico de microbiología Guillermo, y a Juanpi de microscopía.

Al cuerpo docente de la Universidad Autónoma de Baja California, especialmente a la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño.

Al proyecto CONACYT CB-239878 y PN-247474.

Todo este trabajo fue realizado con recursos y en las instalaciones del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, por lo que la propiedad intelectual pertenece a la UNAM.

Índice general

Introducción	1
Descripción del problema	3
Marco teórico	4
Quitosano	4
Propiedades fisicoquímicas del quitosano.....	7
Aplicaciones del quitosano.....	7
Sistema inmune de la planta	9
El ácido salicílico en la planta.....	9
El cobre en la planta	10
Quitosano como nanopartícula	12
Hipótesis	13
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos	13
Metodología	14
Materiales y métodos	15
Sistema Poseidón modificado de (Booeshaghi et al., 2019).....	15
Síntesis de nanopartículas	16
Estandarización del método	19
Partículas elaboradas.....	21
Caracterización	21
Dispersión dinámica de luz (DLS).....	21
Caracterización de las nanopartículas por espectroscopia infrarroja (FTIR)	23
Caracterización de las nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	24
Ensayos de inhibición microbiana	25
Resultados y discusión	26
Sistema Poseidón modificado de (Booeshaghi et al., 2019).....	26
Análisis dispersión dinámica de luz (DLS)	27
Análisis de tipos de enlaces por espectroscopia infrarroja (FTIR).....	28

Morfología de las nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión (TEM)....	29
Ensayos de inhibición microbiana	31
Conclusiones.....	33
Anexos.....	40
Manual para el sistema Poseidón	40
Liofilizado en las nanopartículas	44
Protocolo para la síntesis de nanopartículas a base de quitosano	45
Distribución de tamaño de las nanopartículas obtenida por DLS.....	47
Distribución de potencial zeta obtenido por DLS.....	48

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del quitosano (modificado de Li et al., 1992).....	7
Tabla 2. Aplicaciones del quitosano (modificado de Li et al., 1992).....	8
Tabla 3. Velocidades de prueba para la estandarización de la síntesis de nanopartículas...	19
Tabla 4. Determinación del tamaño de las nanopartículas de quitosano en el pellet por DLS en la última fracción de la centrifugación.....	20
Tabla 5. Determinación del tamaño de las nanopartículas de quitosano en el sobrenadante por DLS en la última fracción de la centrifugación.....	20
Tabla 6. Rangos de longitud de onda de espectrofotometría infrarrojo	24
Tabla 7. Nanopartículas de quitosano cargadas, tamaños mínimos y máximos.....	27
Tabla 8. Potencial Zeta obtenido para las nanopartículas cargadas y sin cargar.....	28
Tabla 9. Nanopartículas de quitosano reportadas, tamaño y potencial zeta	28
Tabla 10. Lista de precios para construir el sistema Poseidón (abril, 2019)	43

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química del quitosano.....	5
Figura 2. Diagrama de flujo de producción de quitosano	5
Figura 3. Estructura química del ácido salicílico (SA).....	10
Figura 4. Deficiencia de cobre en una planta de lechuga	11
Figura 5. Modelo 3D del sistema Poseidón de Boeshaghi et al., 2019	16
Figura 6. Eliminación de partículas grandes de quitosano	17
Figura 7. Membrana de 0.45 μm para filtrar el TPP	17
Figura 8. Proceso de la síntesis de nanopartículas a base de quitosano	18
Figura 9. Esquema de la síntesis de nanopartículas de quitosano	18
Figura 10. Estandarización del método de obtención de nanopartículas	20
Figura 11. Estandarización del método a diferentes velocidades de centrifugación.....	21
Figura 12. Sistema Poseidón montado para la síntesis de las nanopartículas	26
Figura 13. Nanopartículas de quitosano cargadas	27
Figura 14. Espectros obtenidos para diferentes nanopartículas sintetizadas a base de CS	29
Figura 15. CS NPs sin diluir observadas en TEM.....	30
Figura 16. CuCS NPs diluidas.....	30
Figura 17. CuCS NPs sin diluir a 25kx; SACS NPs sin diluir 40kx.	31
Figura 18. Tratamiento con nanopartículas a base de quitosano para <i>S. aureus</i>	32
Figura 19. CS NPs liofilizadas	44
Figura 20. CuCS NPs liofilizadas.....	44
Figura 21. SACS NPs liofilizadas	45
Figura 22. Distribución de tamaño de nanopartículas obtenidas por DLS para quitosano	47
Figura 23. Distribución de tamaño de nanopartículas obtenidas por DLS para CuCS NPs.....	47
Figura 24. Distribución de tamaño de nanopartículas obtenidas por DLS para SACS NPs	47
Figura 25. Potencial Zeta obtenido para las nanopartículas de quitosano cargadas.....	48
Figura 26. Distribución de potencial zeta obtenido por DLS para el quitosano.....	48
Figura 27. Distribución de potencial zeta obtenido por DLS para CuCS NPs.....	49
Figura 28. Distribución de potencial zeta obtenido por DLS para SACS NPs	49

Capítulo 1

Introducción

Las nanopartículas son partículas microscópicas con un tamaño entre 1-100 nm. Las cuales tienen diversas aplicaciones en la industria, alimentos, medio ambiente, biomédica, entre otros. La generación de nanopartículas es de relevancia básicamente por tres razones: Por los beneficios que aportan en distintas áreas, por ser una tecnología emergente en pleno desarrollo y por los riesgos asociados a ellas (Keller et al., 2013). La automatización del proceso de la síntesis de nanopartículas es ventajosa, ya que se reducen costos de producción, muchas veces eliminando la susceptibilidad del error humano, además de un acortamiento de tiempo y mayor eficiencia. Para ejemplificar las ventajas de las nanopartículas a lo largo de este trabajo se hará énfasis en la parte agrícola.

El uso de la nanotecnología en la agricultura ha creado un gran interés, ofreciendo el potencial para mejorar significativamente la productividad y eficiencia agrícola con un menor costo y menos desperdicio (Scott & Chen, 2013; Kah, 2015). La agricultura y en general las plantas pueden ser afectadas por diferentes plagas y patógenos (bacterianos, fúngicos y virales, entre otros), causando frecuentemente condiciones de estrés que activan la respuesta inmune de la planta. Aunque las plantas han desarrollado naturalmente mecanismos para combatir o neutralizar a estas condiciones, en la agricultura comercial los pesticidas son utilizados normalmente para su control. El cuidado del medio ambiente ha sido abordado por las nanociencias y nanotecnología con el desarrollo de nuevos materiales. Dentro de este desarrollo tenemos a las nanopartículas de quitosano para el control contra patógenos microbianos.

El quitosano es un material amigable con el medio ambiente y que en forma de partículas de tamaño nanométrico (nanopartículas) parece ser un buen vehículo para los procesos

biocatalíticos (Alarcón-Payán & Vazquez-Duhalt, 2017). El quitosano puede inhibir eficazmente el crecimiento del micelio radial, la esporulación, germinación de esporas y el alargamiento de los hongos *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Phytophthora* spp., *Botrytis* spp., y *Alternaria* spp., etc. Adicionalmente, en experimentos *in vitro* se ha demostrado que el quitosano presenta una buena actividad antibacteriana contra bacterias patógenas de plantas como *Streptomyces scabies*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia*, *Burkholderia seminalis*, *Acidovorax citrulli* y *Acidovorax avenae* (Hassan & Chang, 2017).

Otros estudios han reportado la actividad antiviral del quitosano, por ejemplo, contra el virus del mosaico del tabaco (TMV) y los virus de necrosis del tabaco, el virus de la papa X (Badawy & Rabea, 2011), el virus del mosaico del pepino (CMV) y el virus del mosaico de la alfalfa (AMV) (Badawy & Rabea, 2011; Nagorskaya et al., 2014; Jia et al., 2016).

Son varias las hipótesis que se han propuesto sobre el mecanismo de acción del quitosano en las plantas, entre otras:

- I. El quitosano y sus derivados tienen un doble mecanismo de acción: inhiben el crecimiento del patógeno y modifican las respuestas de defensa de la planta (Alvarez-Aramberri et al., 2015; Xing et al., 2015; Zhang et al., 2015; Li et al., 2016).
- II. El quitosano reacciona tanto con la membrana celular como en la pared celular e inactiva el patógeno mediante un mecanismo secuencial de dos pasos: una separación inicial de la pared celular de su membrana celular, seguida de la destrucción de la membrana celular (Chung & Chen, 2008).
- III. El modo de acción del quitosano está relacionado con su capacidad para quelar algunos nutrientes esenciales, iones metálicos y oligoelementos necesarios para el crecimiento de bacterias y hongos (Hauer, 1978; Rabea et al., 2003; Bhuvaneshwari & Sivasubramanian, 2013).
- IV. El quitosano puede formar una película densa en la superficie del patógeno que bloquea el flujo de nutrientes y el proceso de metabolismo de los microbios que son esenciales para su supervivencia en la naturaleza (Xing et al., 2015).

Por otro lado, en 2015 la Agencia de Protección del Ambiente de EE. UU. (EPA) concluyó que no hay riesgo para el medio ambiente por el quitosano, ya que no ha mostrado toxicidad en los mamíferos, además de ser un biopolímero natural.

Descripción del problema

La generación de nanopartículas manualmente puede traer variaciones en su tamaño. Por tales razones, en este trabajo se propone la síntesis de nanopartículas de quitosano cargadas con cobre y ácido salicílico de una manera semi-automatizada, como una estrategia para mejorar los tiempos de producción. Para tal efecto se realizará la estandarización de un método eficiente y reproducible. Además de la caracterización de las nanopartículas para demostrar la efectividad del sistema y su efecto antimicrobiano.

Capítulo 2

A continuación, se exponen conceptos fundamentales que ayudarán a comprender mejor este trabajo. En primer lugar, se describirán las propiedades fisicoquímicas y posibles aplicaciones del quitosano, posteriormente el sistema inmune de la planta, y el papel del cobre y el ácido salicílico en la misma. Seguido, se explica brevemente al sistema Poseidón, un sistema automatizado de goteo semi-controlado empleado como una herramienta para estandarizar el método de síntesis de las nanopartículas. Finalmente, se expone la hipótesis del presente trabajo, y el objetivo general y los objetivos específicos.

Quitosano

El quitosano es un polisacárido derivado de la quitina (Figura 1); la quitina es el segundo polisacárido más abundante en el mundo, después de la celulosa. El quitosano es biocompatible, biodegradable y no tóxico. También se utiliza como agente quelante debido a su capacidad para unirse con el colesterol, las grasas, las proteínas y los iones metálicos. El quitosano no es sólo un polímero que contiene grupos amino, también es un polisacárido, que contiene enlaces glicosídicos con los cuales se podría formar otro tipo de polisacáridos con propiedades diferentes (Ibrahim & El-Zairy, 2015).

El quitosano fue descubierto por primera vez por Rouget en 1859, cuando hirvió la quitina en una solución concentrada de hidróxido de potasio, resultando en la deacetilación de la quitina (Muzzarelli, 2013). La deacetilación de la quitina se realiza por hidrólisis química en condiciones alcalinas severas o por hidrólisis enzimática en presencia de enzimas particulares, entre ellas la quitina deacetilasa (Jayakumar et al., 2010; Venkatesan & Kim, 2010).

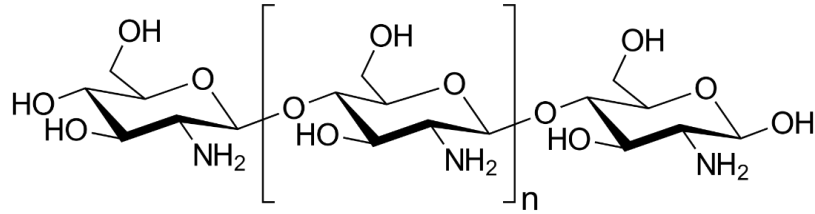


Figura 1. Estructura química del quitosano.

A escala industrial, las dos fuentes principales de quitosano son los crustáceos y los micelios fúngicos; sin embargo, la fuente animal presenta algunos inconvenientes como los estacionales, suministros limitados y variabilidad del producto, que puede conducir a características fisicoquímicas no deseadas (Kannan et al., 2010).

La producción de quitosano implica cuatro pasos: desproteinización, desmineralización, decoloración y deacetilación (Ibrahim & El-Zairy, 2015) como se muestra en la Figura 2.

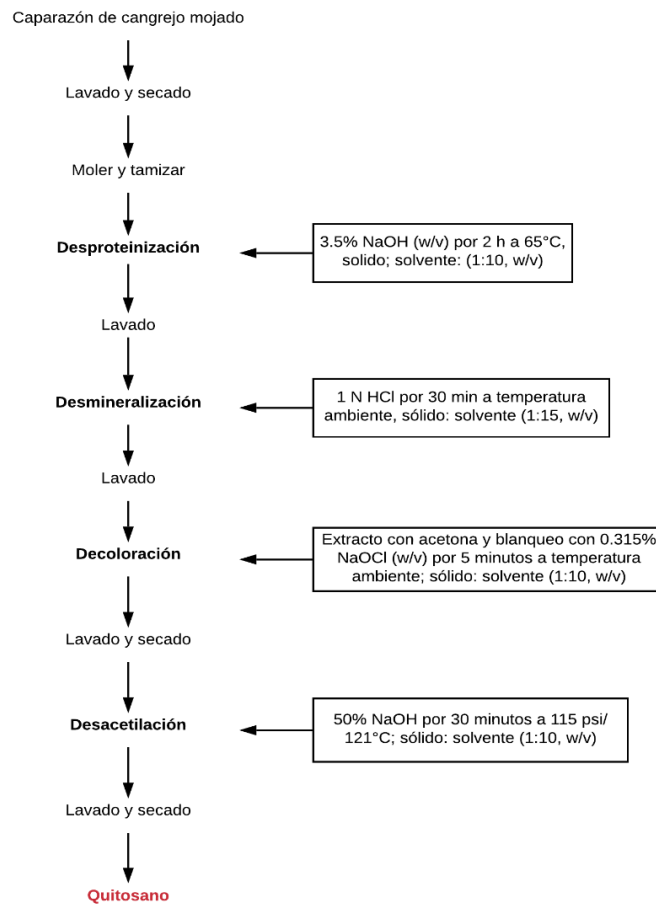


Figura 2. Diagrama de flujo de producción de quitosano (Modificado de: No & Meyers, 1995; Hudson & Jenkins, 2001).

El grado de deacetilación del quitosano comercial típico suele estar entre el 70% y el 95%, y el peso molecular entre 10 y 1000 kDa. Las propiedades fisicoquímicas, la biodegradabilidad y el papel biológico del quitosano dependen con frecuencia de las proporciones relativas de los residuos de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina (George & Abraham, 2006). El quitosano es un ingrediente alimenticio no digerible que es biológicamente renovable, biodegradable, biocompatible, no antigénico, no tóxico y biofuncional (Malafaya et al., 2007). En un ambiente ácido, el quitosano está cargado positivamente y es soluble debido a la protonación de los grupos amino de la glucosamina (Antoniou et al., 2015). A un pH mayor el quitosano tiende a perder su carga y puede precipitarse en la solución debido a la deprotonación de los grupos amino (Sharma et al., 2018).

El quitosano ha demostrado ser un buen compuesto antimicrobiano y antifúngico, además, se ha propuesto su uso para combatir virus, aunque aún está en investigación su propiedad antiviral. La razón de la eficacia antimicrobiana se explica por la unión del quitosano catiónico a las moléculas aniónicas de la superficie externa de la membrana bacteriana (Boonsongrit et al., 2006). El quitosano tiene una carga positiva y las paredes celulares bacterianas tienen una carga negativa; en la interacción, el quitosano interrumpe la pared celular debido al desequilibrio de carga, lo que lleva a la muerte de las células bacterianas (Chopra & Ruhi, 2016).

La actividad antifúngica de los nanomateriales a base de quitosano ha sido evaluada contra diferentes géneros de hongos por su efecto sobre el crecimiento del micelio, la esporulación y sus arreglos moleculares. Las nanopartículas de cobre - quitosano a una concentración de 0.1% mostraron actividad contra *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani* con 89.5%, 63.0% y 60.1% de inhibición del crecimiento, respectivamente (Saharan et al., 2013). Los efectos antivirales de los nanomateriales a base de quitosano se han estudiado menos en comparación con sus actividades antibacterianas y antifúngicas, pero el quitosano se ha considerado como un potencial agente antiviral en plantas, animales y microorganismos (Chirkov, 2002).

Propiedades fisicoquímicas del quitosano

El quitosano es un material que tiene diversas propiedades y características que pueden ser determinadas por diferentes técnicas (Tabla 1). Cada una de estas propiedades determinan la actividad que el quitosano pueda tener al momento de interactuar con algún organismo o compuesto.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del quitosano (modificado de Li et al., 1992).

Propiedad	Determinado por:
Grado de deacetilación	Espectrofotometría UV Adsorción de colorantes Espectrometría IR Titulación metacromática Cromatografía de gases
Peso molecular	Cromatografía Dispersión de la luz Viscosimetría
Viscosidad	<i>Afectado por:</i> Fuerza iónica Tiempo de deacetilación Peso molecular Concentración
Solubilidad	Usualmente disuelto cuando el pH < 6 pero también <i>afectado por:</i> Mezcla del solvente Deacetilación Salvación Modificación química
Capacidad de coagulación	<i>Unión para:</i> Iones metálicos Polímeros aniónicos Aminoácidos Proteínas DNA Células Colorantes Sólidos

Aplicaciones del quitosano

El quitosano es un polímero flexible que puede ser utilizado en diferentes aplicaciones tecnológicas (Tabla 2). Este trabajo está enfocado principalmente en la formación de nanopartículas a base de quitosano para su posible uso agrícola.

Tabla 2. Aplicaciones del quitosano (modificado de Li et al., 1992).

Aplicación	Ejemplos
Tratamiento de aguas	Remoción de iones metálicos Floculante/Coagulante: Proteínas Colorantes Aminoácidos Filtración
Pulpa y papel	Tratamiento de superficies Papel fotográfico Papel de copia sin carbón
Medica	Vendas, esponjas Vasos sanguíneos artificiales Control de colesterol en la sangre Inhibición de tumores Membranas Inhibición dental de placa Quemaduras en la piel/ Piel artificial Fluido humor del ojo Lentes de contacto Liberación controlada de fármacos Tratamiento de enfermedades óseas
Cosméticos	Maquillaje en polvo Esmalte de uñas Hidratantes Accesorios Loción de baño Cremas para cara, mano y cuerpo Pasta dental Mejora la espuma
Biotecnología	Inmovilización de enzimas Separación de proteínas Cromatografía Recuperación celular Inmovilización celular Electrodo de glucosa
Agricultura	Recubrimiento de semillas Recubrimiento de las hojas Hidroponía/Fertilizante Liberación controlada de agroquímicos
Comida	Remoción de colorantes, sólidos, ácidos Conservantes Estabilización del color Aditivo para pienso
Membranas	Ósmosis inversa Control de permeabilidad Separación de solventes

Sistema inmune de la planta

Aunque las plantas carecen de las células inmunes circulantes que se encuentran en los vertebrados, estas poseen un sistema inmune innato que puede detectar y limitar la colonización de patógenos (Thomma et al., 2011; Spoel & Dong, 2012; Asai & Shirasu, 2015).

El sistema inmune de la planta utiliza receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en la superficie celular para examinar las moléculas que contienen patrones característicos que son únicos y ampliamente conservados en los microbios. La detección de estos patrones moleculares asociados a patógenos/microbios (PAMPs/MAMPs) conduce a la activación del sistema inmune activada por patrones (PTI). En muchos casos, la PTI previene una mayor colonización de patógenos. Sin embargo, algunos patógenos han desarrollado proteínas efectoras que suprimen la PTI. Estos patógenos se combaten a través de la inmunidad activada por efectores (ETI), que comprende la otra rama del sistema inmune innato. La ETI se activa cuando las proteínas de resistencia codificadas por la planta, que generalmente se encuentran dentro de la célula vegetal, reconocen directa o indirectamente sus efectores codificados por patógenos afines (Dempsey & Klessig, 2017). Hien (2004) propuso que el quitosano participa en la activación de mecanismos de defensa en las plantas, estimulando el crecimiento de las raíces y la inducción de actividades enzimáticas.

Los parámetros fotosintéticos, incluyendo el contenido total de clorofila, los carotenoides y el agrandamiento del cloroplasto, se mejoraron en presencia de nanomateriales a base de quitosano (Van et al., 2013).

El ácido salicílico en la planta

El ácido salicílico (SA) (Figura 3) es un compuesto fenólico (que contiene un anillo de benceno con uno o más grupos hidroxilo) que regula muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta como: la germinación de semillas, el establecimiento de plántulas, el crecimiento celular, la respiración, la expresión génica asociada a la senescencia, la respuestas a estrés abióticos, el rendimiento de frutos, la regulación de la termogénesis y la resistencia a las enfermedades (Vlot et al., 2009).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que muchas de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) son agentes antimicrobianos efectivos para al menos ciertos patógenos bacterianos y fúngicos y que algunas son activadas por el SA; el tratamiento exógeno de SA mejora la resistencia a muchas bacterias, hongos y patógenos virales e induce la expresión de PR en una amplia variedad de especies de plantas dicotiledóneas (Dempsey et al., 1999). Sin embargo, la sobreexpresión de proteínas PR no siempre confiere una mayor resistencia al ataque de patógenos (Neuhaus et al., 1991). El efecto del SA exógeno sobre el crecimiento vegetativo depende de la especie de planta, la etapa de desarrollo y la concentración aplicada (Rivas & Plasencia, 2011). La vía de señalización de defensa mediada por SA se activa después de la infección por patógenos biotróficos, que requieren tejido vivo del huésped. Por el contrario, el ataque de patógenos necrotróficos, que se alimentan de tejido muerto, induce una vía de defensa distinta que está regulada por las hormonas vegetales tales como el ácido jasmónico (JA) y el etileno. Las vías de defensa mediadas por SA y JA/etileno son generalmente antagónicas (Dempsey & Klessig, 2017).

Las bajas concentraciones de SA inducen una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de bajo nivel, que sirven como señales secundarias para activar procesos biológicos. Por el contrario, las altas concentraciones de SA exógeno estimulan la acumulación de altos niveles de ROS, que causan estrés oxidativo y muerte celular (Vlot et al., 2009).

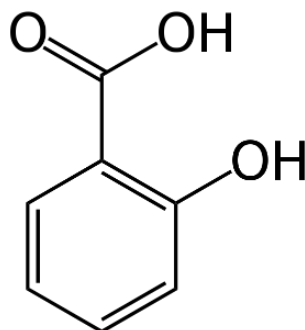


Figura 3. Estructura química del ácido salicílico (SA).

El cobre en la planta

El cobre (Cu) actúa como un elemento estructural en las proteínas reguladoras y participa en el transporte de electrones fotosintéticos, la respiración mitocondrial, las respuestas al estrés oxidativo, el metabolismo de la pared celular y la señalización hormonal. Los iones de Cu actúan

como cofactores en muchas enzimas como la superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD), citocromo C oxidasa, amino oxidasa, lacasa, plastocianina y polifenol oxidasa. Cuando estos iones no están disponibles, las plantas desarrollan síntomas de deficiencia específicos, la mayoría de los cuales afectan las hojas jóvenes y los órganos reproductivos (Yruela, 2005).

A altas concentraciones, el Cu puede volverse extremadamente tóxico causando síntomas como clorosis y necrosis, retraso en el crecimiento, decoloración de las hojas e inhibición del crecimiento de las raíces (Van Assche & Clijsters, 1990; Marschner, 1995). Por lo tanto, se altera el transporte de electrones cuando la planta se encuentra en un exceso o deficiencia de cobre (Figura 4).



Figura 4. La planta de lechuga a la derecha muestra una deficiencia de cobre en comparación con la que no es deficiente a la izquierda (imagen modificada de la Universidad de Minnesota).

Mecanismo de acción del cobre en las bacterias

Algunos estudios sugieren que el cobre, en concentraciones elevadas, tiene un efecto tóxico sobre las bacterias debido a la liberación de radicales de hidróperóxido, los iones de cobre potencialmente podrían sustituir iones esenciales para el metabolismo bacteriano como el hierro, interfiriendo inicialmente con la función de la membrana celular y luego a nivel del citoplasma alterando la síntesis proteica, ya sea inhibiendo la formación de proteínas o provocando la síntesis de proteínas disfuncionales, alterando la actividad de enzimas esenciales para el metabolismo bacteriano (Rodríguez-Montelongo et al., 1993; Gordon et al., 1994).

Quitosano como nanopartícula

Los nanomateriales basados en polímeros han ganado gran atención por su potencial para proporcionar protección inofensiva a las plantas mediante el uso de agentes que son biodegradables y naturales (Kah & Hofmann, 2014). La actividad antibacteriana propuesta más prevalente del quitosano es que se une a la pared celular bacteriana cargada negativamente, causando la interrupción de la célula, alterando así la permeabilidad de la membrana, seguida de la unión al ADN que causa la inhibición de la replicación del ADN y, posteriormente, la muerte celular (Nagy et al., 2011).

La aplicación de nanopartículas de quitosano activa varias enzimas relacionadas con la defensa, como la superóxido dismutasa y la catalasa, lo que fortalece aún más la capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y reducir el daño asociado a las membranas (Zeng & Luo, 2012).

La actividad antibacteriana del quitosano también depende de varios factores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Los factores intrínsecos incluyen el peso molecular y el grado de deacetilación del quitosano original, el tamaño y la concentración de nanopartículas, etc. Los factores extrínsecos incluyen pH, temperatura, tiempo de reacción, etc (Kong, et al., 2010).

La síntesis de las nanopartículas en este trabajo están basadas en una reacción llamada gelación iónica en donde los grupos amino protonados del quitosano son entrelazados por enlaces inter e intramoleculares por polianiones multivalentes (Antoniou et al., 2015). En este trabajo se utiliza al tripolifosfato de sodio (TPP) para llevar acabo los enlaces de las nanopartículas, el TPP es un polianión muy popular porque no es tóxico y forma geles con propiedades deseables (Kawashima et al., 1985; Gan et al., 2005; de Moura et al., 2009).

Hipótesis

Es posible sintetizar nanopartículas de quitosano cargadas con cobre y ácido salicílico de una manera práctica, eficiente y reproducible, además estas nanopartículas presentan actividad antimicrobiana.

Objetivo general

Sintetizar nanopartículas de quitosano cargadas con cobre y ácido salicílico.

Objetivos específicos

- Construir un sistema semi-automático de goteo para la síntesis práctica y eficiente de nanopartículas de quitosano.
- Diseñar un protocolo para la síntesis de nanopartículas de quitosano.
- Sintetizar nanopartículas de quitosano.
- Sintetizar nanopartículas de quitosano cargadas con cobre.
- Sintetizar nanopartículas de quitosano cargadas con ácido salicílico.
- Sintetizar nanopartículas de quitosano cargadas con cobre y ácido salicílico.
- Determinar la morfología y estabilidad de las nanopartículas sintetizadas por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y por medio de dispersión dinámica de luz (DLS).
- Caracterizar la estructura de las nanopartículas por medio de espectroscopía infrarroja (FTIR-ATR).
- Verificar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de quitosano sintetizadas.

Capítulo 3

Metodología

En el capítulo anterior se explicaron los conceptos fundamentales de este trabajo. En este capítulo se expondrá la metodología que se usó para llevar a cabo los experimentos. La síntesis de las nanopartículas está basada en la gelación iónica, que como se explicó en el capítulo anterior es cuando los grupos amino protonados del quitosano son entrelazados (entrecruzamiento) por enlaces inter e intramoleculares por polianiones multivalentes (el polianión en este caso es el tripolifosfato de sodio). El entrecruzamiento es la formación de enlaces químicos entre cadenas moleculares para formar redes tridimensionales de moléculas conectadas (Fink, 2013).

La mayoría de los protocolos para la síntesis de las nanopartículas de quitosano utilizan la ultra-centrifugación para recolectar las partículas con menor tamaño como el propuesto por Calvo y colaboradores en 1997 o variaciones del mismo como el que propusieron Koyani & Vazquez-Duhalt (2016). El protocolo que se propone elimina el uso de la ultra-centrifugación, lo que se traduce en menor costo, menor tiempo y permite fácilmente el escalamiento a volúmenes mayores. Elimina también la ultra-sonicación, que si bien reduce el tamaño de la partícula puede causar fragmentación en su estructura (Antoniou et al., 2015). Además, la síntesis que se propone es semi-automatizada, utilizando el proceso de gelación iónica, lo que permite obtener resultados con alta reproducibilidad y escalabilidad.

Materiales y métodos

Los reactivos empleados para la elaboración de la síntesis fueron: quitosano (CS) de cáscara de camarón $\geq 75\%$ (deacetilado), tripolifosfato de sodio (TPP), sulfato de cobre (II) pentahidratado y ácido salicílico (SA) probado en cultivo de células vegetales, todos ellos adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). El ácido acético glacial fue comprado de Faga Lab (Sinaloa, México). Todos los demás productos químicos y reactivos utilizados fueron de grado analítico y se encuentran disponibles comercialmente (etanol, reactivos para medio LB).

Sistema Poseidón modificado de (Booeshaghi et al., 2019)

Para la realización de este trabajo, se utilizó el sistema Poseidón diseñado por Booeshaghi et al., (2019), el cual es originalmente un sistema automático de goteo controlado, que además tiene un microscopio que sirve para examinar el dispositivo de microfluídica durante la operación. Este sistema se modificó y reconstruyó para tener únicamente el sistema de goteo (Figura 5). Antes de empezar a trabajar con el sistema es importante que la placa Arduino tenga el sketch instalado, de otro modo no podrá funcionar adecuadamente. Todos los archivos y modelos se pueden encontrar en la siguiente liga: <https://github.com/pachterlab/poseidon> (Booeshaghi et al., 2019). En la sección de anexos se presenta un manual detallado del uso del sistema Poseidón. Se utilizó una aguja de jeringa de insulina, puesto que la gota suministrada es más pequeña en comparación a la obtenida por una aguja de mayor tamaño, lo que favorece la obtención de las gotas de tamaño adecuado para formar las nanopartículas de quitosano.

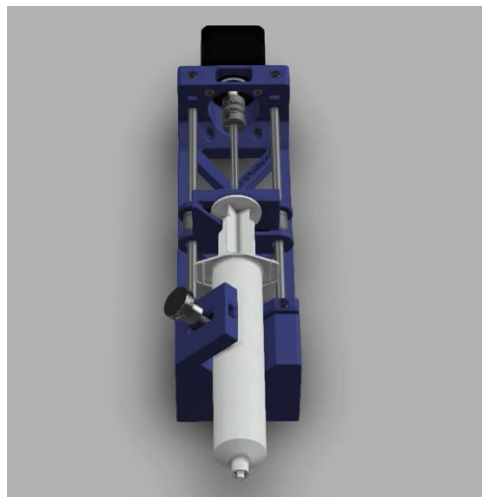


Figura 5. Modelo 3D del sistema Poseidón tomado de Booeshaghi et al., 2019.

Síntesis de nanopartículas

Para la síntesis de las nanopartículas de quitosano primero se hizo la preparación de una disolución de quitosano 0.25% (w/v) en agua ultra pura y 2% (v/v) de ácido acético glacial. Se dejó en agitación 24 horas; se centrifugó la disolución a $8000 \times g$ por 15 min a 4°C (rotor JA-14 Beckman) y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se centrifugó el sobrenadante a $11,000 \times g$ por 20 min utilizando el mismo rotor, se ajustó el pH a 4.5 con NaOH y la solución se filtró con papel filtro de $1.2 \mu\text{m}$, posterior a esto se filtró con papel filtro de $0.45 \mu\text{m}$ (Figura 6). Se agregaron 5 mL de quitosano a pH 4.5 mientras se agitaba a 800 rpm durante 10 min utilizando una barra de agitación y placa magnética rotatoria. Se agregaron 200 μL de agua o muestra a una velocidad de 0.09 mm/s de giro del motor del sistema Poseidón al cual se le acopló una jeringa de 1 mL y una aguja de insulina, se mantuvo en agitación por 15 min a 800 rpm, mientras tanto se preparó una solución de TPP 0.25% w/v y se filtra con una membrana de $0.45 \mu\text{m}$. El TPP se debe de preparar y filtrar siempre al momento de llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas (Figura 7). Se agregó 1 mL de TPP a una velocidad de 0.09 mm/s con una jeringa de 3 mL en el sistema Poseidón y se dejó una hora en agitación. Se añadieron 100 μL de glutaraldehído 2.5% a una velocidad de 0.09 mm/s con una jeringa de 1 mL en el sistema Poseidón y se dejó una hora en agitación. Se centrifugó a 3500 rpm 30 min a 4°C (Sorvall Legend RT Rotor 75006445) y se colectó el sobrenadante. Se centrifugó a 12000 rpm 1 hora (Thermo Heraeus Multifuge X1R Rotor 75003652) y se colectó el sobrenadante. La

centrifugación permite la separación de agregados de nanopartículas. En las figuras 8 y 9 se muestra parte del proceso de la elaboración de las partículas y un esquema general para la producción de las mismas.

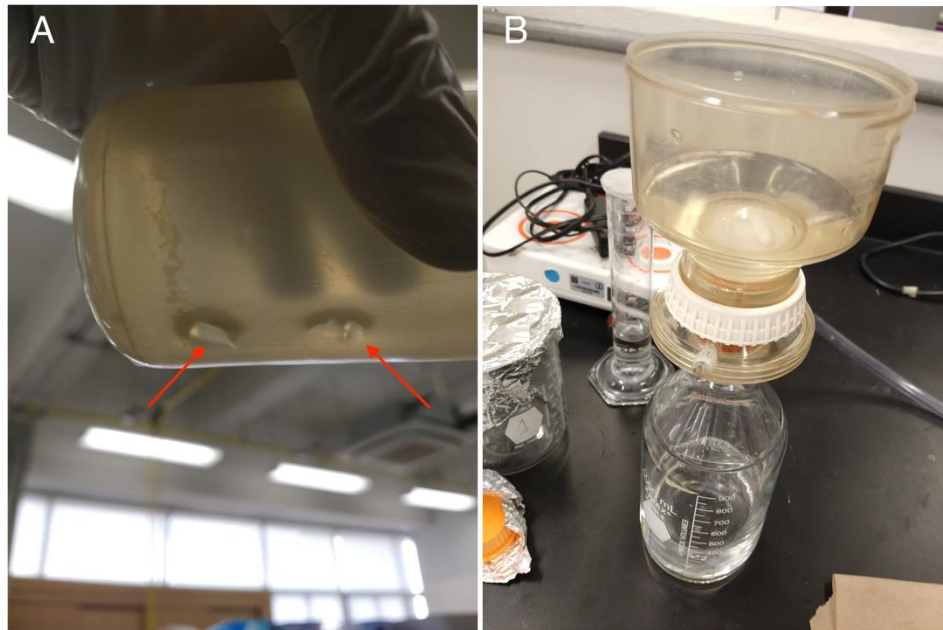


Figura 6. Eliminación de partículas grandes de quitosano. (A) mediante centrifugaciones se obtuvieron agregados de partículas grandes y (B) posteriormente se filtraron con membranas de 1.2 μm y 0.45 μm .



Figura 7. Membrana de 0.45 μm para filtrar el TPP. Se observan las partículas que se eliminaron del filtrado.

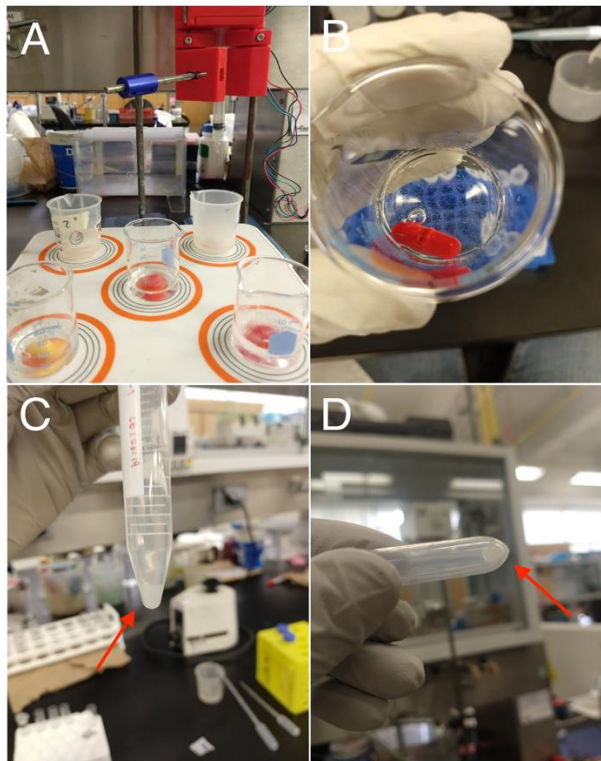


Figura 8. Síntesis de nanopartículas a base de quitosano. (A) Uso del sistema Poseidón para tener un sistema de goteo controlado, (B) proceso de la síntesis finalizado, se observan partículas que pueden llegar a las micras y para eso se hace una serie de centrifugaciones en donde en (C) se observa el primer pellet resultante de la primer centrifugación y en (D) el segundo pellet de la segunda y última centrifugación, después de esto se pueden hacer las mediciones por DLS y guardar a 4 °C.

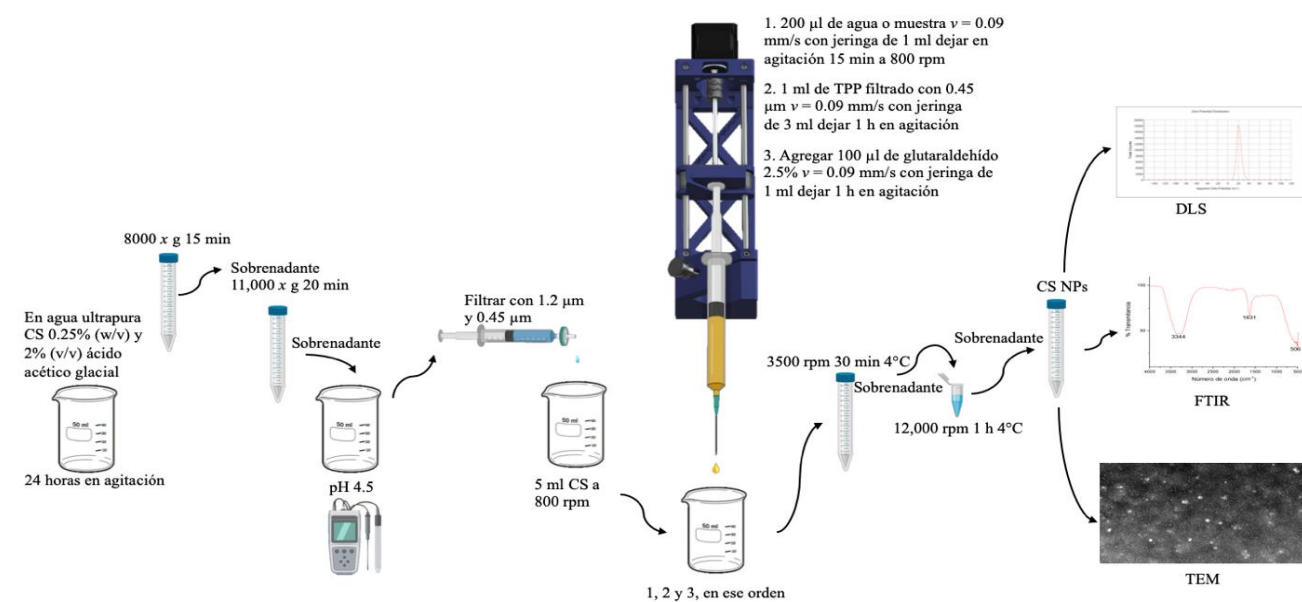


Figura 9. Esquema de la síntesis de nanopartículas de quitosano. Todo el proceso se hace a temperatura ambiente.

Estandarización del método

Para determinar los parámetros apropiados para la síntesis de las nanopartículas y su reproducibilidad se realizaron ensayos previos. Primero se probaron diferentes velocidades de centrifugación con las nanopartículas de quitosano sin cargar con el sistema Poseidón (Tabla 3). Los experimentos se hicieron por triplicado.

Tabla 3. Velocidades de prueba para la estandarización de la síntesis de nanopartículas.

Etiqueta	Velocidad
CS-A	9×10^{-1} mm/s
CS-B	9×10^{-2} mm/s
CS-C	4.5×10^{-3} mm/s
CS-D	2.25×10^{-3} mm/s

Se determinó la fracción en donde se encontraba el mayor volumen de nanopartículas más pequeñas, por mediciones de tamaño a través de DLS, de la muestra en el pellet (Tabla 4) y en el sobrenadante (Tabla 5).

Se puede observar que en el pellet (Figura 10) los tamaños de las nanopartículas aumentan reduciendo la velocidad del sistema y se obtienen tamaños menores a los 230 nm en volúmenes menores al 50%. En el caso del sobrenadante (Figura 11) a una velocidad de 9×10^{-2} mm/s se obtienen nanopartículas de 55.7 ± 13.8 nm.

Las réplicas determinaron que a una velocidad de 9×10^{-2} mm/s el tamaño de las nanopartículas era constante en el sobrenadante de la muestra (Tabla 5), por lo que esta velocidad fue la que se tomó como base para los ensayos para las nanopartículas ya cargadas con SA y Cu.

Tabla 4. Determinación del tamaño de las nanopartículas de quitosano en el pellet por DLS en la última fracción de la centrifugación.

Velocidad (mm/s)	Tamaño mínimo	% Volumen	Tamaño máximo	% Volumen	PDI
9×10^{-1}	148.6 ± 26.6 nm	14	785.8 ± 154.7 nm	86	0.35
9×10^{-2}	162.5 ± 31.9 nm	22.4	719.0 ± 158.0 nm	77.6	0.43
4.5×10^{-3}	204.0 ± 34.6 nm	51.3	1526.0 ± 296.8 nm	48.7	0.58
2.25×10^{-3}	228.9 ± 43.7 nm	44.4	1357.0 ± 389.6 nm	55.6	0.54

PDI = Índice de polidispersión

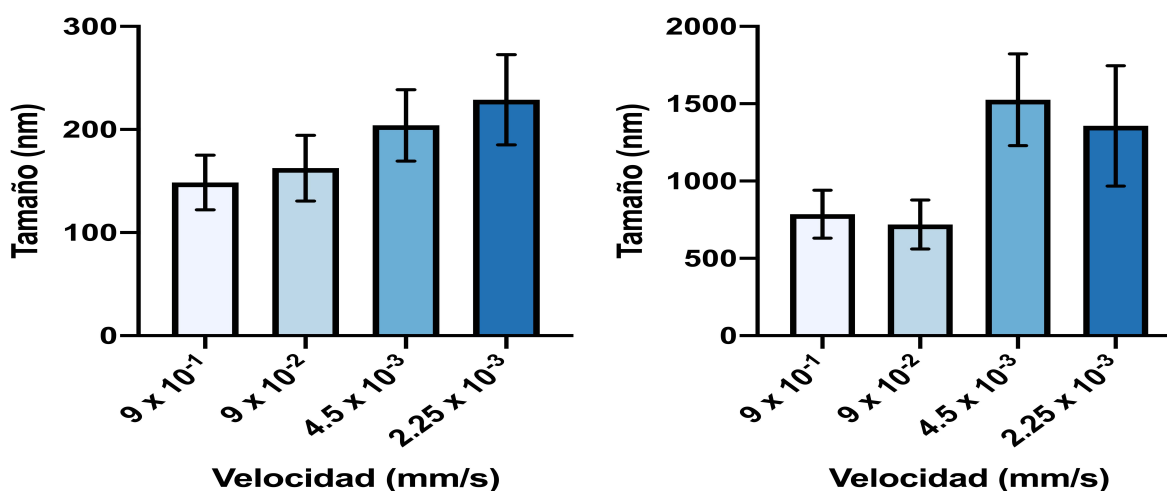


Figura 10. Estandarización del método de obtención de nanopartículas centrifugado a diferentes velocidades, el pellet de la muestra (última fracción de la centrifugación). Se muestran dos distribuciones de tamaño, una en donde se encuentran las nanopartículas más pequeñas (izquierda) y, otra en donde están las más grandes (derecha).

Tabla 5. Determinación del tamaño de las nanopartículas de quitosano en el sobrenadante por DLS en la última fracción de la centrifugación.

Velocidad (mm/s)	Tamaño mínimo	% Volumen	Tamaño máximo	% Volumen	PDI
9×10^{-1}	120.3 ± 26.8 nm	30.6	483.2 ± 130.3 nm	69.4	0.48
9×10^{-2}	55.7 ± 13.8 nm	51.1	327.7 ± 123.7 nm	48.9	0.44
4.5×10^{-3}	64.3 ± 12.0 nm	50.9	301.4 ± 78.0 nm	49.1	0.4
2.25×10^{-3}	59.0 ± 12.6 nm	42.8	338.3 ± 114.0 nm	57.2	0.49

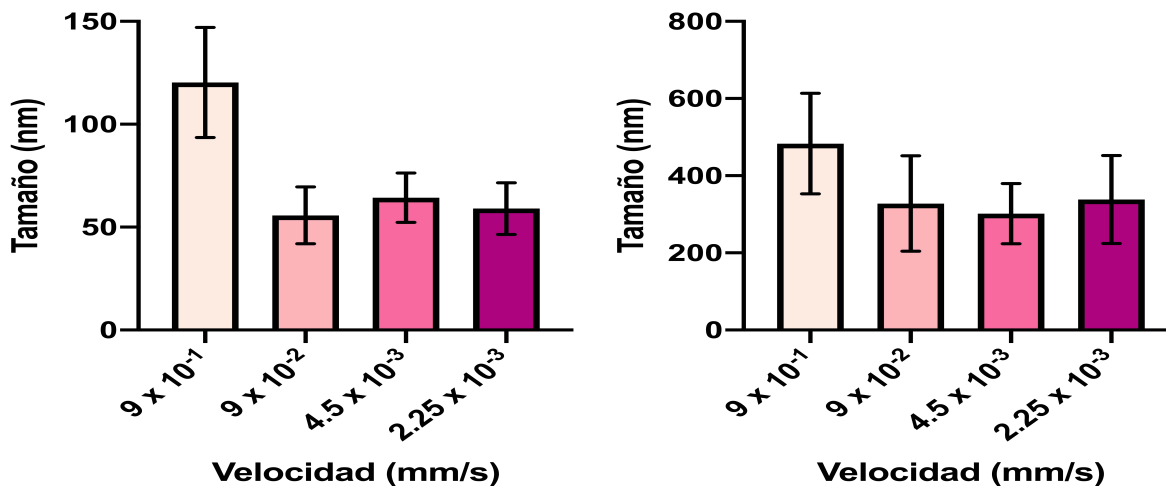


Figura 11. Estandarización del método a diferentes velocidades de centrifugación probadas en el sobrenadante de la muestra (última centrifugación). Se muestran dos distribuciones de tamaño, una en donde se encuentran las nanopartículas más pequeñas (izquierda) y, otra en donde están las más grandes (derecha).

Partículas elaboradas

Se prepararon: nanopartículas de quitosano (CS NPs), nanopartículas de cobre-quitosano (CuCS NPs), nanopartículas ácido salicílico-quitosano (SACS NPs) y nanopartículas de cobre-ácido salicílico-quitosano (CuSACS NPs).

Caracterización

La caracterización de las nanopartículas es fundamental, ya que se puede verificar el tamaño; además de asegurar que el cobre y el ácido salicílico están interactuando con el quitosano. Para esto se utilizaron diferentes técnicas tales como la dispersión dinámica de luz (DLS), espectroscopía infrarroja (FTIR) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), cada una se detalla a continuación.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz se utiliza para medir el tamaño de partícula y el tamaño molecular. Esta técnica mide la difusión de partículas en movimiento Browniano, y convierte este valor a tamaño y a una distribución de tamaño utilizando la relación de Stokes-Einstein (Ecuación 1).

El movimiento browniano es el movimiento aleatorio de partículas debido al bombardeo de las moléculas solventes que las rodean, cuanto más grande sea la partícula, más lento será el movimiento browniano. La velocidad del movimiento browniano se define por una propiedad conocida como el coeficiente de difusión (Malvern Panalytical Ltd., 2018).

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Ecuación 1

donde:

$d(H)$ = diámetro hidrodinámico

D = coeficiente de difusión traslacional

k = constante de Boltzmann

T = temperatura absoluta

η = viscosidad

Las fases en el detector de la luz dispersada desde diferentes partículas dependen de las posiciones relativas de las partículas en relación con la dirección de los haces de luz entrantes y dispersos. Por lo tanto, en un instante dado, la intensidad dispersada total en un ángulo de dispersión dado depende de las posiciones de las partículas (estructura). Sin embargo, las partículas poseen movimiento browniano por lo cual sus posiciones fluctúan. Por lo tanto, la intensidad dispersada también fluctúa. Estas fluctuaciones de intensidad dispersadas ocurren en la escala de tiempo que toma una partícula para mover una fracción significativa de la longitud de onda de la luz (Pecora, 2000).

La distribución de tamaño, el índice de polidispersión (PDI) y el potencial zeta de las nanopartículas fueron determinados por la técnica de dispersión dinámica de luz usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Las muestras fueron analizadas por triplicado a 25 °C. Para medir la muestra se tomaron 200 μ L de las nanopartículas sintetizadas y se le

agregaron 1300 μL de agua MiliQ. Para medir las distribuciones de tamaño se utilizó una celda ZEN0040 (Malvern).

Potencial Zeta

La carga adquirida por una partícula o molécula en un medio dado es su potencial zeta y surge de la carga superficial y la concentración y los tipos de iones en la disolución. En otras palabras, es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas y es uno de los parámetros que se sabe, afectan a la estabilidad. Dado que las partículas de carga similar se repelen entre sí, aquellas con cargas altas resistirán la floculación y la agregación durante períodos más largos, haciendo que esas muestras sean más estables. La microelectroforesis de láser Doppler se utiliza para medir el potencial zeta. Se aplica un campo eléctrico a una solución de moléculas o a una dispersión de partículas, que entonces se mueven con una velocidad relacionada con su potencial zeta. Esta velocidad se mide utilizando una técnica interferométrica de láser patentada llamada dispersión de luz para análisis de fase (M3-PALS, por sus siglas en inglés). Esto permite el cálculo de la movilidad electroforética, y a partir de esta, se obtiene el potencial zeta y la distribución de potencial zeta (Malvern Instruments, 2004). Para medir el potencial Zeta se utilizó una celda DTS1070 (Malvern).

Índice de polidispersión

Las dispersiones de nanopartículas son a menudo polidispersas; es decir, puede haber partículas con una distribución de tamaños y formas en lugar de partículas de un solo tamaño y forma (Pecora, 2000). Cuando el $\text{PDI} = 1$, todas las moléculas son de un mismo tipo y se dice entonces que la mezcla es monodispersa. El índice de polidispersión es determinado en conjunto con la distribución de tamaño y, por lo tanto, se utiliza la misma celda.

Caracterización de las nanopartículas por espectroscopia infrarroja (FTIR)

Las características estructurales de las nanopartículas fueron evaluadas mediante FTIR (Bruker, Alpha II, USA) con un accesorio ATR (reflexión total atenuada) y un rango de 4000 a 400 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} . Para realizar las gráficas se utilizó el software Origin. El accesorio ATR permite medir diferentes líquidos y sólidos sin necesidad de una compleja preparación de

la muestra. Cabe resaltar que sólo es necesario colocar una gota de muestra para poder obtener el espectro de FTIR de las nanopartículas.

La espectroscopía de infrarrojo es una técnica de amplia utilidad en química para la determinación de grupos funcionales en sistemas moleculares. En las técnicas espectroscópicas se da la interacción de la materia con la radiación. Esta interacción provoca efectos tales como la absorción¹ o la difusión; cuando una molécula absorbe o emite un fotón, su estado energético cambia (los procesos de absorción y emisión sólo pueden darse a determinadas frecuencias de los fotones). Este cambio se manifiesta como un cambio en la energía traslacional de la molécula y como un cambio en su estado electrónico vibracional o rotacional. El conjunto de frecuencias a las que se producen estos procesos es propio de cada molécula. Para cada molécula dada, su espectro de adsorción²/emisión constituye una huella dactilar de la misma (esta es característica de cada compuesto, en la que pequeñas diferencias en la estructura de la molécula dan lugares a variaciones muy importantes en los máximos de absorción).

Tabla 6. Rangos de longitud de onda de espectrofotometría infrarrojo.

Infrarrojo cercano (NIR)	780 nm – 2500 nm (12800 cm ⁻¹ – 4000 cm ⁻¹)
Infrarrojo medio (MIR)	2.5 μm – 25 μm (4000 cm ⁻¹ – 400 cm ⁻¹)
Infrarrojo lejano	25 μm – 400 μm (400 cm ⁻¹ – 25 cm ⁻¹)

Caracterización de las nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La caracterización morfológica de las nanopartículas fue evaluada por microscopía electrónica de transmisión (Hitachi, H7500, Japón). Operado a 80 kV usando rejillas de cobre PELCO®. La microscopía electrónica de transmisión se basa en un haz de electrones que, manejado a través de lentes electromagnéticas se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío (para que los electrones puedan desprenderse de la fuente luminosa). Por lo tanto, los electrones del haz atraviesan la muestra y estos chocan con los átomos de la muestra.

¹ **Absorción.** Fenómeno de sorción en el que átomos, moléculas o iones pasan de una fase fluida (líquido o gas) a otra fase que puede ser fluida o sólida. En la absorción hay transferencia de materia de una fase A (**absorbato**) a una fase B (**absorbente**), la sustancia absorbida difunde en el material absorbente y queda disuelta o dispersa en él.

² **Adsorción.** Proceso por el cual átomos, iones o moléculas de gases, líquidos o sólidos disueltos son atrapados o retenidos en una superficie.

Obteniendo información estructural de la muestra según las pérdidas específicas de los diferentes electrones del haz. Obteniendo una imagen latente.

Para teñir las muestras se agregaron 10 μL de muestra sobre la rejilla, se dejó secar por 2:30 min, se secó el excedente con papel filtro, después se agregaron 6 μL de acetato de uranilo 4% v/v y se dejaron secar por 1:30 min, de igual manera quitando el excedente con papel filtro. Posterior a esto, se analizaron al TEM para verificar el tamaño y morfología de las nanopartículas.

Ensayos de inhibición microbiana

Para los ensayos de inhibición se utilizó a *Staphylococcus aureus* como organismo de prueba (debido a que era la cepa con la que se contaba). Se ajustó la densidad óptica a 0.1 en medio LB con un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (Thermo, US). Utilizando diferentes tratamientos: CS NPs, CuCS NPs, SACS NPs y CuSACS NPs a concentraciones de 1.96, 1.49, 1 y 0.2 mg/mL en placas de 96 pozos. Se dejaron en agitación e incubación a 37 °C por 24 horas para poder medir absorbancia en un espectrofotómetro Multiskan™ Go (Thermo, US).

Capítulo 4

Resultados y discusión

Sistema Poseidón modificado de (Booeshaghi et al., 2019)

Se obtuvo un sistema de goteo semi-automatizado para la correcta y eficiente síntesis de las nanopartículas (Figura 12). Este mecanismo permitió reducir el error que se tenía por pipeteo, ya que en ocasiones era demasiado cansado y era difícil controlar la cantidad suministrada (tomando en cuenta que se tenía que dejar caer una gota aproximadamente cada 5 segundos). Este tipo de sistemas ayudan a automatizar un proceso y reducir costos de producción en el caso que se deseara escalar la síntesis de las nanopartículas.

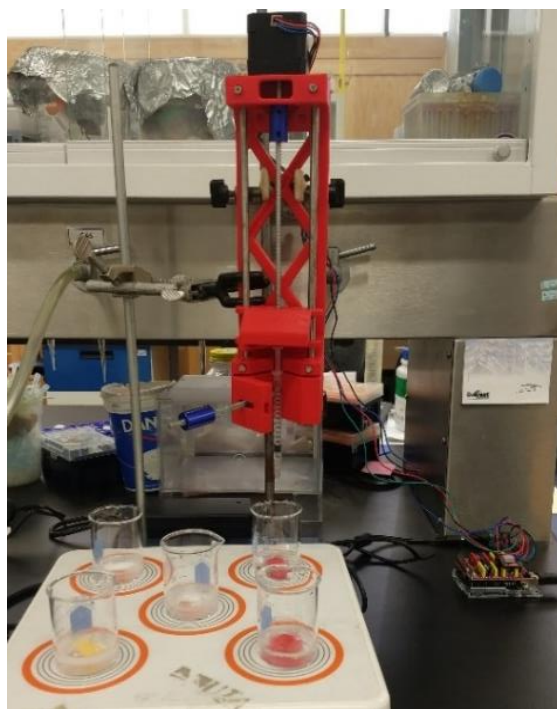


Figura 12. Sistema Poseidón montado para la síntesis de las nanopartículas.

Análisis dispersión dinámica de luz (DLS)

A continuación, se presentan los datos obtenidos para la caracterización por dispersión dinámica de luz para las partículas con Cu y SA (Figura 13). El quitosano (CS) antes de la formación de las nanopartículas tuvo un tamaño de 16.60 ± 9.28 nm y una vez formadas aumentó aproximadamente dos veces (Tabla 7). Por otro lado, el quitosano tuvo un índice de polidispersión (PDI) de 0.79 comparado con las nanopartículas de quitosano con un PDI de 0.32. Esto indica que las nanopartículas son de tamaños variados, con tamaños mínimos y máximos, en donde arriba del 50% en volumen de la muestra fueron mínimos.

Tabla 7. Nanopartículas de quitosano cargadas, tamaños mínimos y máximos.

Nombre	Tamaño mínimo	% Volumen	Tamaño máximo	% Volumen	PDI
CS	16.6 ± 9.3 nm	98.2	711.3 ± 385.0 nm	1.8	0.79
CS NPs	46.0 ± 8.3 nm	62.8	272.4 ± 78.0 nm	37.2	0.32
CuCS NPs 0.01%	54.2 ± 11.9 nm	62.5	260.0 ± 75.7 nm	37.5	0.42
CuCS NPs 0.1%	29.0 ± 5.8 nm	73.2	200.0 ± 67.5 nm	26.8	0.29
SACS NPs 0.1%	49.5 ± 16.2 nm	59.1	311.5 ± 154.0 nm	40.9	0.32
CuSACS NPs	41.4 ± 14.6 nm	65.1	296.3 ± 158.0 nm	34.9	0.33

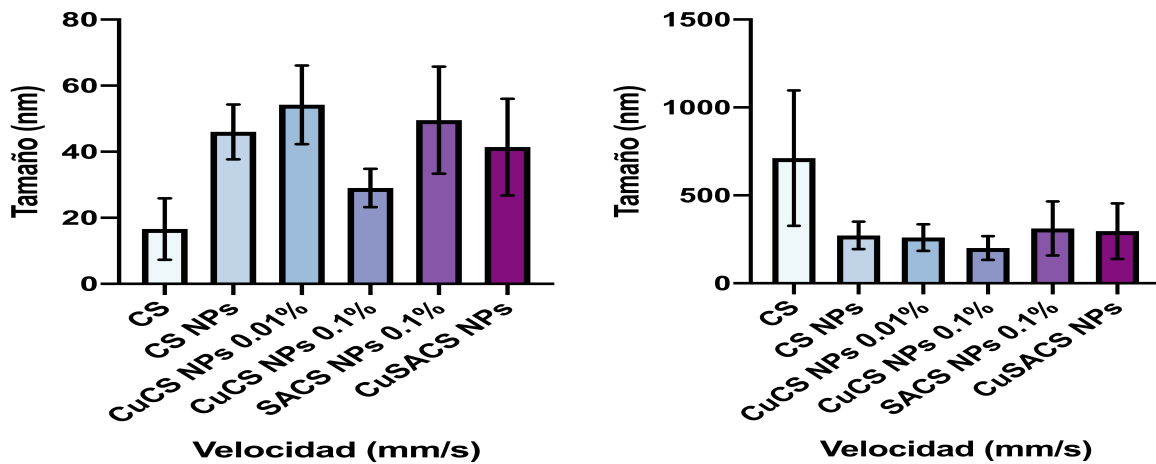


Figura 13. Nanopartículas de quitosano cargadas. Se muestran dos distribuciones de tamaño, las nanopartículas pequeñas (izquierda) y partículas más grandes (derecha).

En lo que respecta al potencial zeta, el quitosano solo tuvo una carga de 21.1 ± 4.6 mV, y las nanopartículas de quitosano el potencial zeta aumentó a 30.3 ± 5.2 mV (Tabla 8). En general, esto demuestra que las nanopartículas eran estables.

Tabla 8. Potencial Zeta obtenido para las nanopartículas cargadas y sin cargar.

Nombre	Potencial Zeta
CS	21.1 ± 4.6 mV
CS NPs	30.3 ± 5.2 mV
CuCS NPs 0.01%	40.2 ± 3.6 mV
CuCS NPs 0.1%	41.4 ± 4.1 mV
SACS NPs 0.1%	44.2 ± 4.3 mV
CuSACS NPs	29.8 ± 17.3 mV

En trabajos previos, sobre el tamaño y potencial zeta de las nanopartículas los potenciales zetas fueron diferentes pero cercanos a los obtenidos aquí, pero el tamaño de las nanopartículas obtenidas fue menor (Tabla 9). Esto puede explicarse debido a que las técnicas para la obtención de las nanopartículas siguieron procedimientos distintos a los realizados en este trabajo.

Tabla 9. Nanopartículas de quitosano reportadas, tamaño y potencial zeta.

Tipo de NPs	Tamaño reportado	Potencial Zeta	Referencia
CS NPs	150 ~ 250 nm	+30 ± 5.3 mV	(Lee et al., 2016)
CS NPs	46.0 ± 8.3 nm	+30.3 ± 5.2 mV	Este trabajo
SACS NPs	473.2 ± 20.4 nm	No reportado	(Boonsongrit et al., 2006)
SACS NPs	148 ± 8.6 a 345 ± 12.9 nm	+34.26 ± 0.39 a +42.43 ± 2.84 mV	(Ji et al., 2011)
SACS NPs	368.7 ± 0.05 nm	+34.1 mV	(Kumaraswamy et al., 2019)
SACS NPs	49.5 ± 16.2 nm	+44.2 ± 4.3 mV	Este trabajo
CuCS NPs	374 ± 8.2 nm	+22.6 mV	(Saharan et al., 2015)
CuCS NPs	29.0 ± 5.8 nm	+29.8 ± 17.3 mV	Este trabajo

Análisis de tipos de enlaces por espectroscopía infrarroja (FTIR)

En la Figura 14 se pueden observar las bandas de alrededor 3400 cm⁻¹ las cuales indican un estiramiento de los enlaces -OH y -NH₂, las bandas de alrededor de 1600 cm⁻¹ indica que se ha producido una interacción entre los grupos NH₃⁺ del quitosano y el TPP dentro de las nanopartículas. En 500 cm⁻¹ un estiramiento del anillo de piranosa. Alrededor de 1650 cm⁻¹

corresponde al grupo carboxílico del ácido salicílico el cual puede estar superpuesto por la interacción del TPP con el quitosano. La unión de Cu y SA con el quitosano induce la redistribución de las frecuencias de vibración, pasando de 3344 cm^{-1} a 3324 cm^{-1} y de 1631 cm^{-1} a 1635 cm^{-1} . De este análisis se puede inferir que se logró la interacción del TPP con el quitosano formando las nanopartículas, además de la interacción con el cobre y el ácido salicílico. Los espectros obtenidos son similares a los que presentan, Ji et al., (2011), Muthukrishnan, (2015) y Divya et al., (2019).

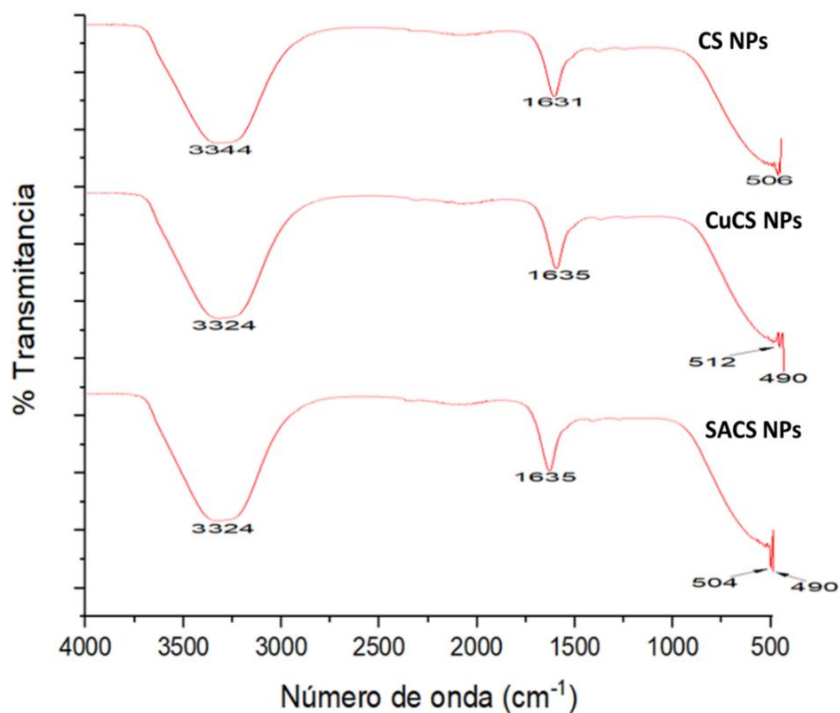


Figura 14. Espectros obtenidos para diferentes nanopartículas sintetizadas a base de CS.

Morfología de las nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para evitar la agregación de las nanopartículas de quitosano debido al fenómeno de secado, se realizó una dilución de las partículas en agua MilliQ (1:20) para poder observar nanopartículas individuales. El análisis de las nanopartículas se realizó con el software ImageJ para verificar el tamaño obtenido en las micrografías por TEM. En general, todas las nanopartículas mostraban tamaños similares a los obtenidos por el análisis de dispersión dinámica de luz (DLS), en las nanopartículas de quitosano (CS NPS) fue mayor la distribución de partículas grandes. Se

observaron también estructuras tipo gusano (worm-like), nanopartículas, con morfología característica, no esférica (Figura 15). Donde kx era la magnificación que mostraba el TEM.

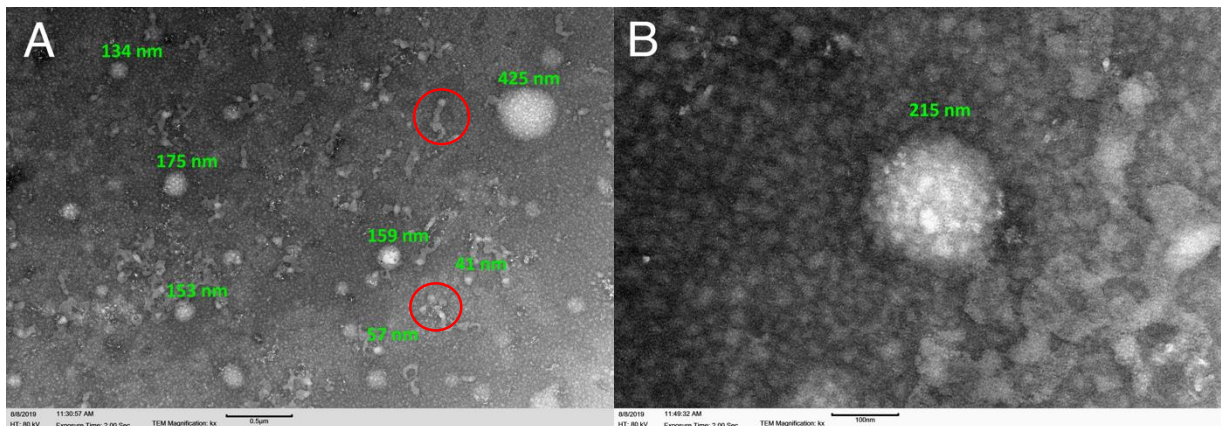


Figura 15. CS NPs sin diluir observadas en TEM. Diferentes tamaños a (A) 15kx y (B) a 80kx.

En el caso de las nanopartículas de cobre con quitosano (CuCS NPs) se tuvo que hacer una dilución 1:20, ya que la alta concentración de partículas impedía su observación. En promedio mostraban un tamaño menor a los 50 nm (Figura 16).

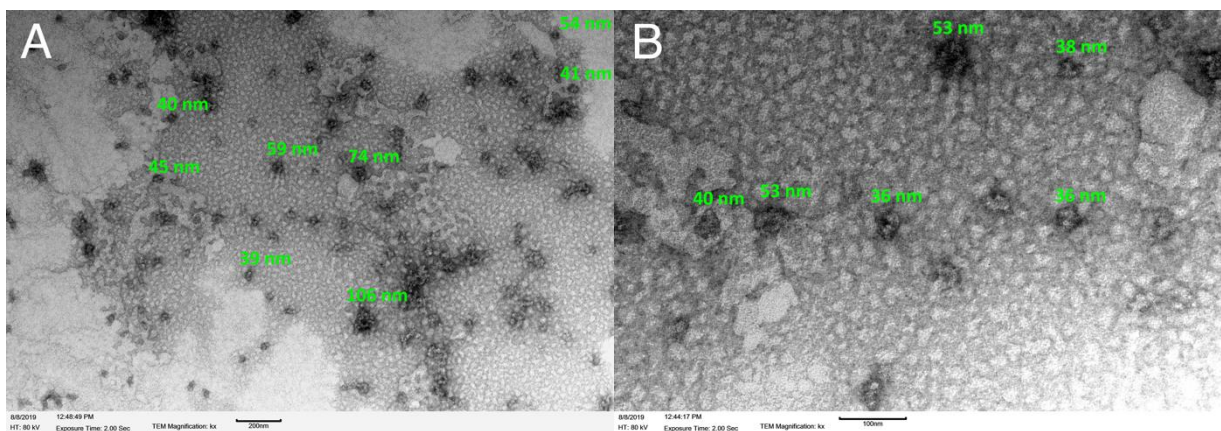


Figura 16. CuCS NPs diluidas: (A) a 25kx y (B) a 80kx.

En las nanopartículas sin diluir de CuCS y SACS se obtuvieron partículas con morfologías esféricas. Se puede observar que al agregar el Cu y el ácido salicílico tienden a formar esferas de tamaños menores a los 50 nm (Figura 17).

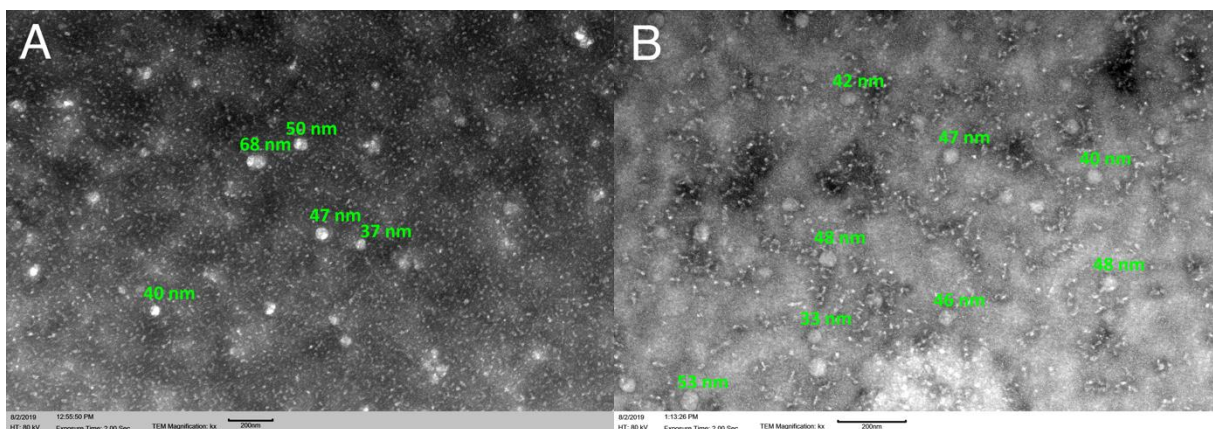


Figura 17. (A) CuCS NPs sin diluir a 25kx; (B) SACS NPs sin diluir 40kx.

Ensayos de inhibición microbiana

En los ensayos para evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de quitosano obtenidas se observó que las nanopartículas de quitosano sin cargar tienen actividad de inhibición sobre *S. aureus*, pero cuando están cargadas hay un efecto mayor (Figura 18). A una concentración de 1 mg/mL el porcentaje de supervivencia con CS NPs fue de 27.1%, mientras que cuando está cargada con Cu fue de 11.2% y con SA de 15.4%. Con la combinación de CuSA hubo una tasa de supervivencia del 8%. A una concentración de 0.2 mg/mL la combinación del cobre con el ácido salicílico no fue mejor que con el ácido salicílico solo, pero sí mucho más eficaz que con el cobre o que con el quitosano. A una concentración de 1.49 mg/mL las nanopartículas tuvieron porcentajes de supervivencia en *S. aureus* de 9.9% (CS NPs), 7.9% (CuCS NPs), 6.7% (SACS NPs) y 4.4% (CuSACS NPs). Así las nanopartículas de CuSACS NPs tuvieron mayor efectividad. A una concentración de 1.96 mg/mL (la cual es la más alta) se observaron porcentajes de supervivencia de 5.6% (CS NPs), 2.5% (CuCS NPs), 2.9% (SACS NPs) y 2.4% (CuSACS NPs). Haciendo un análisis de varianza se observó que las concentraciones de 0.2 y 1 mg/mL para todas las nanopartículas era diferente, en cambio para 1.49 y 1.96 mg/mL no hay cambio entre tratamientos, eso puede significar que a esas concentraciones el efecto es el mismo. Del mismo modo, se hizo la prueba Tukey para comprobar que nanopartículas funcionaban mejor, siendo las SACS NPs a una concentración de 0.2 mg / mL, seguidas por CuCS NPs a una concentración de 1 mg/ mL.

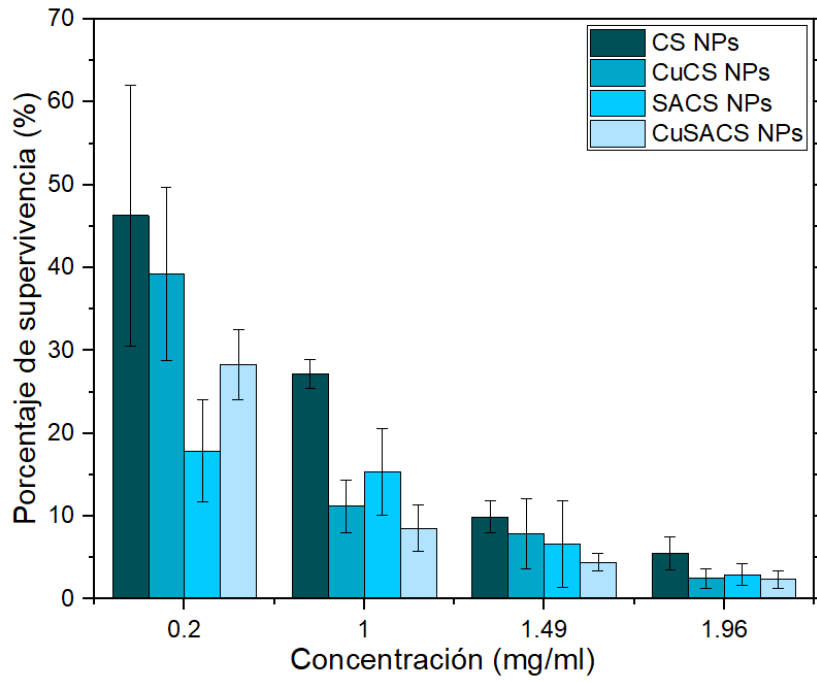


Figura 18. Tratamiento con nanopartículas a base de quitosano para *S. aureus*.

Capítulo 5

Conclusiones

Se logró estandarizar un método práctico, eficiente y altamente reproducible para la producción de nanopartículas a base de quitosano: CS NPs, CuCS NPs, SACS NPs y CuSACS NPs con la construcción del sistema Poseidón. El cual, hasta el momento no se ha reportado para el uso de la síntesis de nanopartículas de quitosano. Este sistema presenta una ventaja al momento de llevar a cabo la reacción para la construcción de las nanopartículas ya que, evita el error causado por la persona que lleva a cabo la síntesis manual (generalmente, por problemas de pipeteo).

Se caracterizaron las nanopartículas por diferentes técnicas como dispersión dinámica de luz (DLS) obteniendo tamaños de 16.6 ± 9.3 nm (CS), 46.0 ± 8.3 nm (CS NPs), 54.2 ± 11.9 nm (CuCS NPs 0.01%), 29.0 ± 5.8 nm (CuCS NPs 0.1%), 49.5 ± 16.2 nm (SACS NPs 0.1%) y 41.4 ± 14.6 nm (CuSACS NPs), obteniendo potenciales zeta de entre 20 mV y 40 mV para las NPs, demostrando ser estables. Los análisis de espectroscopía infrarroja (FTIR) demostraron la unión de las nanopartículas con el cobre y el ácido salicílico. Los análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron la morfología esférica de las nanopartículas, aunque también las había de tipo gusano (worm-like). Se hizo una comparación de las nanopartículas con las que existen en la literatura, demostrando que se puede hacer omisión de la ultracentrifugación para su colecta.

Los ensayos de inhibición demostraron actividad de las nanopartículas con el organismo *S. aureus*. Utilizando concentraciones de 0.2, 1, 1.42 y 1.96 mg/mL de las NPs. A una concentración de 1.96 y 1.42 mg/mL se observó que no hay diferencia entre esos tratamientos al hacer un análisis de varianza. A una concentración de 1 y 0.2 mg/mL las nanopartículas tenían

efectos diferentes, realizando una prueba Tukey se demostró que el tratamiento que mejor funcionó fue el de SACS NPs.

Perspectivas

En futuros trabajos, se propone probar las nanopartículas con cepas patógenas de plantas para determinar el efecto que tienen en su control, aunque actualmente en este trabajo se ha demostrado que la mayoría de las nanopartículas sintetizadas funcionan como control para *S. aureus* (el cual es un agente patógeno no proveniente de plantas). Seguido de estas pruebas seguiría el tratamiento en plantas para comprobar su efectividad.

Bibliografía

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688–1713.
- Alarcón-Payán, D. A., Koyani, R. D., & Vazquez-Duhalt, R. (2017). Chitosan-based biocatalytic nanoparticles for pollutant removal from wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, 100, 71–78.
- Alvarez-Aramberri, J., Bakr, S. A., Pardo, D., & Barucq, H. (2015). Quantities of interest for surface based resistivity geophysical measurements. *Procedia Computer Science*, 51(1), 964–973.
- Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, J., Yokoyama, W., & Zhong, F. (2015). Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 465, 137–146.
- Asai, S., & Shirasu, K. (2015). Plant cells under siege: Plant immune system versus pathogen effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 28, 1–8.
- Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2011). A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, 1–29.
- Bhuvaneshwari, S., & Sivasubramanian, V. (2013). Comparative studies for chitosan yield and chelating ability of *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. *Indian Journal of Biotechnology*, 12(3), 429–431.
- Booeshaghi, A. S., Beltrame, E. da V., Bannon, D., Gehring, J., & Pachter, L. (2019). Design principles for open source bioinstrumentation: the poseidon syringe pump system as an example. *BioRxiv*, 521096.
- Boonsongrit, Y., Mitrevej, A., & Mueller, B. W. (2006). Chitosan drug binding by ionic interaction. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62(3), 267–274.
- Calvo, P., Remuñan-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines. *Pharmaceutical Research*, 14(10), 1431–1436.
- Chung, Y. C., & Chen, C. Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, 99(8), 2806–2814.
- De Moura, M. R., Aouada, F. A., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Krochta, J. M., & Mattoso, L. H. C. (2009). Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 448–453.
- Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2017). How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biology*, 15(1), 1–11.
- Dempsey, D. A., Shah, J., & Klessig, D. F. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(4), 547–575.
- Divya, K., Vijayan, S., Nair, S. J., & Jisha, M. S. (2019). Optimization of chitosan nanoparticle synthesis and its potential application as germination elicitor of *Oryza sativa* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 1053–1059.
- Fink, J. K. (2013). Crosslinking Agents. *Hydraulic Fracturing Chemicals and Fluids Technology*, 40(April), 159–168.
- Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., & McCarron, P. (2005). Modulation of surface charge, particle size and

- morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(2–3), 65–73.
- George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 1–14.
- Gordon, A. S., Howell, L. D., & Harwood, V. (1994). Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations. *Canadian journal of microbiology*, 40(5), 408–411.
- Hassan, O., & Chang, T. (2017). Chitosan for Eco-friendly Control of Plant Disease. *Asian Journal of Plant Pathology*, 11(2), 53–70.
- Hauer, H. (1978). *The chelating properties of Kytex H chitosan*. 49, 263–276.
- Hudson, S. M., & Jenkins, D. W. (2001). Chitin and Chitosan. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* (Vol. 8, Issue 6, pp. 355–365). John Wiley & Sons, Inc.
- Ibrahim, H. M., & El-Zairy, E. M. R. (2015). Chitosan as a Biomaterial — Structure, Properties, and Electrospun Nanofibers. *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*.
- Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S. V., & Tamura, H. (2010). Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 227–232.
- Ji, J., Hao, S., Wu, D., Huang, R., & Xu, Y. (2011). Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid. *Carbohydrate Polymers*, 85(4), 803–808. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.051>
- Jia, X., Meng, Q., Zeng, H., Wang, W., & Yin, H. (2016). Chitosan oligosaccharide induces resistance to Tobacco mosaic virus in Arabidopsis via the salicylic acid-mediated signalling pathway. *Scientific Reports*, 6(April), 1–12.
- Kah, M. (2015). Nanopesticides and nanofertilizers: Emerging contaminants or opportunities for risk mitigation? *Frontiers in Chemistry*, 3(NOV), 1–6.
- Kannan, M., Nesakumari, M., & Rajarathinam, K. (2010). Production and Characterization of Mushroom Chitosan under Solid-State Fermentation Conditions Department of Advanced Zoology and Bio-technology , Sri Paramakalyani College , *Advances in Biological Research*, 4(1), 10–13.
- Kawashima, Y., Handa, T., Kasai, A., Takenaka, H., Lin, S. Y., & Ando, Y. (1985). Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate–chitosan. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(3), 264–268.
- Keller, A., McFerran, S., Lazareva, A. y Suh, S. (2013) Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*. 15:1692.
- Kong, M., Guang, X., Xing, K., & Jin, H. (2010). International Journal of Food Microbiology Antimicrobial properties of chitosan and mode of action : A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63.
- Koyani, R. D., & Vazquez-Duhalt, R. (2016). Laccase encapsulation in chitosan nanoparticles enhances the protein stability against microbial degradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18850–18857.
- Kumaraswamy, R. V., Kumari, S., Choudhary, R. C., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P., & Saharan, V. (2019). Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: A sustainable biostimulant for plant. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 59–69.
- Lee, E., Park, S. J., Lee, J. H., Kim, M. S., & Kim, C. H. (2016). Preparation of chitosan-TPP nanoparticles and their physical and biological properties. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 166–167.

- Li, P., Cao, Z., Wu, Z., Wang, X., & Li, X. (2016). The effect and action mechanisms of oligochitosan on control of stem dry rot of *Zanthoxylum bungeanum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7).
- Li, Q., Dunn, E. T., Grandmaison, E. W., & Goosen, M. F. A. (1992). Applications and Properties of Chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 7(4), 370–397.
- Malafaya, P. B., Silva, G. A., & Reis, R. L. (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(4–5), 207–233.
- Malvern Instruments. (2004). *Zetasizer NANO Series*. 1–20.
- Malvern Panalytical Ltd. (2018). *Dynamic light scattering: An introduction in 30 minutes. Technical note (MRK656-01)*. 1–8. <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction>
- Muthukrishnan, A. M. (2015). Green Synthesis of Copper-Chitosan Nanoparticles and Study of its Antibacterial Activity. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 06(01), 1–5.
- Muzzarelli, R. A. A. (2013). *Chitin*. Elsevier Science.
- Nagorskaya, V., Reunov, A., Lapshina, L., Davydova, V., & Yermak, I. (2014). Effect of chitosan on tobacco mosaic virus (TMV) accumulation, hydrolase activity, and morphological abnormalities of the viral particles in leaves of *N. tabacum* L. cv. Samsun. *Virologica Sinica*, 29(4), 250–256.
- Nagy, A., Harrison, A., & Dutta, P. K. (2011). *Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes : release of silver ions and mechanism of antibacterial action*. 1833–1852.
- Neuhaus, J. M., Ahl-Goy, P., Hinz, U., Flores, S., & Meins, F. (1991). High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Molecular Biology*, 16(1), 141–151.
- No, H. K., & Meyers, S. P. (1995). Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan—A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4(2), 27–52.
- Pecora, R. (2000). Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2, 123–131.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457–1465.
- Rivas-San Vicente, M., & Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3321–3338.
- Rodriguez-Montelongo, L., Lilia, C., Farías, R. N., & Massa, E. M. (1993). Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1144(1), 77–84.
- Saharan, V., Mehrotra, A., Khatik, R., Rawal, P., Sharma, S. S., & Pal, A. (2013). Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 677–683.
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., & Biswas, P. (2015). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 346–353.
- Scott, N., & Chen, H. (2013). Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. *Industrial Biotechnology*, 9(1), 17–18.
- Sharma, N., Singh, D., Rani, R., Sharma, D., Pandey, H., & Agarwal, V. (2018). Chitosan and Its Nanocarriers. In *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*. Elsevier Inc.

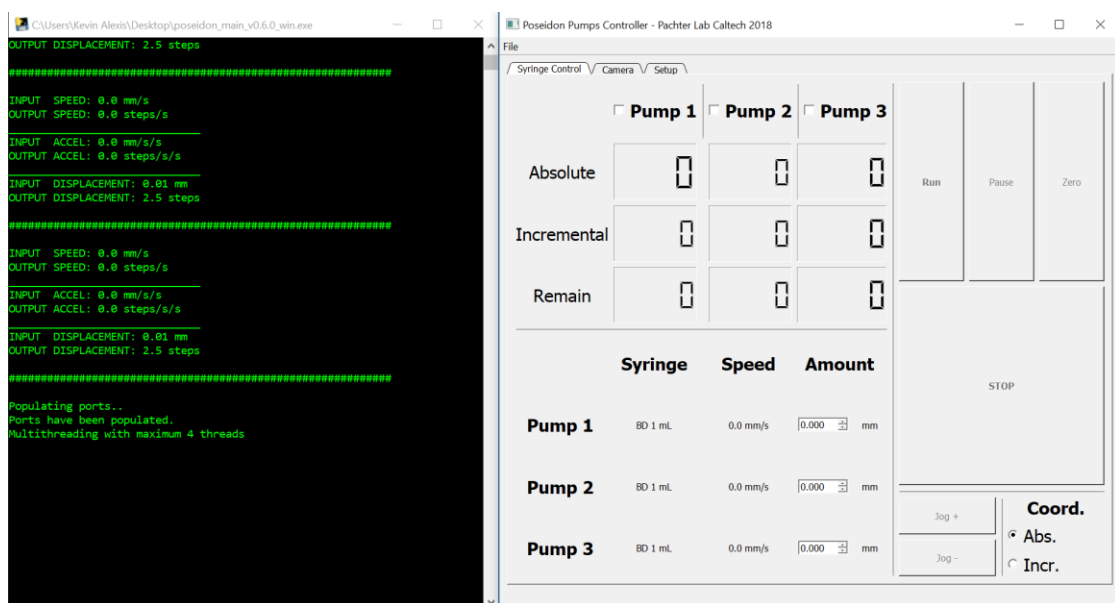
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, *12*(2), 89–100.
- Thomma, B. P. H. J., Nürnberger, T., & Joosten, M. H. A. J. (2011). Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*, *23*(1), 4–15.
- Van Assche, F., & Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment*, *13*(3), 195–206.
- Venkatesan, J., & Kim, S. K. (2010). Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview. *Marine Drugs*, *8*(8), 2252–2266.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, *47*(1), 177–206.
- Xing, K., Zhu, X., Peng, X., & Qin, S. (2015). Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, *35*(2), 569–588.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *17*(1), 145–156.
- Zhang, D., Wang, H., Hu, Y., & Liu, Y. (2015). Chitosan controls postharvest decay on cherry tomato fruit possibly via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(33), 7399–7404.

Anexos

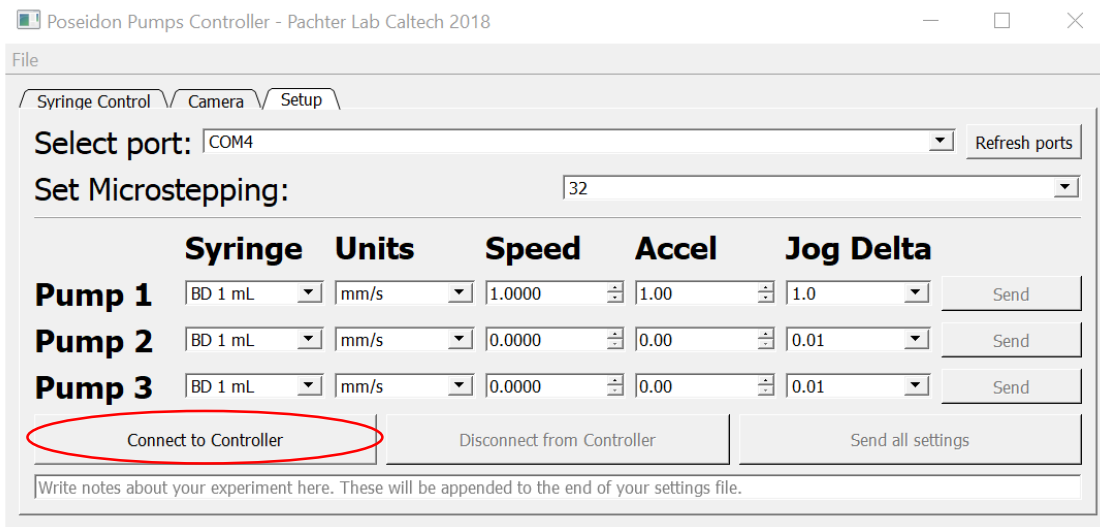
Manual para el sistema Poseidón

Para conectar al sistema:

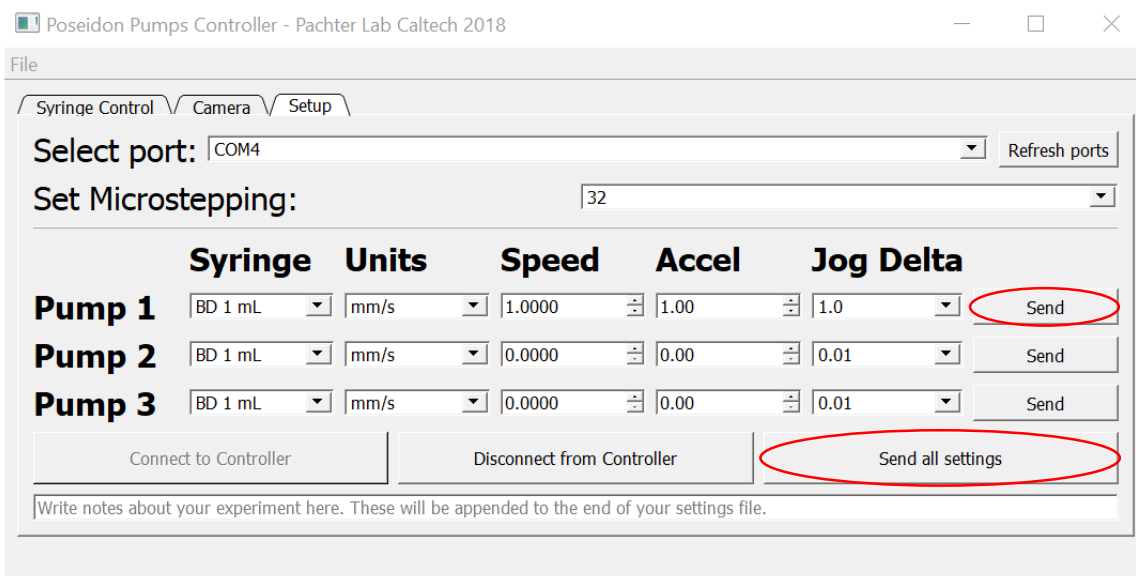
1. Abrir el archivo ejecutable con extensión .exe



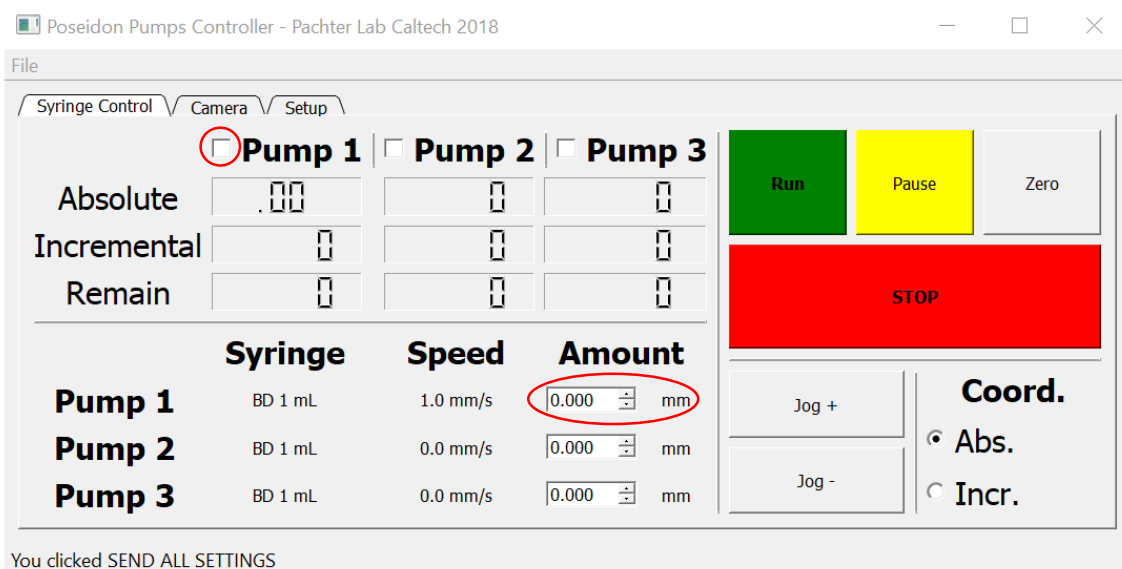
2. Seleccionar el puerto y el microstepping (este último depende de la configuración que se tenga en el CNC shield)
3. En la interfaz, en la pestaña de ajustes (setup) hacer click en conectar a controlador. Si se hizo correctamente aparecerá un mensaje en la parte inferior mostrando “Conectado exitosamente a la placa”.



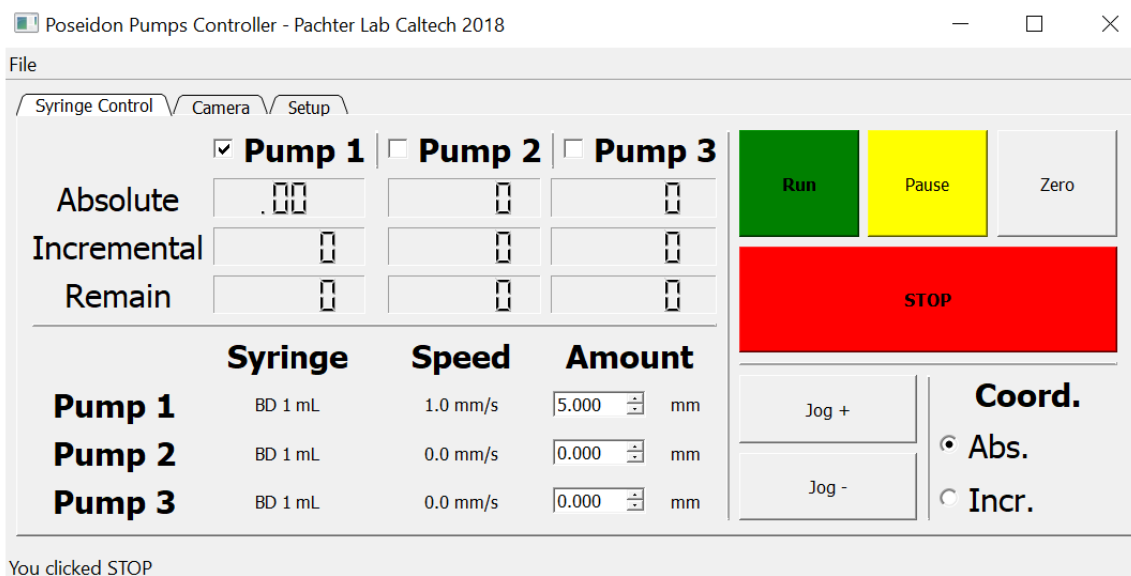
4. Seleccionar el tamaño de jeringa, velocidad y aceleración requeridos. *Nota:* Las unidades se probaron con mm/s ya que las demás no funcionaban adecuadamente. Jog Delta y aceleración se mantuvieron en un valor de 1
5. Hacer click en enviar y finalmente en enviar todas las configuraciones



6. Si se hizo correctamente debería verse la siguiente interfaz en la pestaña de control de jeringa



7. Marcar la casilla con la jeringa que se le enviaron las configuraciones del paso 4 y colocar la cantidad que se requiere. *Nota:* Si se quiere que el motor vaya para el lado opuesto, en cantidad colocar antes del número un “-“, ejemplo: -5



8. Hacer click en Run

Para desconectar el sistema:







1. En la pestaña configuraciones hacer click en desconectar del controlador
2. Desconectar la alimentación a los motores
3. Desconectar el Arduino

4. Desconectar el motor

Lista de precios para el sistema Poseidón

Las impresiones de los modelos se realizaron en una impresora 3D, con los diseños de Booeshaghi et al., (2019). La Tabla 10 muestra las herramientas y componentes necesarios para construir este sistema de goteo controlado.

Tabla 10. Lista de precios para construir el sistema Poseidón (abril, 2019).

Nombre	Precio	Figura
Motor a pasos NEMA 17	\$ 537.037 MXN	
Acoplamiento de motor de eje 5 mm a 5 mm (pack de 5)	\$ 398.148 MXN	
Barra de acero 6 mm (200 mm de longitud, pack de 2)	\$ 324.074 MXN	
Varilla roscada M5x0.8 mm (170 mm de longitud, pack de 4)	\$ 486.111 MXN	
M5x0.8 mm paquete de tuercas de 25	\$ 472.222 MXN	
M3x0.5 mm paquete de tuercas de 100	\$ 370.370 MXN	
M3x0.5 mm tornillos de cabeza plana paquete de 100 (20 mm de longitud)	\$ 439.815 MXN	
M3x0.5 mm tornillos de cabeza plana paquete de 100 (10 mm de longitud)	\$ 439.815 MXN	
Fuente de alimentación 12 V 6 A	\$ 470.23 MXN	
Arduino + CNC shield pack + driver A4988	\$ 402.00 MXN	
Total	\$ 4339.822	

Liofilizado en las nanopartículas

La liofilización es un proceso ampliamente utilizado para secar y mejorar la estabilidad de varios productos farmacéuticos que incluyen: virus, vacunas, proteínas, péptidos o vehículos coloidales: liposomas, nanopartículas, nanoemulsiones. El ciclo de liofilización se puede dividir en tres pasos: congelación (solidificación), secado primario (sublimación de hielo) y secado secundario (desorción de agua no congelada) (Abdelwahed et al., 2006). En este trabajo, la liofilización demostró no ser buena para las nanopartículas ya que aumentaba su tamaño enormemente y su potencial zeta reducía, lo que puede afectar las interacciones electrostáticas con virus, bacterias y hongos.

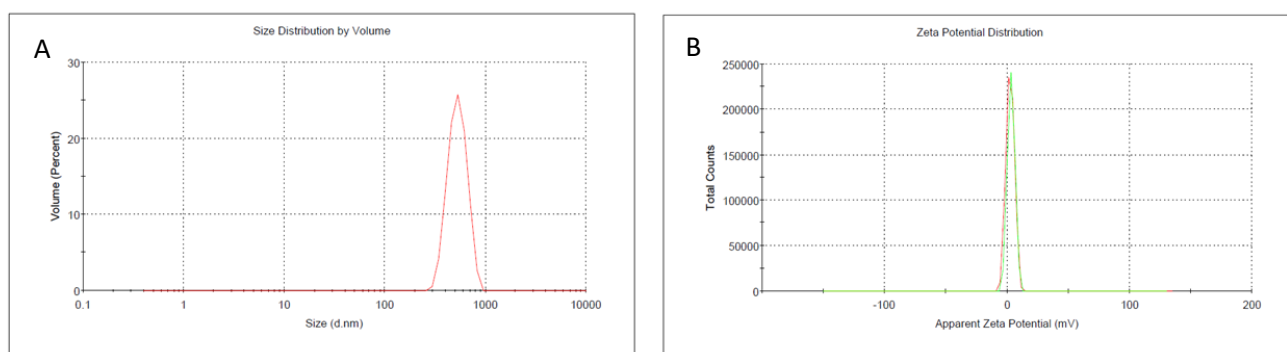


Figura 19. CS NPs liofilizadas (A) 533.9 ± 112.6 nm y un PDI de 0.297 y (B) potencial zeta de nanopartículas de quitosano liofilizadas 2.49 ± 3.31 mV.

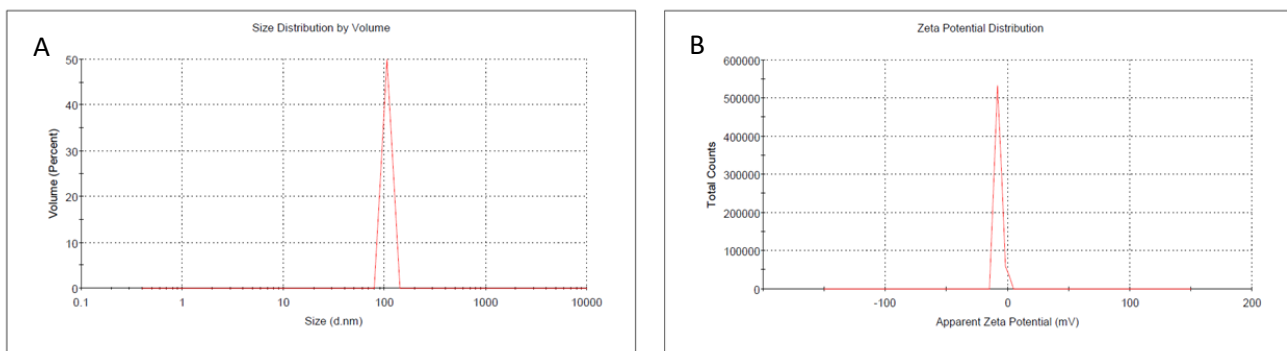


Figura 20. CuCS NPs liofilizadas (A) 106.3 ± 11.02 nm y un PDI de 1 y (B) distribución de potencial zeta de nanopartículas de quitosano con cobre liofilizadas -7.68 ± 3.08 mV.

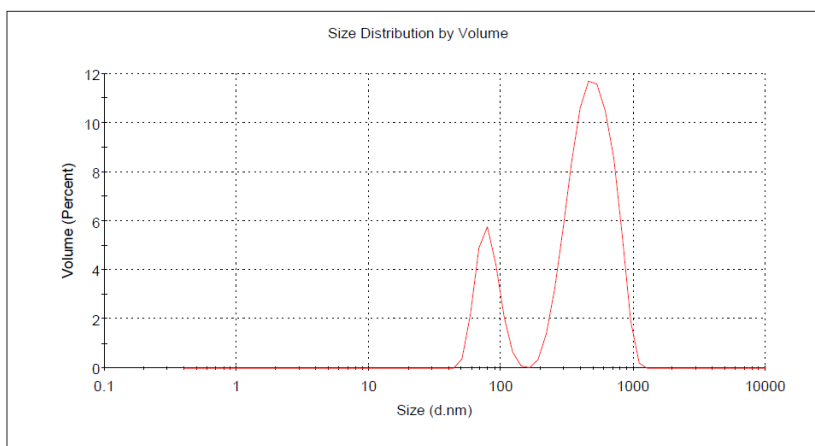


Figura 21. SACS NPs liofilizadas 509.5 ± 177.3 nm y un PDI de 0.376.

Protocolo para la síntesis de nanopartículas a base de quitosano

A. Preparación de solución stock de quitosano

1. Usar material estéril y el lugar en donde se prepara debe de estar limpio y libre de polvo el ambiente.
2. Preparar una solución de quitosano 0.25% (w/v) en 2% (v/v) de ácido acético glacial en agua MiliQ.
3. Dejar en agitación 24 horas.
4. Centrifugar la solución a $8000 \times g$ por 15 min a 4°C (Beckman Coulter Rotor JA-14) y recuperar el sobrenadante.
5. Centrifugar sobrenadante a $11,000 \times g$ por 20 min a 4°C (Beckman Coulter Rotor JA-14), ajustar pH a 4.5 con NaOH y filtrar la solución con una membrana de $1.2 \mu\text{m}$.
6. Posterior a esto filtrar con una membrana de $0.45 \mu\text{m}$ y guardar la solución stock en el refrigerador.

B. Síntesis de nanopartículas

1. Agregar 5 mL de la solución stock de quitosano en un vaso de precipitados y agitar a 800 rpm usando una barra magnética y una placa giratoria durante 10 min.
2. Agregar 200 μL de la muestra a encapsular a una velocidad de 0.09 mm/s con una jeringa de insulina (1 mL) acopada al sistema automatizado de goteo y agitar durante todo el

proceso a 800 rpm. En caso de solo sintetizar NPs de quitosano se debe de sustituir la solución de la jeringa por agua MiliQ estéril.

3. Preparar una solución stock de TPP 0.25% w/v y filtrar con una membrana de 0.45 μm .
4. Agregar 1 mL de TPP a una velocidad de 0.09 mm/s con una jeringa (3 mL) acoplada al sistema automático de goteo y continuar agitando a la misma velocidad.
5. Añadir 100 μL de glutaraldehído 2.5% a una velocidad de 0.09 mm/s con una jeringa (1 mL) acoplada al sistema automático de goteo y continuar la agitación por al menos una hora después de haber terminado de agregar el glutaraldehído.
6. Centrifugar a 3500 rpm 30 min a 4 °C (Sorvall Legend RT Rotor 75006445) y colectar el sobrenadante.
7. Centrifugar a 12000 rpm 1 hora (Thermo Heraeus Multifuge X1R Rotor 75003652) y colectar el sobrenadante.
8. Caracterizar por DLS, FTIR y TEM.

Nota: La preparación se realiza a temperatura ambiente y libre de polvo. El TPP se debe de preparar y filtrar siempre al momento de llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas. La centrifugación se realiza para separar los agregados de las nanopartículas. Utilizando este procedimiento se obtienen nanopartículas de aproximadamente entre 40 y 80 nm con un volumen de más del 60% y el resto corresponde a nanopartículas con un tamaño aproximado de 280 nm. Esto se ha corroborado para NPs quitosano cargadas con Cu, ácido salicílico y NPs de quitosano sin cargo, esto a través de DLS.

Distribución de tamaño de las nanopartículas obtenida por DLS

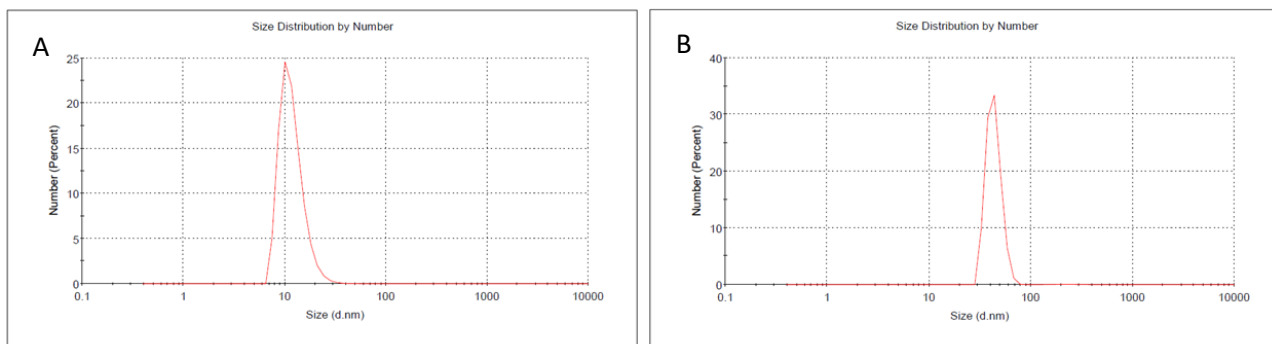


Figura 22. Distribución de tamaño de nanopartículas obtenidas por DLS para quitosano puro (A) y para las nanopartículas de quitosano (B). El quitosano, antes de formar las nanopartículas tenía un tamaño de 16.6 ± 9.3 nm y las nanopartículas de quitosano CS NPs de 46 ± 8.3 nm.

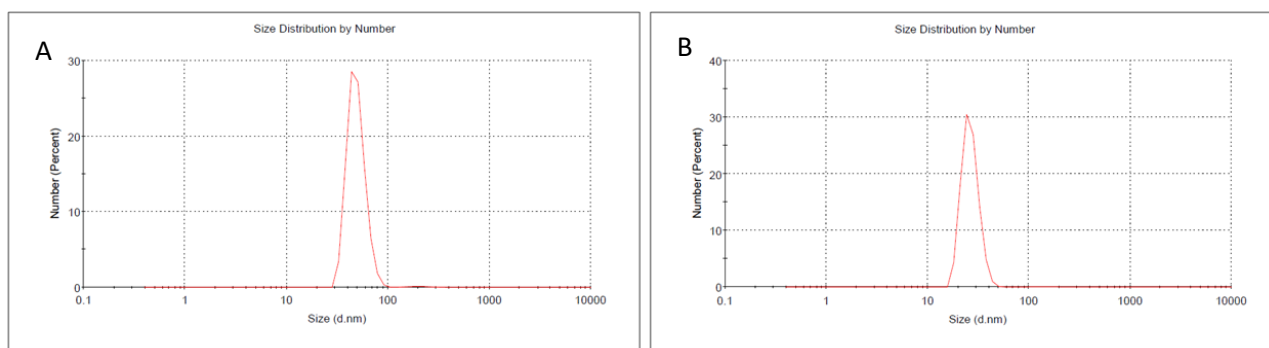


Figura 23. Distribución de tamaño de nanopartículas obtenidas por DLS para CuCS NPs al 0.01% (A) y CuCS NPs al 0.1% (B). Las nanopartículas de CuCS NPs al 0.01% tuvieron un tamaño de 54.2 ± 11.9 nm y las de CuCS NPs al 0.1% de 29 ± 16.2 nm.

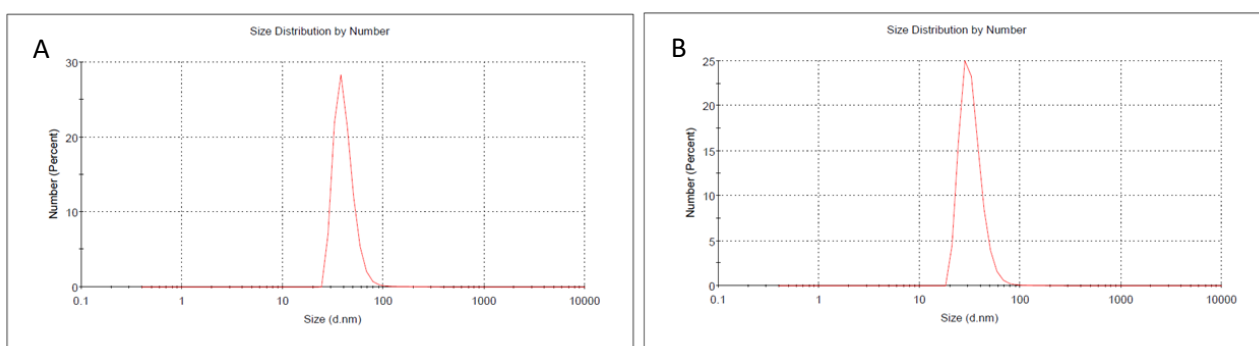


Figura 24. Distribución de tamaño de nanopartículas obtenidas por DLS para SACS NPs (A) y CuSACS NPs (B). Las nanopartículas SACS NPs tuvieron un tamaño de 49.5 ± 16.2 nm y las CuSACS NPs de 41.4 ± 14.6 nm.

Distribución de potencial zeta obtenido por DLS

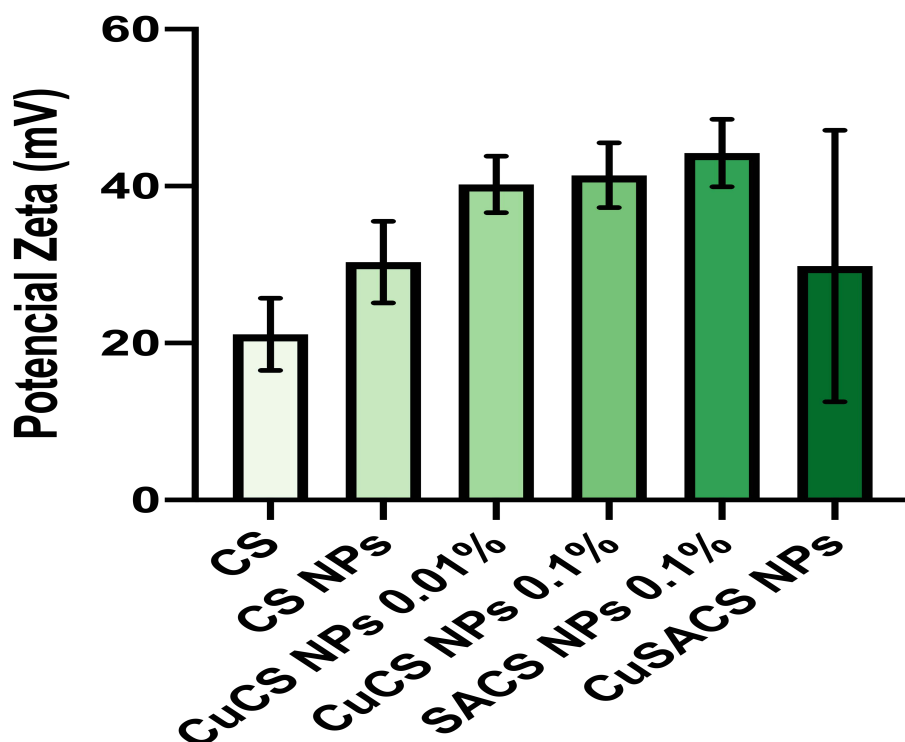


Figura 25. Potencial Zeta obtenido para las nanopartículas de quitosano cargadas.

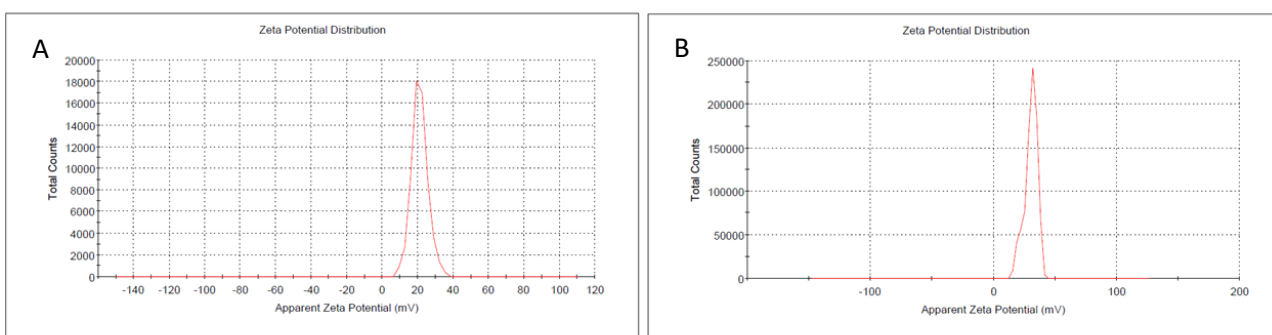


Figura 26. Distribución de potencial zeta obtenido por DLS para el quitosano (A) el cual tuvo un potencial zeta de 21.1 ± 4.6 mV antes de la formación de las nanopartículas y (B) las nanopartículas de quitosano aumentaron la carga a 30.3 ± 5.2 mV.

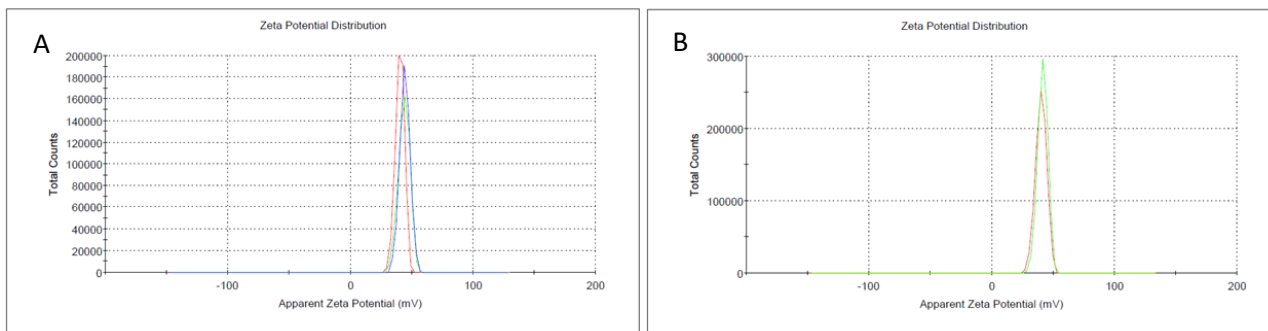


Figura 27. Distribución de potencial zeta obtenido por DLS para CuCS NPs al 0.01% (A) las cuales tenían una carga de 40.2 ± 3.6 mV y (B) CuCS NPs al 0.1% tenían una carga de 41.4 ± 4.1 mV.

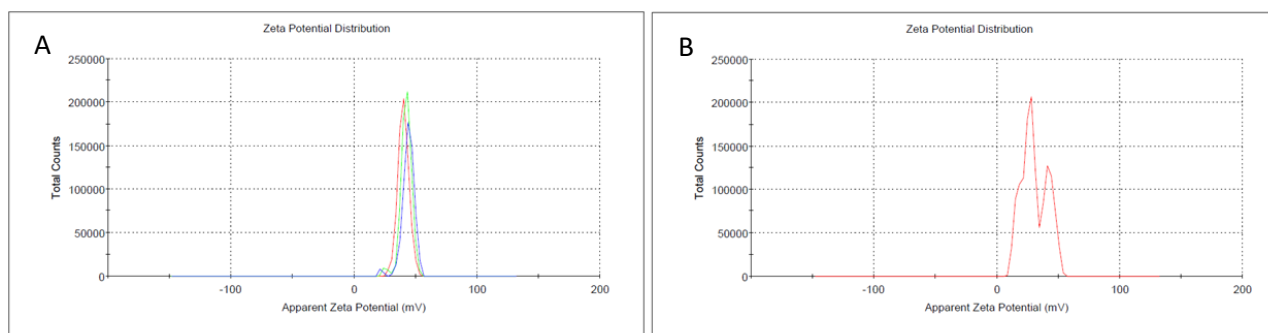


Figura 28. Distribución de potencial zeta obtenido por DLS para SACS NPs (A) las cuales mostraban una carga de 44.2 ± 4.3 mV y (B) CuSACS NPs mostraron una carga de 29.8 ± 17.3 mV.