



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño**

**Evaluación del efecto de la composición de nanovarillas antimicrobianas  
en hidrogeles híbridos a base de quitosano, en sus propiedades, para la  
liberación controlada de antibióticos acuícolas.**

**TESIS**

Para cubrir los requisitos necesarios para obtener el título de  
Ingeniera en Nanotecnología

Presenta:

**Diana Fiscal Caraveo**

Directora de tesis:

**Dra. Marlene Nohemi Cardoza Contreras**

Codirectora de tesis:

**Dra. Eunice Vargas Viveros**

Ensenada, Baja California, México. Mayo de 2025



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



**“Evaluación del efecto de la composición de nanovarillas antimicrobianas  
en hidrogeles híbridos a base de quitosano, en sus propiedades,  
para la liberación controlada de antibióticos acuícolas”**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**Ingeniera en Nanotecnología**

PRESENTA

**Diana Fiscal Caraveo  
365567**

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

**Dra. Marlene Nohemi  
Cardoza Contreras  
DIRECTOR**

  
**Dra. Eunice Vargas  
Viveros  
CODIRECTOR**

**Dra. Viridiana Evangelista  
Hernández  
SINODAL**

  
**Dra. Dayanira Sheira  
Paniagua Meza  
SINODAL**  
**Dr. David Cervantes  
Vásquez  
SINODAL**

**“Por la Realización Plena del Ser”**

## Resumen

La acuicultura es una industria relevante que requiere una administración eficiente de fármacos para garantizar la salud de los organismos acuáticos y la seguridad alimentaria. Este estudio investiga cómo la concentración de nanovarillas de óxido de zinc dopadas con Ag y Cl afecta el control y la liberación de la oxitetraciclina (OTC) en hidrogeles de quitosano. Para determinar la concentración óptima de nanovarillas en los hidrogeles, se llevaron a cabo pruebas, evaluando el grado de hinchamiento, la actividad antimicrobiana contra *Vibrio harveyi* y la liberación del antibiótico mediante métodos espectrofotométricos. Estos hallazgos podrían mejorar la eficacia de la administración de fármacos en la acuicultura, mitigando riesgos como la sobredosificación y la resistencia a los antibióticos, garantizando la salud de los organismos acuáticos y la seguridad de los productos alimenticios, así como la reducción de la concentración de antibióticos en las descargas de agua de las granjas acuícolas al océano.

**Palabras clave:** *acuicultura, hidrogeles, liberación prolongada, nanovarillas de ZnO, quitosano, oxitetraciclina.*

## **Abstract**

Aquaculture is a relevant industry that requires efficient drug management to ensure the health of aquatic organisms and food safety. This study investigates how the concentration of zinc oxide nanorods doped with Ag and Cl affects the control and release of oxytetracycline (OTC) in chitosan hydrogels. Experiments were conducted to determine the hydrogels' optimal nanorod concentration, evaluate swelling degree, antimicrobial activity against *Vibrio harveyi*, and antibiotic release using spectrophotometric methods. These findings could improve the effectiveness of drug administration in aquaculture, mitigating risks such as overdosing and antibiotic resistance, ensuring the health of aquatic organisms and the safety of food products, and reducing the concentration of antibiotics in aquaculture farm wastewater discharged into the ocean.

**Keywords:** *aquaculture, hydrogels, sustained release, ZnO nanorods, chitosan, oxytetracycline.*

## Dedicatoria

*A mis padres  
por su amor y apoyo constante  
en cada paso de mi camino.*

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi alma mater y la que ha sido mi casa durante estos últimos cuatro años, la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), la que me dio la oportunidad de cumplir una meta más en mi desarrollo profesional. En especial, extendiendo mi gratitud a la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño (FIAD), que me ha formado como Ingeniera en Nanotecnología y me ha permitido adentrarme en esta fascinante área de la ciencia y la ingeniería. Agradezco a cada uno de los profesores de la Academia de Nanotecnología, que con su dedicado trabajo nos enseñaron las bases y lo diverso que puede ser un área como la nanotecnología, y que siempre estuvieron al pendiente de que lográramos nuestra superación profesional. Así como, a cada uno de los profesores que semestre a semestre me permitieron aprender un poco de cada una de sus clases.

Asimismo, quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Marinas (FCM), que me ha arropado como parte de ellos, y me permitió conocer otra área de la ciencia tan importante. En especial a la Dra. Marlene Cardoza, que me dio la oportunidad de realizar mi servicio social profesional, participar en semanas de ciencias y la realización de este proyecto de tesis, del que he podido aprender mucho durante todo este tiempo, por su asesoramiento, conocimiento, sus pláticas, paciencia y apoyos, que ha hecho más ameno cada uno de mis momentos en la FCM.

También, agradezco a los que me asesoraron durante la parte experimental de este trabajo: a Andrea, por siempre sacarme de apuros en el laboratorio; a Silvia y al Dr. Samuel, por su orientación en la realización de los antibiogramas; a la Dra. Viridiana Evangelista, por sus consejos y asesoramientos; a los estudiantes y maestros con quienes compartí horas de trabajo y conversación en el laboratorio.

Por otro lado, agradezco a la Dra. Eunice Vargas, por su guía, consejos y apoyo en la realización de este trabajo, y sus enseñanzas a lo largo de la carrera. También deseo agradecer a la Dra. Dayanira Paniagua y al Dr. David Cervantes por el tiempo y esfuerzo dedicados a la revisión de este trabajo.

A mis compañeros de la carrera, Jenny, Eduardo, Jair, Monse, Angel, Paola, que gracias a ustedes llegue a este punto e hicieron más llevaderos mis años universitarios.

Finalmente, agradezco con todo mi corazón a mis padres, a mi hermano, a Estefany, Ana y Diego, por ser mi mayor apoyo desde el primer día, por su amor, preocupación, cariño y soporte incondicional durante estos años.

# Índice

|  |     |
|--|-----|
| <b>Resumen</b> .....   | i   |
| <b>Abstract</b> .....  | ii  |
| <b>Dedicatoria</b> .....                                       | iii |
| <b>Agradecimientos</b> .....                                   | iv  |
| <b>1. Introducción</b> .....                                   | 1   |
| <b>2. Antecedentes</b> .....                                   | 3   |
| <b>3. Hipótesis</b> .....                                      | 10  |
| <b>4. Objetivos</b> .....                                      | 11  |
| 4.1 Objetivo general.....                                      | 11  |
| 4.2 Objetivos específicos.....                                 | 11  |
| <b>5. Materiales y métodos</b> .....                           | 12  |
| 5.1 Reactivos y equipo.....                                    | 12  |
| 5.2 Síntesis de hidrogeles híbridos.....                       | 13  |
| 5.2.1 Síntesis de NPs de ZnO.....                              | 13  |
| 5.2.2 Preparación de sustratos de PE.....                      | 14  |
| 5.2.3 Síntesis de nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl..... | 14  |
| 5.2.4 Hidrogeles híbridos de quitosano.....                    | 15  |
| 5.3 Caracterización y análisis.....                            | 17  |
| 5.3.1 Grado de hinchamiento.....                               | 17  |
| 5.3.2 Actividad antimicrobiana.....                            | 17  |
| 5.3.3 Absorción de OTC en el hidrogel.....                     | 18  |
| 5.3.4 Cinética de liberación de OTC.....                       | 18  |
| <b>6. Resultados y Discusión</b> .....                         | 20  |
| 6.1 Grado de hinchamiento.....                                 | 20  |
| 6.2 Actividad antimicrobiana.....                              | 23  |
| 6.3 Liberación del antibiótico.....                            | 27  |
| <b>7. Conclusión</b> .....                                     | 31  |
| <b>8. Referencias</b> .....                                    | 32  |
| <b>9. Anexos</b> .....   | 35  |

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Estructura química de la OTC. ....   | 4  |
| <b>Figura 2.</b> Ejemplos de biopolímeros. En la imagen superior izquierda se observa quitosano obtenido a partir de exoesqueletos de camarón. En la imagen superior derecha, pectina extraída de frutas. La imagen inferior izquierda muestra gelatina, mientras que en la imagen inferior derecha se presentan perlas de alginato de calcio. .... | 6  |
| <b>Figura 3.</b> Esquema representativo de la red polimérica de los hidrogeles híbridos de quitosano y nanovarillas de AgCl_ZnO (Tomado de González Méndez, 2023). ....   | 9  |
| <b>Figura 4.</b> Esquema para la síntesis de nanopartículas de ZnO. ....  | 13 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema para la preparación de sustratos de PE funcionalizados. ....   | 14 |
| <b>Figura 6.</b> Esquema para la síntesis de nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl. ....  | 15 |
| <b>Figura 7.</b> Esquema para la síntesis de hidrogeles con nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl. .  | 16 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema para la preparación de muestras para carga y liberación del antibiótico. ....  | 18 |
| <b>Figura 9.</b> Cinéticas de hinchamiento de hidrogeles de quitosano (Q) e hidrogeles híbridos (Q-ZnO x%) en a) pH 2, b) pH 4, c) pH 6, d) pH 7 y e) pH 8. ....  | 22 |
| <b>Figura 10.</b> Zonas de inhibición (por triplicado) de la síntesis de hidrogeles híbridos contra <i>Vibrio harveyi</i> a las 24 h. ....  | 24 |
| <b>Figura 11.</b> Zonas de inhibición de la síntesis de hidrogeles híbridos, donde a) corresponde al control positivo, b) al hidrogel Q-ZnO 2.5%, c) al hidrogel Q-ZnO 5%, d) al hidrogel Q-ZnO 7.5%, e) y f) al hidrogel Q-ZnO 10%, contra <i>Vibrio harveyi</i> a las 48 h. ....  | 25 |
| <b>Figura 12.</b> Zonas de inhibición de la síntesis de hidrogeles híbridos, donde a) corresponde al control positivo, b) y c) al hidrogel Q-ZnO 10%, contra <i>Vibrio harveyi</i> a las 72 h. ....   | 25 |
| <b>Figura 13.</b> a) medición del espectro de OTC para la determinación de su longitud máxima de absorción ( $\lambda_{max}$ ) y b) curva de calibración de la OTC. ....  | 27 |
| <b>Figura 14.</b> Liberación de OTC por los hidrogeles híbridos en un tiempo de 80 min. ....  | 29 |

## Lista de Tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Lista de reactivos para la síntesis de hidrogeles híbridos.....                                  | 12 |
| <b>Tabla 2.</b> Lista de equipos para la síntesis y caracterización de hidrogeles híbridos.....                  | 13 |
| <b>Tabla 3.</b> Diámetros de zonas de inhibición de los hidrogeles híbridos contra <i>Vibrio harveyi</i> .....   | 25 |
| <b>Tabla 4.</b> Tiempo de liberación del antibiótico.....  | 29 |
| <b>Tabla 5.</b> Datos por triplicado obtenidos para la generación de gráficas de cinéticas de hinchamiento ..... | 35 |

## 1. Introducción

La administración de fármacos en la acuicultura es importante para garantizar la salud y el bienestar de los organismos acuáticos, así como para prevenir y tratar enfermedades. Es crucial administrar la dosis correcta del medicamento para evitar subdosificación, lo que deriva en una efectividad reducida, o sobredosificación, que puede ser perjudicial para los organismos acuáticos y el medio ambiente (Liang et al., 2020).

Los fármacos pueden ser incorporados en la matriz de algún hidrogel durante su fabricación. Esto permite una liberación controlada del fármaco a lo largo del tiempo a medida que el hidrogel se degrada. Sin embargo, su desempeño está fuertemente influenciado por el pH del medio en el que se encuentran. En el caso de los peces, estos sistemas deben ser capaces de soportar condiciones ácidas en el estómago para evitar una liberación prematura del compuesto activo y comenzar su degradación a partir de  $\text{pH} > 5$ . Los hidrogeles de quitosano tienen el potencial de ser útiles en la dosificación de fármacos acuícolas, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y la capacidad para formar geles en presencia de agua (Reveté et al., 2021).

Asimismo, los hidrogeles de quitosano se pueden funcionalizar agregando un material o nanomaterial inorgánico en menor proporción (Sánchez-Serrano et al., 2023). Uno ellos son las nanovarillas de ZnO que presentan propiedades antibacterianas, anticancerígenas, antioxidantes y antiinflamatorias, además, se ha demostrado que al doparlas (incorporación de pequeñas concentraciones de impurezas a un material semiconductor) pueden mejorar sus propiedades antimicrobianas, usando principalmente, Ag y Cl (Cardoza-Contreras et al., 2020).

Aunque, ya se han demostrado las propiedades antimicrobianas de hidrogeles híbridos de quitosano con nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl, aún es necesario realizar estudios que determinen cuál es la concentración óptima de nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl en el hidrogel, sin afectar el encapsulamiento y la liberación controlada del fármaco, o sus propiedades antimicrobianas.

Por ello, se realizaron evaluaciones a los hidrogeles con concentraciones de nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl del: 2.5%, 5%, 7.5% y 10%. Estas evaluaciones fueron la determinación de los porcentajes de hinchamiento, su actividad antimicrobiana y la liberación del antibiótico en agua con respecto al tiempo.

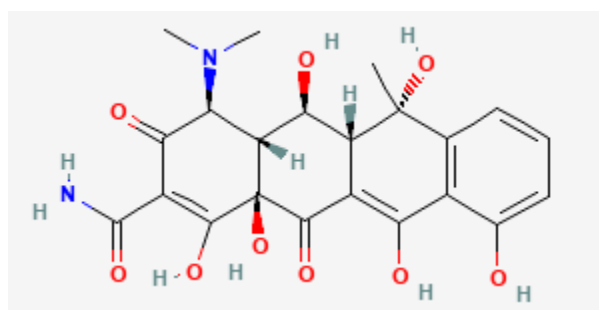
## 2. Antecedentes

La industria acuícola ha tenido un gran desarrollo en las últimas décadas. Sin embargo, con el aumento de la producción se vienen diversos tipos de prácticas en las cuales se propicia una mayor densidad en cultivos, estas densidades son causa de aglutinamiento, reducción de oxígeno y situaciones estresantes que generan el desarrollo de ciertas patologías en organismos, estas van desde infecciones, malnutrición y enfermedades de origen biológico. Es por ello que cada vez son mayores los esfuerzos en la salud animal y alimentación para lograr que esta sea una actividad sustentable, que no dañe el ambiente y mucho menos la salud del ser humano. Los patógenos más peligrosos en acuicultura, además de poseer un alto grado de patogenicidad, tienen la capacidad de ser zoonóticos (pueden transmitir la enfermedad de los animales a los seres humanos). Dentro de estos microorganismos se tiene a las diversas especies de los géneros *Aeromonas*, *Vibrios* y *Streptococcus* (Cabello, 2004). Es por esto, que en la acuicultura se emplean antibióticos durante la producción de los cultivos.

Uno de ellos, es la enrofloxacin, (ENR), perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas. Se caracteriza por tener excelentes efectos antibacterianos contra bacterias grampositivas, gramnegativas y micoplasmas (Lei et al., 2022). Se utiliza en medicina veterinaria para la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas durante el cultivo acuático y representa el 12% del uso total de antibióticos (Liu et al., 2024). Sin embargo, se ha demostrado que altas dosis de ENR en los organismos acuáticos, pueden propiciar daños en tejidos, inducir al estrés oxidativo y apoptosis de algunas células como las hepato pancreáticas (Zhang et al., 2019).

La oxitetraciclina (OTC) es otro antibiótico de amplio uso que pertenece al grupo de las tetraciclinas (Figura 1). Se emplea principalmente para el control de infecciones bacterianas y ha sido aprobado para su uso en acuicultura y medicina veterinaria, donde se utiliza tanto para la prevención y tratamiento de enfermedades como para la promoción del crecimiento. A nivel global, las tetraciclinas representan uno de los grupos de antibióticos más producidos, siendo la OTC el segundo antibiótico más fabricado y el tercero más consumido en el mundo. Sin embargo, debido a su metabolismo y alta excreción hepática,

una proporción significativa de OTC es liberada al medio ambiente a través de aguas residuales y efluentes cloacales (Karmakar et al., 2024).



*Figura 1. Estructura química de la OTC.*

Asimismo, en soluciones acuosas, el comportamiento de la OTC depende del pH, ya que la molécula contiene tres grupos funcionales susceptibles de protonación o desprotonación: dimetilamonio, tricarbonilamida y dicetona fenólica. En función del pH del medio, las tetraciclinas pueden presentar carga positiva ( $\text{pH} < 3.3$ ), neutra ( $3.3 < \text{pH} < 7.68$ ) o negativa ( $\text{pH} > 7.68$ ). Además, estos compuestos son fuertes agentes quelantes y su actividad antibacteriana, así como su farmacocinética, pueden verse afectadas por la presencia de minerales como calcio, hierro y magnesio, así como por la ingesta de antiácidos, como el bicarbonato de sodio, que elevan el pH gástrico y reducen su absorción (Borghetti & Palma, 2014).

Además de la toxicidad de altas concentraciones de antibióticos, otro factor adverso derivado de su empleo en organismos acuícolas, es el consumo no intencionado de antibióticos en los residuos de alimentos, lo cual provoca el desarrollo de resistencia a los mismos en bacterias que son patógenas para los seres humanos, constituyendo otro problema importante al que no se ha prestado todavía la debida atención (FAO, 2022). Se considera que el desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias patógenas es uno de los riesgos más graves para la salud humana a nivel mundial.

Una alternativa que ha surgido en los últimos años para tratar de reducir los efectos tóxicos, es la liberación de fármacos de forma controlada. El término “liberación controlada” se refiere a la capacidad de un sistema de administrar un fármaco durante un período prolongado de tiempo a una tasa controlada, ofreciendo una atractiva alternativa para conseguir niveles constantes de fármaco en el organismo, y a su vez reduciendo los

posibles efectos tóxicos del mismo. Dentro de estas estrategias, las formulaciones sensibles al pH han cobrado gran importancia debido a su capacidad de responder incluso a pequeños cambios en el pH del entorno biológico.

La liberación de fármacos mediada por cambios de pH puede ocurrir a través de dos mecanismos principales. En el primero, los polímeros con grupos funcionales sensibles al pH liberan el fármaco debido al hinchamiento, deshinchamiento o degradación de su estructura en respuesta a los cambios de pH. En el segundo, la liberación se produce por la ruptura de enlaces covalentes entre el fármaco y el polímero, desencadenada por variaciones en el pH. Gracias a estos mecanismos, los polímeros inteligentes han demostrado ser sistemas altamente eficientes para la administración de fármacos, ya que poseen gran capacidad de carga, estabilidad y sensibilidad a los cambios ambientales. Además, los polielectrolitos con grupos ácidos o básicos débiles experimentan una transferencia de protones en respuesta a modificaciones en el pH, lo que puede inducir procesos de hinchamiento o colapso de la estructura polimérica, regulando así la liberación del fármaco (Kocak et al., 2016; Veer Jain et al., 2024).

Los hidrogeles son materiales capaces de absorber cantidades considerables de agua debido a sus redes poliméricas tridimensionales y son insolubles por la presencia de entrecruzamientos físicos o químicos. Si un hidrogel es sensible a estímulos como pH, temperatura o fuerza iónica se habla de un hidrogel inteligente. En la actualidad, algunos materiales que se han utilizado para la síntesis de hidrogeles, son los biopolímeros, un tipo importante de polímeros de naturaleza biocompatible, constituidos principalmente por polisacáridos y/o proteínas. Generalmente se emplean como materiales de partida para construir hidrogeles con potenciales aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 2.



**Figura 2.** Ejemplos de biopolímeros. En la imagen superior izquierda se observa quitosano obtenido a partir de exoesqueletos de camarón. En la imagen superior derecha, pectina extraída de frutas. La imagen inferior izquierda muestra gelatina, mientras que en la imagen inferior derecha se presentan perlas de alginato de calcio.

El quitosano es un biopolímero que se obtiene de la desacetilación de la quitina (proveniente de exoesqueletos de crustáceos o insectos), cobrando relevancia en los últimos años por sus propiedades antimicrobianas, antigénicas, hemostáticas, su función antioxidante y por ser un material biocompatible (Liang et al., 2020).

Se ha utilizado hidrogel hechos de quitosano para liberación prolongada de medicamentos, tal como lo reporta Park et al., 2013 en el que desarrollaron un hidrogel compuesto por ácido  $\gamma$ -poli(glutámico) ( $\gamma$ -PGA) y quitosano, diseñado para la administración eficiente de medicamentos dirigidos al colon. Este material mostró una notable capacidad de amortiguación del pH, lo que permitió su estabilidad en soluciones ácidas con un pH entre 1 y 3. Además, se observó un comportamiento diferenciado en la liberación del fármaco: a un pH de 7.4, la liberación fue inmediata, mientras que, a un pH de 3, se logró una liberación retardada de aproximadamente 30 minutos.

Por otro lado, X. Liu et al., 2019, diseñaron películas a base de quitosano y aloe vera, embebidas uniformemente con microesferas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) cargadas con curcumina, para fomentar la cicatrización de heridas y la regeneración del tejido cutáneo. Utilizando un método optimizado de emulsificación ultrasónica, lograron una dispersión homogénea de las microesferas de PLGA dentro de las películas Quitosano/Aloe. Estas películas demostraron propiedades fisicoquímicas adecuadas, flexibilidad y una actividad antibacteriana eficaz contra bacterias Gram-positivas y Gram-

negativas. Además, promovieron la proliferación de fibroblastos y presentaron propiedades antiinflamatorias, favoreciendo la regeneración tisular. La liberación controlada de curcumina contribuyó a la reducción de inflamación y cicatrices, lo que resultó en una cicatrización acelerada y una regeneración efectiva del tejido cutáneo en comparación con controles sin tratamiento.

Djekic et al., 2020, desarrollaron un hidrogel de quitosano enriquecido con ibuprofeno (IBU) para aplicaciones tópicas como analgésico en el tratamiento de heridas. Este sistema mostró excelentes características de dispersión y adhesión, facilitando su aplicación directa sobre el sitio lesionado. El hidrogel, preparado mediante gelificación iónica en solución de ácido láctico y combinado con una microemulsión biocompatible de aceite en agua, contenía entre 0.25 % y 1 % de quitosano y un 5 % del principio activo. Mediante su caracterización, se confirmaron la presencia de nanogotas de aceite (16.21-22.56 nm) incrustadas en la matriz del hidrogel, lo que permitió la solubilización eficiente del ibuprofeno, un compuesto poco soluble en agua, y su liberación sostenida durante 12 horas. Además, la introducción del hidrogel de quitosano mejoró las propiedades de aplicación, facilitando su uso y remoción, minimizando el dolor durante los cambios de apósito y maximizando la comodidad del paciente.

Ahora bien, otra modalidad es combinar los hidrogeles con nanomateriales inorgánicos, ya que se pueden aprovechar las propiedades fisicoquímicas de estas nanopartículas y obtener hidrogeles híbridos con características únicas que pueden resultar en grandes avances en la liberación controlada y de sitio específico de compuestos bioactivos e inclusive en nuevas técnicas de diagnóstico.

Entre algunos de los casos, que se pueden destacar, es el de Baukum et al., 2020, donde realizaron hidrogeles híbridos de alginato/gelatina con nanopartículas de plata, para su uso como apósitos de heridas, demostrando actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, sin presentar toxicidad en humanos. La adición de nanopartículas de Ag potencializó las propiedades antimicrobianas del hidrogel y el hinchamiento en agua aumentó, además, de que la liberación de nanopartículas de Ag en el medio fue la idónea.

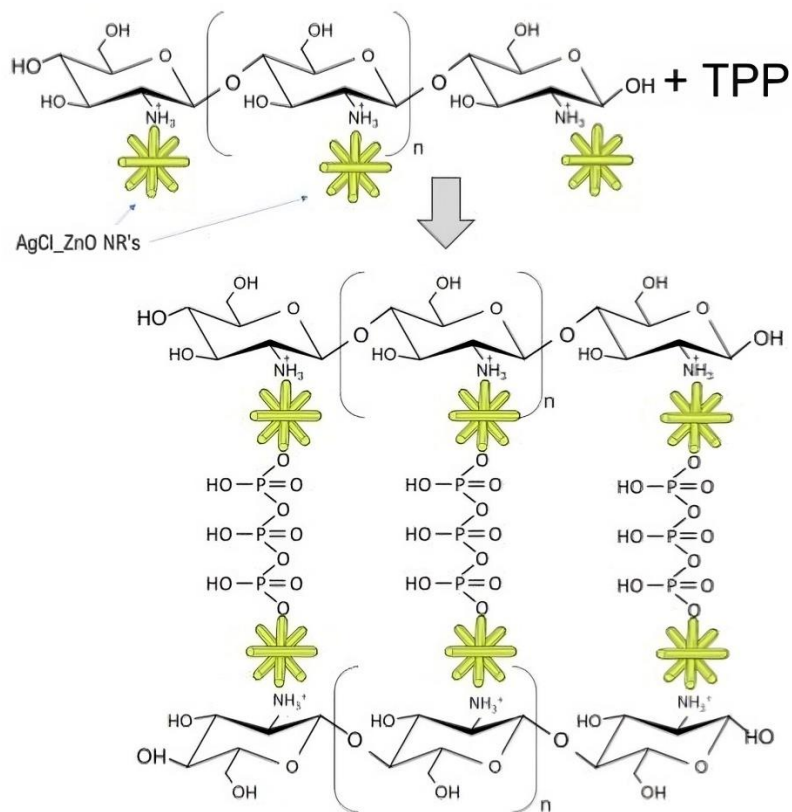
El equipo de Yadollahi et al., 2015, sintetizó hidrogeles de carboximetilcelulosa con nanopartículas de ZnO, demostrando una mejor toxicidad contra las bacterias

gramnegativas *E. coli* y grampositivas *S. aureus*, con el fin de darle una aplicación biomédica al nuevo hidrogel. La incorporación de nanopartículas de ZnO cargadas dan como resultado la penetración de más moléculas de agua para equilibrar la presión osmótica iónica acumulada. Además, la formación de nanopartículas en la red de hidrogel puede expandir la red y aumentar los poros y espacios libres dentro de las redes y, como consecuencia, absorbe más agua.

Mohan & Ashraf, 2019, diseñaron hidrogeles híbridos con carga mixta (zwitteriónico) de N-isopropilacrilamida incorporando nanodióxido de silicio, con el propósito de cubrir una red de jaula de acuicultura de polietileno (PE), para así, tener un control de la bioincrustación de las jaulas, optando por usar el nanodióxido de silicio debido a sus propiedades antibacterianas y por su impacto medioambiental.

Igualmente, se ha informado que los nanomateriales con mayor área superficial, como las nanovarillas, presentan una actividad antibacteriana superior en comparación con las nanopartículas convencionales (Sadeghi et al., 2012) y algunas, como las de ZnO son consideradas una alternativa viable a los antibióticos, ya que, en concentraciones de hasta 100 µg/mL, se ha reportado que son inofensivos para la mayoría de las células del cuerpo (Siddiqi et al., 2018).

Recientemente, Sánchez-Serrano et al., 2023, sintetizaron hidrogeles híbridos de quitosano y nanovarillas de AgCl\_ZnO (Figura 3). Esta investigación se enfocó en la aplicación de los hidrogeles en el encapsulado de compuestos bioactivos acuícolas, presentando propiedades antimicrobianas potenciadas ante la bacteria *Vibrio harveyi* (bacteria de alta patogenicidad en cultivos acuícolas). Sin embargo, en ese estudio solo probaron una concentración de nanovarillas en el hidrogel (5% atómico), de modo que para una mejor caracterización del hidrogel en su posible empleo para encapsulado y entrega de fármacos acuícolas es necesario estudiar la concentración óptima de nanovarillas en la composición del hidrogel que permita encapsular fármacos acuícolas, mantener sus propiedades antimicrobianas y en especial, liberar el fármaco de forma controlada.



**Figura 3.** Esquema representativo de la red polimérica de los hidrogeles híbridos de quitosano y nanovarillas de  $\text{AgCl\_ZnO}$  (Tomado de González Méndez, 2023).

Es por ello, que en este trabajo de investigación se evaluará el efecto de la concentración de nanovarillas antimicrobianas de  $\text{AgCl\_ZnO}$  en las propiedades de hidrogeles de quitosano, en específico en las relacionadas a la carga y liberación de antibióticos acuólicos.

### **3. Hipótesis**

La concentración de nanovarillas antimicrobianas en la composición de hidrogeles de quitosano influye en el proceso de cargado y liberación de fármacos acuícolas.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar la concentración óptima de nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl, en hidrogeles de quitosano para una adecuada carga y liberación de fármacos acuólicas.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Sintetizar nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl por el método de síntesis asistida por microondas.
- Preparar hidrogeles de quitosano con: 2.5, 5, 7.5 y 10 % (peso de nanovarillas/peso quitosano) por el método de polimerización heterogénea de monómeros empleando como agente entrecruzante al tripolifosfato de sodio.
- Evaluar el grado de hinchamiento de los hidrogeles con respecto al tiempo en medio acuoso a pH 2, 4, 6, 7 y 8.
- Evaluar la liberación de antibiótico OTC en medio acuoso con respecto al tiempo, por espectroscopía de UV-Vis.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los hidrogeles ante la bacteria *Vibrio harveyi*.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Reactivos y equipo

Los reactivos y equipos necesarios para la realización de este trabajo de investigación se enlistan en las Tablas 1 y 2.

*Tabla 1. Lista de reactivos para la síntesis de hidrogeles híbridos.*

| Reactivo                                   | Fórmula química   | Proveedor     | No. CAS    | Pureza    |
|--|---|---------------|------------|-----------|
| <b>Etanol anhidro</b>                      | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH                              | Jalmek        | 64-17-5    | ≥99.5%    |
| <b>1-Dodecanotiol</b>                      | CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> SH             | Sigma-Aldrich | 112-55-0   | ≥98%      |
| <b>Acetato de zinc</b>                     | (CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Zn              | Sigma-Aldrich | 557-34-6   | 99.99%    |
| <b>2-propanol</b>                          | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O                                 | Jalmek        | 67-63-0    | ≥99.5%    |
| <b>Hidróxido de sodio</b>                  | NaOH  | Jalmek        | 1310-73-2  | ≥97%      |
| <b>Hexametilentetramina</b>                | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>                   | Sigma-Aldrich | 100-97-0   | ≥99.5%    |
| <b>Nitrato de zinc hexahidratado</b>       | Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O           | Sigma-Aldrich | 10196-18-6 | 99%       |
| <b>Nitrato de plata</b>                    | AgNO <sub>3</sub>   | Jalmek        | 7761-88-8  | 99%       |
| <b>Ácido clorhídrico (1N)</b>              | HCl   | Jalmek        | 7647-01-0  | -         |
| <b>Quitosano</b>                           | C <sub>56</sub> H <sub>103</sub> N <sub>9</sub> O <sub>39</sub> | Sigma-Aldrich | 9012-76-4  | ≥75%      |
| <b>Ácido acético glacial</b>               | CH <sub>3</sub> COOH  | Jalmek        | 64-19-7    | ≥99.7%    |
| <b>Tripolifosfato de sodio</b>             | Na <sub>5</sub> P <sub>3</sub> O <sub>10</sub>                  | Sigma-Aldrich | 7758-29-4  | 85%       |
| <b>Oxitetraciclina (Oxikarizoo 300 LA)</b> | C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>   | Alivira       | Q-0265-029 | 300 mg/mL |

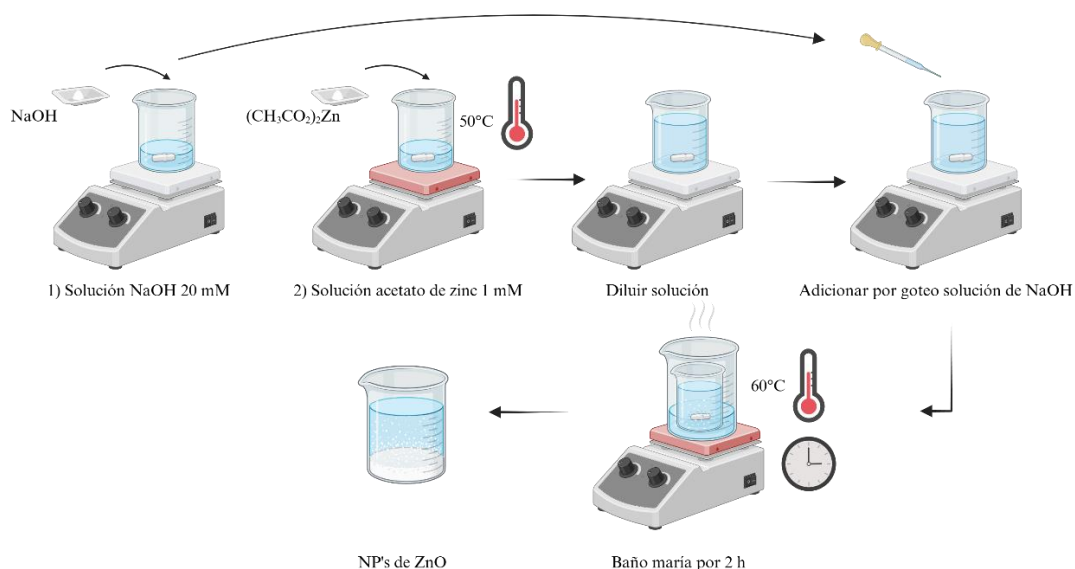
**Tabla 2.** Lista de equipos para la síntesis y caracterización de hidrogeles híbridos.

| Nombre                          | Modelo                     | Variables  |
|---------------------------------|----------------------------|--|
| <b>Horno de microondas</b>      | WM1311DS, marca Whirlpool. | Tiempo: 65 min<br>Potencia: 300 W                |
| <b>Espectrofotómetro UV-Vis</b> | Novel N4S, marca Luzeren   | Intervalo del espectro de absorción: 200-400 nm. |

## 5.2 Síntesis de hidrogeles híbridos

### 5.2.1 Síntesis de NPs de ZnO

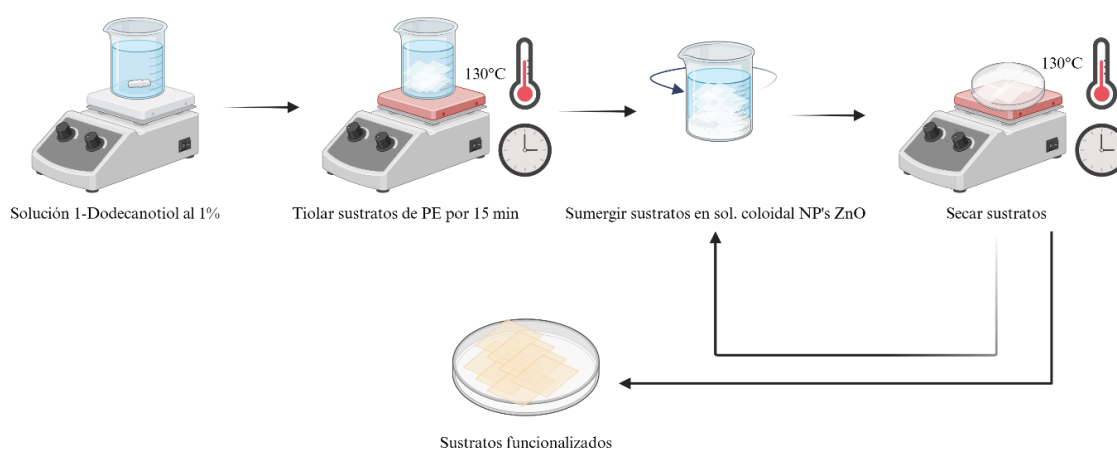
La síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (NPs ZnO) se realizó con base en el artículo de Cardoza-Contreras et al., 2020. En la figura 4 se presenta un esquema del procedimiento, en el que se prepara una solución de acetato de zinc al 1 mM disuelto en 20 mL de 2-propanol con agitación constante y a una temperatura de 50°C. La solución se diluye adicionando 230 mL de 2-propanol. A la par, se prepara una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 20 mM en 2-propanol. La solución de NaOH se adiciona por goteo a la solución anterior y se deja en baño maría a 60 °C por 2 h.



**Figura 4.** Esquema para la síntesis de nanopartículas de ZnO.

### 5.2.2 Preparación de sustratos de PE

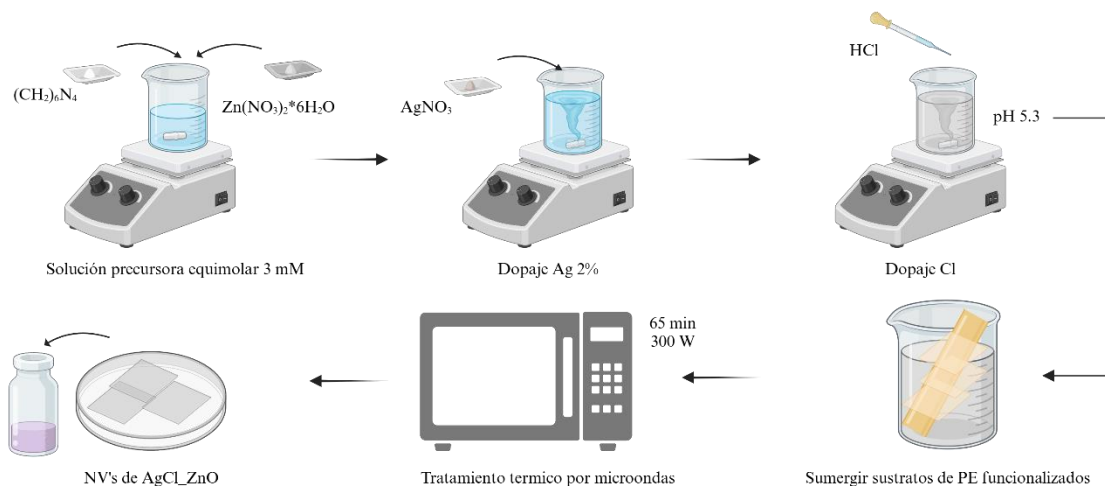
De acuerdo a la metodología descrita por Cardoza-Contreras et al., 2020, y como se aprecia en la Figura 5, se preparan los sustratos de polietileno (PE) de 0.4×1.0 in, tratados en una solución al 1% de 1-Dodecanotiol en etanol, a 130°C por 15 min. Después, los sustratos deben sumergirse a una solución coloidal de nanopartículas de ZnO previamente preparada. Para evaporar el solvente, los sustratos se colocan en vidrios de reloj a una temperatura de 130°C.



**Figura 5.** Esquema para la preparación de sustratos de PE funcionalizados.

### 5.2.3 Síntesis de nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl

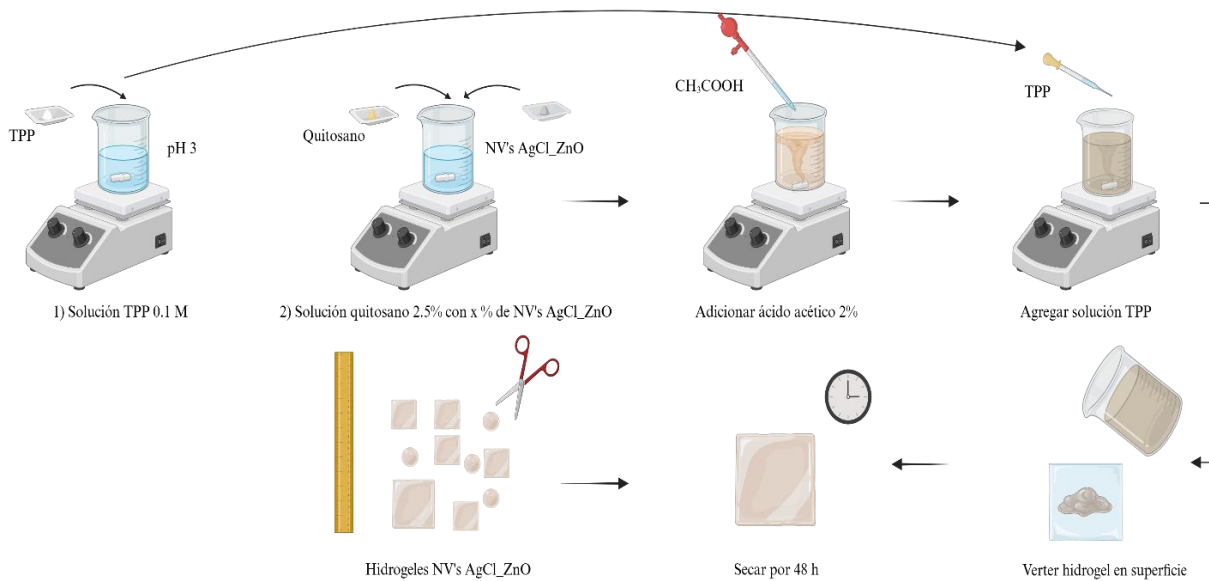
Siguiendo la metodología de Sánchez-Serrano et al., 2023, y como aparece en la Figura 6, se prepara una solución precursora equimolar 3 mM de nitrato de zinc hexahidratado y hexametilentetramina en agua destilada. Asimismo, para lograr dopar las nanovarillas, se agrega 2% de nitrato de plata y ácido clorhídrico (HCl) al 0.1 N, para ajustar la solución a un pH de 5.3. Los sustratos de PE ya funcionalizados se sumergen en la solución y son sometidos a un tratamiento térmico por microondas durante 65 minutos a 300W.



**Figura 6.** Esquema para la síntesis de nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl.

### 5.2.4 Hidrogeles híbridos de quitosano

Con base en la metodología de Sánchez-Serrano et al., 2023, y como se puede apreciar en la Figura 7, se prepara una solución con 0.5 g de quitosano en 20 mL de agua destilada, adicionando las nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl, además de ácido acético al 2% (v/v), agitando hasta la obtención de una solución homogénea, viscosa y con una tonalidad ocre. Dependiendo de la cantidad de nanovarillas añadidas en relación con el peso del quitosano, se obtienen hidrogeles híbridos al 2.5, 5, 7.5 y 10%, los cuales se etiquetan como Q-Zn2.5%, Q-Zn5%, Q-Zn7.5% y Q-Zn10%, respectivamente. Como siguiente paso, se agregan 15 gotas de una solución de tripolifosfato de sodio (TPP) a 0.1 M, ajustada a un pH de 3, manteniendo la agitación, obteniéndose una solución de tonalidad opalescente. Por último, se vierte gota a gota la solución opalescente sobre una superficie plana, y se deja secar al ambiente durante 48 horas.



**Figura 7.** Esquema para la síntesis de hidrogeles con nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl.

## 5.3 Caracterización y análisis

### 5.3.1 Grado de hinchamiento

Los hidrogeles híbridos sintetizados son sensibles al pH de la solución en la que se encuentren, por lo cual, un parámetro de caracterización es la evaluación del grado de absorción de agua a diferentes valores de pH. Para esto se preparó una serie de 5 soluciones acuosas con valores de pH 2, 4, 6, 7 y 8 ajustando el pH con NaOH y HCl. Después, se tomó una cierta cantidad de cada hidrogel sintetizado y fueron sumergidos en cada una de las soluciones. Finalmente, se removió cada hidrogel de las soluciones acuosas (el exceso de agua en la superficie del hidrogel es removida con toallitas secas) y se pesó cada 10 minutos hasta alcanzar los 30 minutos. El porcentaje de hinchamiento se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Hinchamiento} = ((W-W_0)/W_0) \times 100$$

Donde:

W: peso del hidrogel con el agua absorbida

W<sub>0</sub>: peso inicial del hidrogel

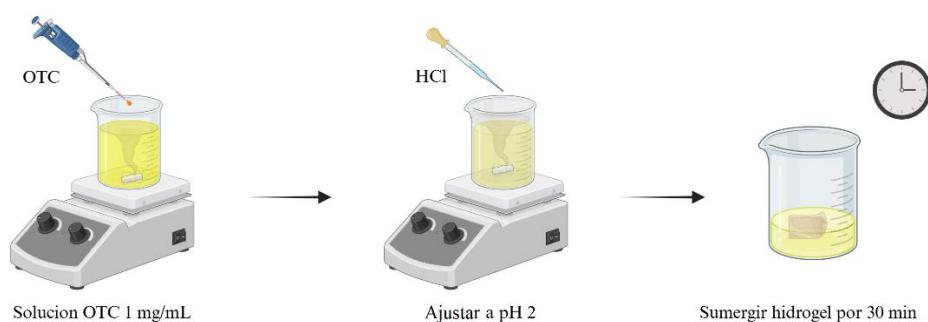
### 5.3.2 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los hidrogeles se determinó mediante antibiogramas donde se evaluó la susceptibilidad de la bacteria *Vibrio harveyi* a las diferentes composiciones de hidrogeles. Para ello, se prepara una solución con el medio de cultivo Mueller Hinton y se colocan volúmenes iguales en placas de Petri (por triplicado). Posteriormente, en cada placa se siembran 25 µl de inóculo a una concentración aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC por mililitro o 0.5 en la escala de McFarland de la bacteria *Vibrio harveyi*. Se colocan 25 µl de cada hidrogel directamente sobre el medio de cultivo después de la inoculación y se dejan incubar las placas durante 24, 48 y 72 h a 35°C para observar el crecimiento. Para cada tratamiento se evalúa el diámetro del halo de inhibición con vernier empleando centímetros como unidad de medición.

### 5.3.3 Absorción de OTC en el hidrogel

La liberación del fármaco se realizó mediante un método espectrofotométrico. Primeramente, se determinó la longitud máxima de absorción ( $\lambda_{\max}$ ) de la oxitetraciclina (OTC). Para ello, se preparó una solución de OTC a una concentración de 1 mg/mL y después se midió el espectro de absorción de esta solución en el intervalo de 200 a 500 nm. Acorde a las referencias, la máxima absorción debería estar entre 275 y 350 nm (Naumoska et al., 2012). Una vez determinada la  $\lambda_{\max}$ , se procedió a realizar una curva de calibración. Para ello, se prepararon 7 tubos de ensayo con concentraciones crecientes de OTC desde los 0 hasta los 10  $\mu\text{g/mL}$  y se midió la absorbancia de cada concentración a la  $\lambda_{\max}$ .

Posteriormente, para evaluar la liberación controlada de antibiótico del hidrogel se determinó una cinética de liberación de la OTC. Como se puede observar en la Figura 8, primero es necesario cargar el hidrogel con el antibiótico, para ello primero se prepara una solución acuosa a pH 2 (el valor del pH se regula con soluciones de HCl). Posteriormente se añade OTC a la solución para quedar con una concentración de OTC de 1 mg/mL. Después, se toman 2 mL de esta solución y se sumerge en ella una cantidad de hidrogel ( $1.5 \pm 0.2$  a  $2.8 \pm 0.2$  mg) por 30 min. Después de los 30 minutos se mide el volumen de solución de OTC adsorbido por el hidrogel.



**Figura 8.** Esquema para la preparación de muestras para carga y liberación del antibiótico.

### 5.3.4 Cinética de liberación de OTC

Una vez que el hidrogel se cargó con la solución de OTC, este se pasa a un recipiente con agua destilada para determinar la concentración de OTC que se va liberando del hidrogel con el paso del tiempo. Para ello, se midió la absorbancia a la  $\lambda_{\max}$  de la OTC de las

soluciones acuosas conteniendo el hidrogel cada 10 min. El procedimiento anterior fue realizado por triplicado para cada hidrogel.

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1 Grado de hinchamiento

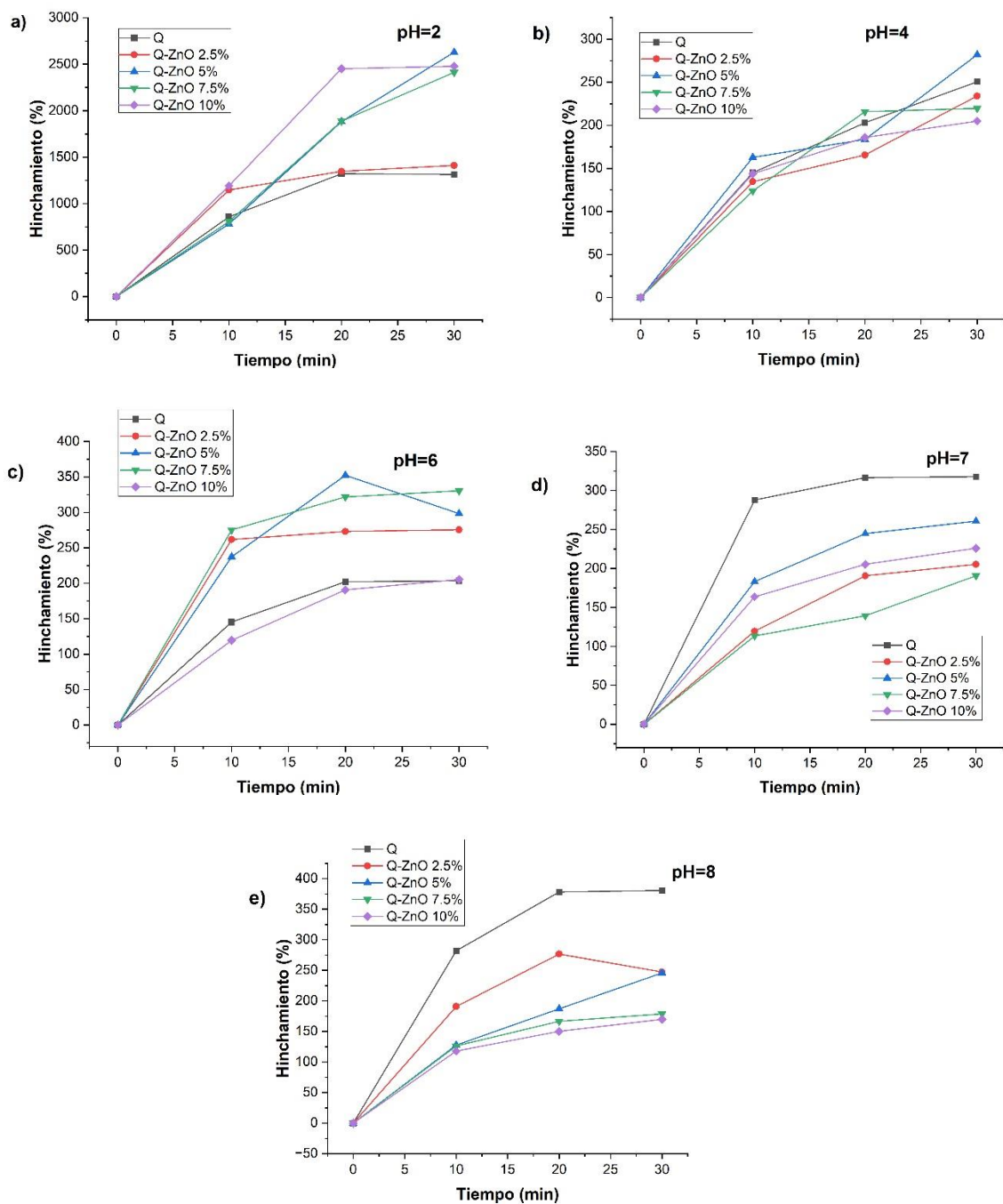
De acuerdo con los datos obtenidos de la Tabla 5 y lo mostrado en la Figura 9, el comportamiento de los hidrogeles de quitosano (Q) y quitosano con nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl (Q-ZnO x%) en medios acuosos a diferentes pH demuestra una mayor capacidad de hinchamiento en condiciones ácidas, alcanzando hasta un 2600%, comparado con su peso original, cuando se encuentra a un pH 2. Sin embargo, a partir de pH > 4 (Figura 9b)), el hidrogel no experimenta cambios morfológicos significativos ni un hinchamiento superior al 400%, independientemente de la presencia de nanovarillas en su estructura.

No obstante, la cantidad de nanovarillas incorporadas en la matriz del hidrogel si influye directamente en su comportamiento a pH 2, ya que un mayor contenido de nanovarillas favorece una mayor absorción de agua y, por ende, un hinchamiento más pronunciado en comparación con los hidrogeles con menos porcentaje de nanovarillas.

La red polimérica del hidrogel de quitosano, reticulada con tripolifosfato de sodio (TPP), se forma principalmente mediante interacciones físicas, como enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo entre los grupos éster del TPP y las cadenas de quitosano. La reticulación iónica con TPP ocurre en condiciones de pH ácido, favoreciendo una mayor capacidad de hinchamiento del hidrogel (Bhumkar & Pokharkar, 2006). Así mismo, en soluciones ácidas, la expansión de la red polimérica del hidrogel se debe a la repulsión electrostática entre los grupos amino protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ) del quitosano, lo que facilita la absorción de agua y el hinchamiento del material (Sánchez-Serrano et al., 2023). Este fenómeno es relevante en el contexto de la liberación controlada de compuestos en peces, ya que los hidrogeles diseñados para aplicaciones en acuicultura deben ser capaces de soportar un pH entre el rango de 1-6 en el estómago, para evitar una liberación prematura, y comenzar su degradación a partir de pH > 5, siendo completamente solubilizados cerca de pH 7 en el intestino (pH 6.5–8.5). Además del efecto del pH, la degradación de los hidrogeles en el tracto intestinal se ve favorecida por la acción de enzimas como las carbohidrasas, que degradan el quitosano en fragmentos más pequeños (Gilannejad et al.,

2018). La incorporación de nanovarillas de ZnO dentro de la matriz del hidrogel no solo influye en su capacidad de hinchamiento, sino que también incrementa la porosidad del material. Estas nanovarillas pueden actuar como estructuras templadas, generando una red más abierta y facilitando la absorción de agua. De tal forma que las interacciones entre los grupos funcionales del quitosano, los iones fosfato del TPP y las nanovarillas de ZnO pueden contribuir a la formación de una estructura polimérica más expandida y con un comportamiento de hinchamiento optimizado.

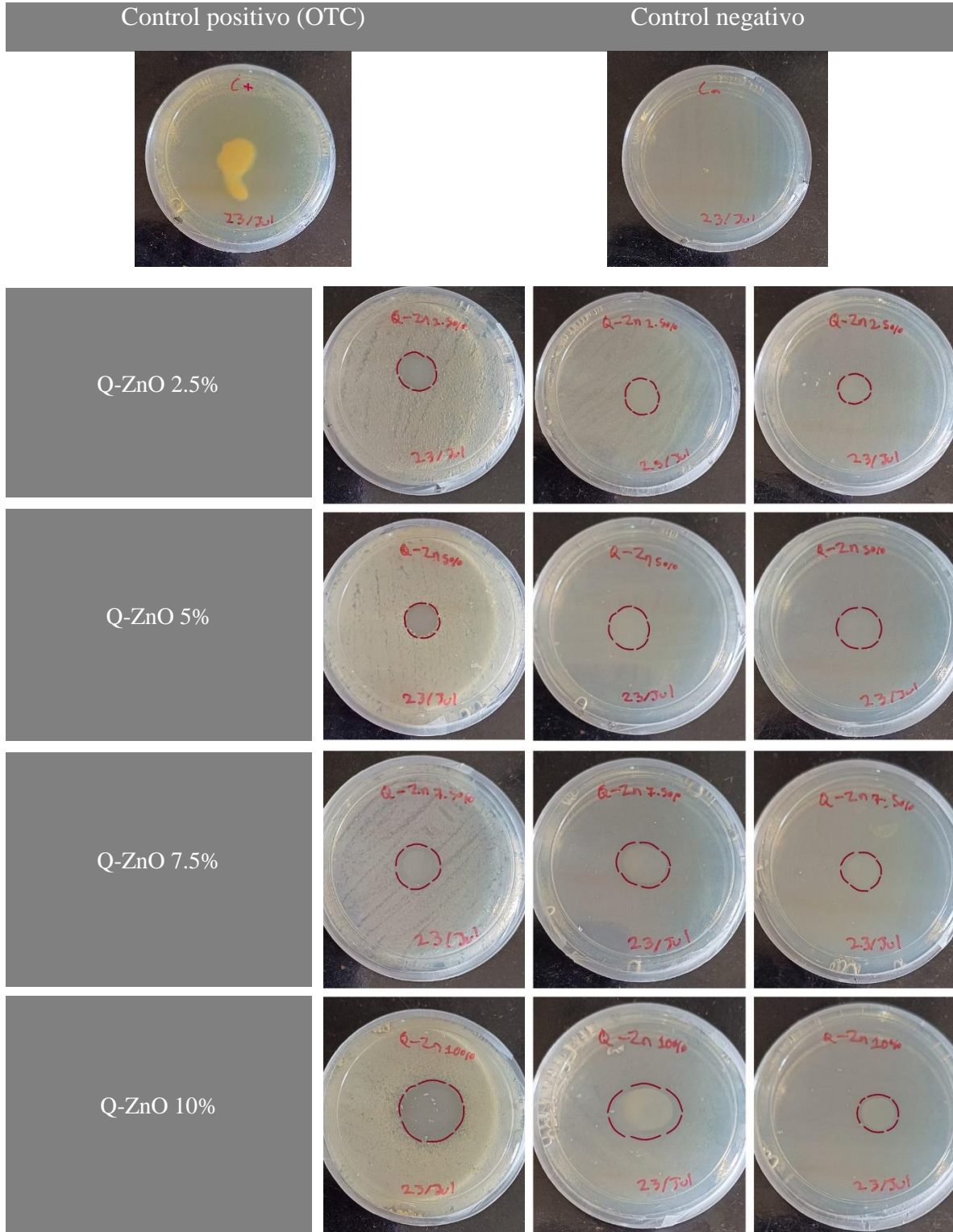
A valores de pH 7 y 8 la concentración de nanovarillas afectó la capacidad de hinchamiento, ya que como se puede observar en las Figuras 9d) y 9e), el hidrogel de quitosano captó un mayor porcentaje de solución acuosa que los hidrogeles híbridos. Es muy probable que esta afectación sea debido a la disminución de las interacciones del grupo amino con el ZnO y con los iones fosfatos del TPP. Como ya se mencionó, a valores de pH ácidos los grupos amino del quitosano se protonan ( $-\text{NH}_3^+$ ), lo cual favorece las atracciones de estos grupos con la carga parcial negativa del ZnO y la carga negativa de los iones fosfato. Sin embargo, a valores de pH neutros o básicos estas interacciones electrostáticas disminuyen por la neutralidad del grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ).



**Figura 9.** Cinéticas de hinchamiento de hidrogeles de quitosano (Q) e hidrogeles híbridos (Q-ZnO x%) en a) pH 2, b) pH 4, c) pH 6, d) pH 7 y e) pH 8.

## 6.2 Actividad antimicrobiana

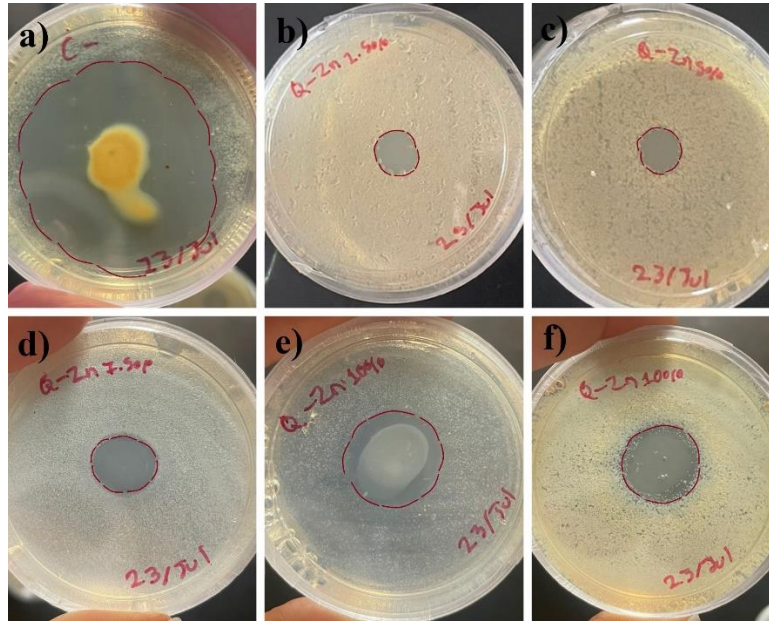
La Figura 10 muestra los halos de inhibición generados por los hidrogeles híbridos de quitosano con nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl (Q-ZnO x%) contra *Vibrio harveyi*, utilizando 25  $\mu$ L de OTC como control positivo. Los antibiogramas se realizaron por triplicado y, sin importar la concentración de nanovarillas en cada hidrogel, todos demostraron efectos inhibidores prolongados por más de 24 horas. Aunque los halos de inhibición fueron similares entre los diferentes hidrogeles, el que contenía un 10% de nanovarillas presentó un efecto ligeramente mayor. Este hidrogel mantuvo una actividad antimicrobiana significativa incluso después de 72 horas, como se observa en las Figuras 11 y 12, a diferencia de la OTC, cuyo halo comenzó a reducirse con el tiempo. Esto sugiere que el hidrogel podría tener un efecto antibacteriano similar al de un antibiótico convencional, ya que, la zona de contacto entre el hidrogel y el medio de cultivo se mantuvo completamente libre de crecimiento bacteriano durante todo el periodo de prueba.



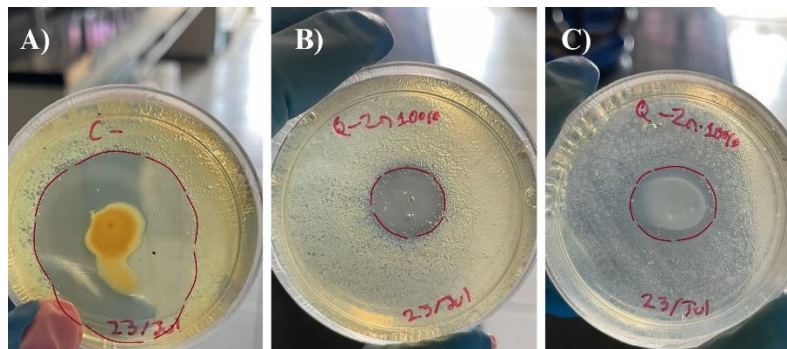
**Figura 10.** Zonas de inhibición (por triplicado) de la síntesis de hidrogeles híbridos contra *Vibrio harveyi* a las 24 h.

**Tabla 3.** Diámetros de zonas de inhibición de los hidrogeles híbridos contra *Vibrio harveyi*.

| Hidrogel   | Diámetros zonas de inhibición (cm) |
|------------|------------------------------------|
| Control    | 4.3                                |
| Q-ZnO 2.5% | 1.3 ± 0.15                         |
| Q-ZnO 5%   | 0.9 ± 0.15                         |
| Q-ZnO 7.5% | 1 ± 0.15                           |
| Q-ZnO 10%  | 1.6 + 0.20                         |



**Figura 11.** Zonas de inhibición de la síntesis de hidrogeles híbridos, donde a) corresponde al control positivo, b) al hidrogel Q-ZnO 2.5%, c) al hidrogel Q-ZnO 5%, d) al hidrogel Q-ZnO 7.5%, e) y f) al hidrogel Q-ZnO 10%, contra *Vibrio harveyi* a las 48 h.



**Figura 12.** Zonas de inhibición de la síntesis de hidrogeles híbridos, donde a) corresponde al control positivo, b) y c) al hidrogel Q-ZnO 10%, contra *Vibrio harveyi* a las 72 h.

La actividad antimicrobiana de los hidrogeles se ve favorecida por la presencia de nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl. Las nanovarillas tienen una relación de aspecto

mayor (longitud mucho mayor que su diámetro), lo que aumenta el área de contacto con las bacterias en comparación con las nanopartículas esféricas. Una mayor área de contacto mejora la liberación de iones metálicos (por ejemplo,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^+$ ), lo que permite penetrar la membrana celular bacteriana debido a su forma alargada y sus extremos más afilados generando más daño estructural (Babayevska et al., 2022; Sadeghi et al., 2012)

Cuando el ZnO interactúa con bacterias, se produce la liberación de cationes  $Zn^{2+}$ , que penetran la membrana celular a través de interacciones electrostáticas, provocando desestabilización, aumento de la permeabilidad, alteración de los ácidos nucleicos y desactivación de enzimas esenciales. Paralelamente, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intensifica el daño celular, al inducir estrés oxidativo y afectar la integridad estructural de la membrana. También, las irregularidades en la superficie del ZnO favorecen la desestabilización de la membrana bacteriana, mientras que la acción combinada de los cationes  $Zn^{2+}$  y las ROS, sumada al efecto abrasivo de las nanopartículas, acelera la destrucción microbiana (Klienchen de Maria et al., 2024).

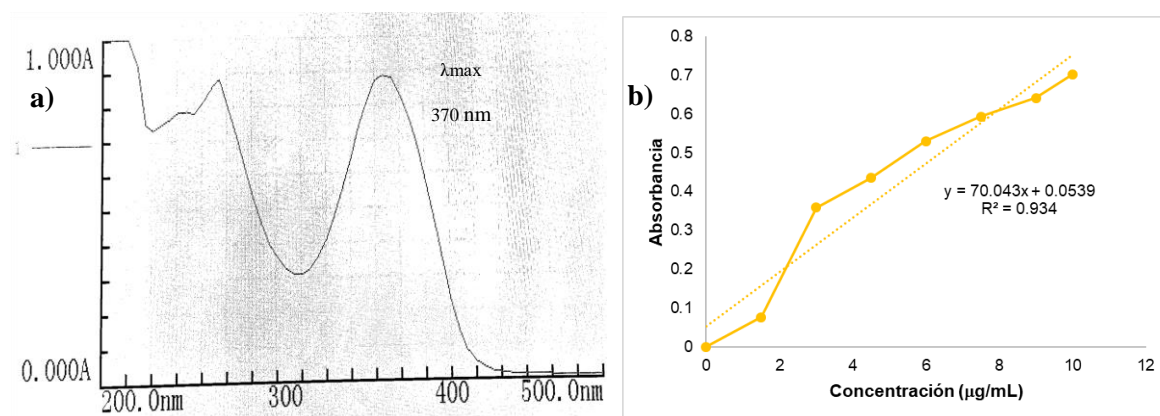
Además, el dopaje con plata (Ag) potencia aún más la actividad antimicrobiana del ZnO, ya que, en el caso de las nanopartículas de Ag, estas presentan propiedades fisicoquímicas únicas, como su reducido tamaño y alta reactividad superficial. Los iones  $Ag^+$  liberados interactúan con la pared celular bacteriana, lo que genera alteraciones estructurales que conducen a la pérdida de integridad de la membrana, la fuga del contenido citoplasmático y la interrupción de los procesos de división celular, provocando finalmente la lisis de la bacteria (Rilda et al., 2024). En el caso del dopaje con cloro (Cl), la presencia de iones  $Cl^-$  en la superficie del ZnO permite la formación de hipoclorito ( $ClO^-$ ) y ácido hipocloroso (HOCl) en medios acuosos. Estas especies presentan una fuerte capacidad antimicrobiana, ya que son capaces de alterar proteínas y ácidos nucleicos bacterianos, perforar la membrana celular, interferir con la replicación y el metabolismo microbiano y proporcionar un efecto desinfectante adicional (Ma et al., 2020).

Asimismo, no debe pasarse por alto la actividad antimicrobiana intrínseca del quitosano. Como se ha reportado en diversos estudios, su mecanismo de acción radica en la interacción entre los grupos amino protonados ( $-NH_3^+$ ) del quitosano y las cargas negativas de la membrana bacteriana o fúngica. Esta interacción electrostática altera la permeabilidad

de la membrana celular y es especialmente efectiva en microorganismos con membranas ricas en ácidos grasos poliinsaturados, lo que puede explicar su afinidad por ciertas cepas bacterianas (Bautista-Baños et al., 2017).

### 6.3 Liberación del antibiótico

En la Figura 13a) se muestra el espectro de absorción de la OTC, identificando dos picos principales a 270 nm y 370 nm. Para futuras mediciones, se utilizó el pico de 370 nm como la longitud máxima de absorción ( $\lambda_{max}$ ). Aunque este valor es ligeramente superior al reportado en otras referencias (Khrushchev et al., 2021; Naumoska et al., 2012; PubChem, s/f; Rivas et al., 2020), sigue siendo adecuado para el análisis. Las diferencias en la posición del pico pueden atribuirse a la concentración de la solución de OTC utilizada (<1 mg/mL) o a la composición del solvente. Por ejemplo, Naumoska et al., 2012, emplearon una mezcla de agua desionizada y metanol, mientras que en este estudio se utilizó únicamente agua desionizada, lo que podría haber influido en el desplazamiento del  $\lambda_{max}$ .



**Figura 13.** a) medición del espectro de OTC para la determinación de su longitud máxima de absorción ( $\lambda_{max}$ ) y b) curva de calibración de la OTC.

Por otra parte, la OTC presenta una absorción característica en la región ultravioleta-visible (UV-Vis) debido a la presencia de cromóforos en su estructura química. En particular, los grupos amida, dicetona e hidroxilo del anillo A, junto con el fenilhidroxicetona asociado a los carbonilos y cetonas en los anillos D, C y B, son responsables de esta absorción (Rivas et al., 2020). En la Figura 13b) se muestra la curva de calibración de la OTC.

La cinética de liberación de OTC en un tiempo de 80 minutos por los hidrogeles sintetizados está representada en la gráfica de la Figura 14. El hidrogel de quitosano sin adición de nanomateriales (Q) presentó la menor retención de OTC durante el proceso de carga (30 min), con una liberación de apenas 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Mientras que en los hidrogeles con mayor concentración de nanovarillas la liberación fue más rápida durante los primeros 10 minutos., pero pasado ese tiempo, el proceso fue más lento hasta alcanzar concentraciones de 5.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Q-ZnO 10%) y 5.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Q-ZnO 7.5%), al cabo de 80 minutos.

Cabe recordar que los hidrogeles fueron cargados en una solución con una concentración de 1 mg/mL de OTC a pH 2. Y tras el proceso de carga, el volumen residual en los recipientes fue aproximadamente el mismo para todos los hidrogeles, lo cual permite estimar que cada uno absorbió una cantidad equivalente de solución de antibiótico (~0.2 mL). Considerando que cada hidrogel cargado se colocó en 10 mL de agua destilada para el ensayo de liberación, se puede calcular que, si el 100% del OTC contenido fuera liberado, la concentración máxima esperada sería de 19.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En este contexto, los hidrogeles con mayor contenido de nanovarillas liberaron entre el 16% y el 29% del antibiótico en 80 minutos, mientras que el hidrogel Q apenas alcanzó una liberación del 7%. Extrapolando estos datos, se estima que los hidrogeles con concentraciones más altas de nanovarillas podrían liberar la totalidad del antibiótico en un lapso aproximado de 4 h (Tabla 4). Por su parte, los hidrogeles con concentraciones menores del nanomaterial, este tiempo podría aumentar de 6 a 8 h, mientras que en el caso del hidrogel solo de quitosano ese tiempo podría extenderse hasta 18 h.

No obstante, es importante mencionar que en el lapso entre los 30 y los 80 minutos el incremento en la liberación fue mínimo para todos los tratamientos, lo que sugiere que parte de la OTC podría estar formando interacciones muy fuertes con la matriz del hidrogel, dificultando su liberación.

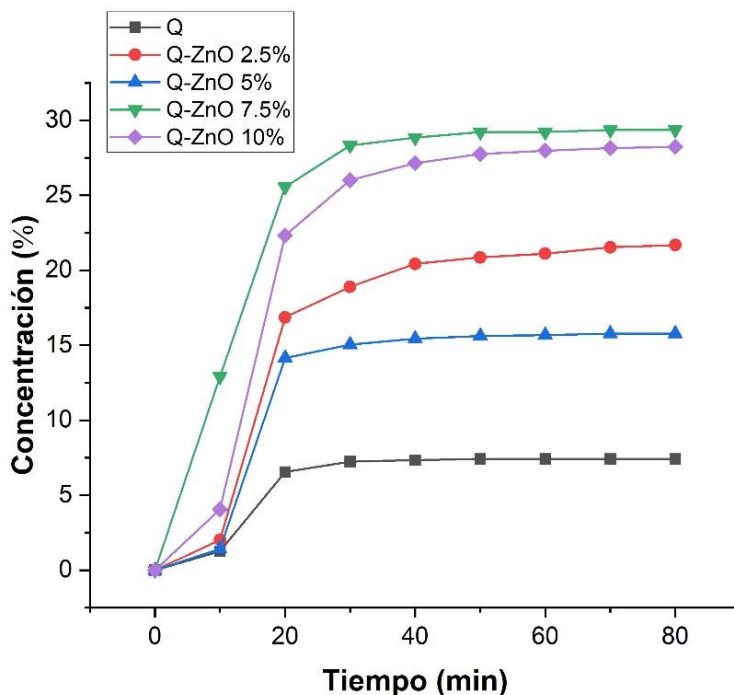


Figura 14. Liberación de OTC por los hidrogeles híbridos en un tiempo de 80 min.

Tabla 4. Tiempo de liberación del antibiótico.

| Muestra    | Liberación de OTC en 80 min (%) | Tiempo para liberación total de OTC (min) |
|------------|---------------------------------|---|
| Q          | 7.41                            | 1080                                      |
| Q-ZnO 2.5% | 21.69                           | 369                                       |
| Q-ZnO 5%   | 15.77                           | 507                                       |
| Q-ZnO 7.5% | 29.36                           | 273                                       |
| Q-ZnO 10%  | 28.23                           | 283                                       |

La presencia de iones  $Zn^{2+}$  y  $Ag^+$  en las nanovarillas puede favorecer la adsorción del antibiótico a las superficies metálicas mediante interacciones tipo quelato o puentes de hidrógeno coordinados, contribuyendo así a una mayor retención dentro de la red polimérica. Por otro lado, también es posible que el aumento en la concentración de nanovarillas de ZnO dopadas modifique la porosidad del hidrogel, generando una estructura más abierta que facilite la absorción de agua y, potencialmente, debilite las interacciones

entre el quitosano y la OTC. Esta situación podría favorecer una liberación más rápida del antibiótico, especialmente en las primeras etapas del proceso.

Mientras que la lenta liberación de OTC por el hidrogel de quitosano puede corresponder a diversas interacciones químicas entre el hidrogel y los grupos funcionales presentes en la OTC. El quitosano es un polímero cargado positivamente (por sus grupos amino protonados  $-\text{NH}_3^+$  a pH ácido). La OTC, dependiendo del pH, puede presentar cargas negativas (por sus grupos carboxilato y fenólico). A pH 7, la OTC presenta una carga neta negativa, por la desprotonación de su grupo carboxilo y de los grupos fenólicos. Mientras, que el quitosano pierde parte de su carga positiva, por lo que disminuyen un poco las interacciones electrostáticas con fármacos aniónicos como la OTC. Sin embargo, la OTC posee múltiples grupos funcionales capaces de formar puentes de hidrógeno (grupos  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $=\text{O}$ ) los cuales pueden interactuar con los grupos hidroxilo del quitosano y los grupos fosfato del TPP. El TPP, al contener múltiples grupos fosfato cargados negativamente, puede formar complejos iónicos o puentes salinos tanto con el quitosano como con la OTC.

En conjunto, los resultados obtenidos respaldan la hipótesis planteada: la concentración de nanomateriales incorporados en los hidrogeles de quitosano influye significativamente en la capacidad de carga y en la cinética de liberación de fármacos acuícolas. Por lo tanto, es posible ajustar y optimizar dicha concentración para controlar el tiempo de retención de compuestos terapéuticos, para una liberación prolongada y controlada del principio activo.

## 7. Conclusión

En este trabajo, se desarrollaron hidrogeles híbridos de quitosano con diferentes concentraciones de nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl (2.5%, 5%, 7.5% y 10%). Se demostró que la concentración de nanovarillas si influye en la cinética de hinchamiento y en la actividad antimicrobiana del hidrogel, favoreciendo una mayor adsorción de solución de OTC, cuando se encuentra en pH ácidos. En particular, el hidrogel Q-ZnO 10% mostró una actividad antimicrobiana prolongada de hasta 72 horas, lo que sugiere que podría ser una alternativa eficaz a los antibióticos convencionales.

Además, los resultados obtenidos demuestran que la incorporación de nanovarillas de ZnO dopadas con Ag y Cl en hidrogeles de quitosano influye significativamente en la cinética de liberación de oxitetraciclina. En particular, los hidrogeles con menor concentración de nanomateriales (2.5% y 5%) mostraron que pueden liberar de forma más controlada el antibiótico alcanzando tiempos de liberación total de 6 a 8 h. En contraste, los hidrogeles con mayores concentraciones de nanovarillas liberan el fármaco en tiempos menores. Este comportamiento sugiere que es posible modular el perfil de liberación mediante el ajuste de la concentración de nanovarillas, permitiendo el diseño de sistemas de liberación controlada con aplicaciones potenciales en acuicultura. Estos resultados resaltan la capacidad de los hidrogeles híbridos antimicrobianos como sistemas eficientes para la liberación prolongada de antibióticos acuícolas, contribuyendo a una administración más efectiva de fármacos y a la reducción de riesgos asociados con la sobredosificación y la resistencia antimicrobiana.

## 8. Referencias

- Babayevska, N., Przysiecka, Ł., Iatsunskiy, I., Nowaczyk, G., Jarek, M., Janiszewska, E., & Jurga, S. (2022). ZnO size and shape effect on antibacterial activity and cytotoxicity profile. *Scientific Reports*, 12(1), 8148. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12134-3>
- Baukum, J., Pranjan, J., Kaolaor, A., Chuysinuan, P., Suwantong, O., & Supaphol, P. (2020). The potential use of cross-linked alginate/gelatin hydrogels containing silver nanoparticles for wound dressing applications. *Polymer Bulletin*, 77(5), 2679–2695. <https://doi.org/10.1007/s00289-019-02873-1>
- Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., Correa-Pacheco, Z., Corona-Rangel, M. L., Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., Correa-Pacheco, Z., & Corona-Rangel, M. L. (2017). Quitosano: Un polisacárido antimicrobiano versátil para frutas y hortalizas en poscosecha - una revisión. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 23(2), 103–122. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.030>
- Bhumkar, D. R., & Pokharkar, V. B. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS PharmSciTech*, 7(2), 50. <https://doi.org/10.1208/pt070250>
- Borghi, A. A., & Palma, M. S. A. (2014). Tetracycline: Production, waste treatment and environmental impact assessment. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 25–40. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100003>
- Cabello, F. C. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile: Consecuencias para la salud humana y animal. *Revista médica de Chile*, 132(8), 1001–1006. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872004000800014>
- Cardoza-Contreras, M. N., Sánchez-Serrano, S., & Contreras, O. E. (2020). Highly efficient photocatalytic and antimicrobial AgGaCl tri-doped ZnO nanorods for water treatment under visible light irradiation. *Catalysts*, 10(7), 752.
- Djekic, L., Martinović, M., Ćirić, A., & Fraj, J. (2020). Composite chitosan hydrogels as advanced wound dressings with sustained ibuprofen release and suitable application characteristics. *Pharmaceutical Development and Technology*, 25(3), 332–339. <https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1701495>
- FAO. (2022). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022*. FAO ; <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cc0461es>
- Gilannejad, N., Martínez-Rodríguez, G., Yúfera, M., & Moyano, F. J. (2018). Modelling digestive hydrolysis of nutrients in fish using factorial designs and desirability function. *PLOS ONE*, 13(11), e0206556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206556>
- González Méndez, D. J. (2023). *Síntesis y caracterización de hidrogeles híbridos para su potencial aplicación en encapsulados de compuestos bioactivos en acuicultura*. UABC.
- Karmakar, S., Kumar, K., Abraham, T. J., Kumar, S., Kumar, S., Shukla, S. P., & Dey, B. (2024). The role of environmentally relevant concentrations of oxytetracycline in the emergence of

- antimicrobial resistance in *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*. *Journal of Hazardous Materials Letters*, 5, 100130. <https://doi.org/10.1016/j.hazl.2024.100130>
- Khrushchev, A. Yu., Akmaev, E. R., Bondarenko, V. O., & Kis, I. V. (2021). Quantitative Determination of Oxytetracycline in Water-Based Liquid Dosage Forms by Raman Spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy*, 88(1), 108–113. <https://doi.org/10.1007/s10812-021-01147-x>
- Klienchen de Maria, V. P., Guedes de Paiva, F. F., Tamashiro, J. R., Silva, L. H. P., da Silva Pinho, G., Rubio-Marcos, F., & Kinoshita, A. (2024). Advances in ZnO nanoparticles in building material: Antimicrobial and photocatalytic applications – Systematic literature review. *Construction and Building Materials*, 417, 135337. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2024.135337>
- Kocak, G., Tuncer, C., & Bütün, V. (2016). pH-Responsive polymers. *Polymer Chemistry*, 8(1), 144–176. <https://doi.org/10.1039/C6PY01872F>
- Lei, X., Xu, X., Liu, L., Kuang, H., Xu, L., & Xu, C. (2022). Immunochromatographic assays for ultrasensitive and high specific determination of enrofloxacin in milk, eggs, honey, and chicken meat. *Journal of Dairy Science*, 105(3), 1999–2010. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20276>
- Liang, F., Li, C., Hou, T., Wen, C., Kong, S., Ma, D., Sun, C., & Li, S. (2020). Effects of Chitosan–Gentamicin Conjugate Supplement on Non-Specific Immunity, Aquaculture Water, Intestinal Histology and Microbiota of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Drugs*, 18(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/md18080419>
- Liu, C., Pan, K., Xu, H., Song, Y., Qi, X., Lu, Y., Jiang, X., & Liu, H. (2024). The effects of enrofloxacin exposure on responses to oxidative stress, intestinal structure and intestinal microbiome community of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Chemosphere*, 348, 140751. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140751>
- Liu, X., Eres, L., & Tarafder, S. (2019). Curcumin-releasing chitosan/aloë membrane for skin regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 359, 1111–1119. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.073>
- Ma, C., Zhong, G., Zhao, Y., Zhang, P., Fu, Y., & Shen, B. (2020). Recent development of synthetic probes for detection of hypochlorous acid/hypochlorite. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 240, 118545. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118545>
- Mohan, A., & Ashraf, P. M. (2019). Biofouling Control Using Nano Silicon Dioxide Reinforced Mixed-Charged Zwitterionic Hydrogel in Aquaculture Cage Nets. *Langmuir*, 35(12), 4328–4335. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04071>
- Naumoska, M., Dimitrieska-Stojković, E., & Stojković, G. (2012, abril). (PDF) COMPARISON OF SPECTROPHOTOMETRIC AND COMPLEXOMETRIC – SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY FOR DETERMINATION OF OXYTETRACYCLINE IN VETERINARY DRUGS. *ResearchGate*. 3rd International Scientific Meeting. [https://www.researchgate.net/publication/258696807\\_COMPARISON\\_OF\\_SPECTROPHOTOMETRIC\\_AND\\_COMPLEXOMETRIC\\_-](https://www.researchgate.net/publication/258696807_COMPARISON_OF_SPECTROPHOTOMETRIC_AND_COMPLEXOMETRIC_-)

\_SPECTROPHOTOMETRIC\_ASSAY\_FOR\_DETERMINATION\_OF\_OXYTETRACYCLINE\_IN\_VETERINARY\_DRUGS

- Park, B. G., Kang, H.-S., Lee, W., Kim, J. S., & Son, T.-I. (2013). Reinforcement of pH-responsive  $\gamma$ -poly(glutamic acid)/chitosan hydrogel for orally administrable colon-targeted drug delivery. *Journal of Applied Polymer Science*, *127*(1), 832–836. <https://doi.org/10.1002/app.37565>
- PubChem. (s/f). *Oxytetracycline*. Recuperado el 27 de enero de 2025, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54675779>
- Reverte, A., Aparicio, A., Molino, J., & Reginensi, D. (2021). DESARROLLO DE HIDROGELES EN APLICACIONES EN BIOMEDICINA. *Gente Clave*, *5*(1), Article 1.
- Rilda, Y., Puspita, F., Refinel, R., Armaini, A., Agustien, A., Pardi, H., & Sofyan, N. (2024). Biosynthesis of Ag-doped ZnO nanorods using template *Bacillus* sp. And polyethylene glycol via sol-gel-hydrothermal methods for antifungal application. *South African Journal of Chemical Engineering*, *47*, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2023.10.013>
- Rivas, B. L., Oñate, P., Palacio, D. A., Rivas, B. L., Oñate, P., & Palacio, D. A. (2020). REMOVAL OF OXYTETRACYCLINE BY POLYMERS. AN OVERVIEW. *Journal of the Chilean Chemical Society*, *65*(4), 4943–4947. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072020000404943>
- Sadeghi, B., Garmaroudi, F. S., Hashemi, M., Nezhad, H. R., Nasrollahi, A., Ardalan, S., & Ardalan, S. (2012). Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates. *Advanced Powder Technology*, *23*(1), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2010.11.011>
- Sánchez-Serrano, S., González-Méndez, D. J., Olivas-Valdez, J. A., Millán-Aguiñaga, N., Evangelista, V., Contreras, O. E., & Cardoza-Contreras, M. N. (2023). pH-Responsive Chitosan-Doped ZnO Hybrid Hydrogels for the Encapsulation of Bioactive Compounds in Aquaculture. *Polymers*, *15*(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/polym15204105>
- Veer Jain, H., Dhiman, S., & Ansari, N. G. (2024). Recent trends in techniques, process and sustainability of slow-release formulation for pesticides. *Industrial Crops and Products*, *216*, 118764. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118764>
- Yadollahi, M., Gholamali, I., Namazi, H., & Aghazadeh, M. (2015). Synthesis and characterization of antibacterial carboxymethyl cellulose/ZnO nanocomposite hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, *74*, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.032>
- Zhang, Y., Wang, L., Zhuang, H., Li, X., Gao, X., An, Z., Liu, X., Yang, H., Wei, W., & Zhang, X. (2019). Excessive use of enrofloxacin leads to growth inhibition of juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *169*, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.042>

## 9. Anexos

**Tabla 5.** Datos por triplicado obtenidos para la generación de gráficas de cinéticas de hinchamiento

a) pH 2

### Ch

| Tiempo (min)    | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| W <sub>0</sub>  | 0.0044      | 0.0048      | 0.0046      |
| W <sub>10</sub> | 0.0434      | 0.0445      | 0.0442      |
| W <sub>20</sub> | 0.0652      | 0.0657      | 0.0651      |
| W <sub>30</sub> | 0.0650      | 0.0649      | 0.0651      |

### Q-ZnO 2.5%

| Tiempo (min)    | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| W <sub>0</sub>  | 0.0016      | 0.0019      | 0.0018      |
| W <sub>10</sub> | 0.0465      | 0.0075      | 0.0079      |
| W <sub>20</sub> | 0.0550      | 0.0091      | 0.0077      |
| W <sub>30</sub> | 0.0496      | 0.0151      | 0.0115      |

### Q-ZnO 5%

| Tiempo (min)    | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| W <sub>0</sub>  | 0.0019      | 0.0017      | 0.0017      |
| W <sub>10</sub> | 0.0132      | 0.0107      | 0.0224      |
| W <sub>20</sub> | 0.0290      | 0.0305      | 0.0446      |
| W <sub>30</sub> | 0.0478      | 0.0470      | 0.0494      |

### Q-ZnO 7.5%

| Tiempo (min)    | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| W <sub>0</sub>  | 0.0020      | 0.0013      | 0.0016      |
| W <sub>10</sub> | 0.0197      | 0.0116      | 0.0135      |
| W <sub>20</sub> | 0.0449      | 0.0265      | 0.0269      |
| W <sub>30</sub> | 0.0617      | 0.0320      | 0.0319      |

### Q-ZnO 10%

| Tiempo (min)    | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| W <sub>0</sub>  | 0.0020      | 0.0019      | 0.0020      |
| W <sub>10</sub> | 0.0304      | 0.0189      | 0.0272      |

|                       |        |        |        |
|-----------------------|--------|--------|--------|
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0427 | 0.0454 | 0.0626 |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0443 | 0.0454 | 0.0626 |

b) pH 4

**Ch**

| <b>Tiempo (min)</b>   | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0056      | 0.0061      | 0.0055      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0130      | 0.0136      | 0.0130      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0160      | 0.0170      | 0.0150      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0213      | 0.0226      | 0.0219      |

**Q-ZnO 2.5%**

| <b>Tiempo (min)</b>   | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0015      | 0.0025      | 0.0024      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0032      | 0.0058      | 0.0062      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0038      | 0.0064      | 0.0069      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0067      | 0.0067      | 0.0069      |

**Q-ZnO 5%**

| <b>Tiempo (min)</b>   | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0028      | 0.0013      | 0.0014      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0059      | 0.0050      | 0.0027      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0066      | 0.0054      | 0.0028      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0078      | 0.0084      | 0.0031      |

**Q-ZnO 7.5%**

| <b>Tiempo (min)</b>   | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0017      | 0.0017      | 0.0015      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0045      | 0.0034      | 0.0031      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0078      | 0.0040      | 0.0038      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0078      | 0.0042      | 0.0038      |

**Q-ZnO 10%**

| <b>Tiempo (min)</b>   | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0016      | 0.0015      | 0.0018      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0051      | 0.0031      | 0.0037      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0051      | 0.0045      | 0.0043      |

|                       |        |        |        |
|-----------------------|--------|--------|--------|
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0055 | 0.0049 | 0.0044 |
|-----------------------|--------|--------|--------|

c) pH 6

**Ch**

| <b>Tiempo (min)</b>   | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0053      | 0.0055      | 0.0056      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0132      | 0.0136      | 0.0134      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0169      | 0.0174      | 0.0152      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0170      | 0.0173      | 0.0154      |

**Q-ZnO 2.5%**

| <b>Tiempo (min)</b>   | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0013      | 0.0016      | 0.0014      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0056      | 0.0067      | 0.0033      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0056      | 0.0069      | 0.0036      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0061      | 0.0064      | 0.0036      |

**Q-ZnO 5%**

| <b>Tiempo (min)</b>   | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0015      | 0.0016      | 0.0019      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0045      | 0.0055      | 0.0070      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0060      | 0.0079      | 0.0088      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0059      | 0.0060      | 0.0081      |

**Q-ZnO 7.5%**

| <b>Tiempo (min)</b>   | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0016      | 0.0015      | 0.0019      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0055      | 0.0062      | 0.0070      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0066      | 0.0064      | 0.0081      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0061      | 0.0067      | 0.0088      |

**Q-ZnO 10%**

| <b>Tiempo (min)</b>   | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0018      | 0.0021      | 0.0017      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0044      | 0.0040      | 0.0038      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0066      | 0.0053      | 0.0043      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0062      | 0.0057      | 0.0051      |

d) pH 7

**Ch**

| Tiempo (min)          | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0053      | 0.0051      | 0.0050      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0199      | 0.0196      | 0.0202      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0211      | 0.0215      | 0.0215      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0213      | 0.0215      | 0.0215      |

**Q-ZnO 2.5%**

| Tiempo (min)          | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0018      | 0.0021      | 0.0017      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0044      | 0.0040      | 0.0038      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0066      | 0.0053      | 0.0043      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0062      | 0.0057      | 0.0051      |

**Q-ZnO 5%**

| Tiempo (min)          | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0016      | 0.0011      | 0.0018      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0046      | 0.0038      | 0.0039      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0054      | 0.0043      | 0.0055      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0062      | 0.0044      | 0.0053      |

**Q-ZnO 7.5%**

| Tiempo (min)          | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0018      | 0.0020      | 0.0019      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0033      | 0.0045      | 0.0044      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0035      | 0.0050      | 0.0052      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0045      | 0.0058      | 0.0063      |

**Q-ZnO 10%**

| Tiempo (min)          | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0016      | 0.0014      | 0.0016      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0051      | 0.0032      | 0.0039      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0060      | 0.0039      | 0.0042      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0060      | 0.0045      | 0.0045      |

e) pH 8

**Ch**

| Tiempo (min)          | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0041      | 0.0045      | 0.0048      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0167      | 0.0174      | 0.0169      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0208      | 0.0213      | 0.0218      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0209      | 0.0214      | 0.0219      |

**Q-ZnO 2.5%**

| Tiempo (min)          | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0012      | 0.0014      | 0.0014      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0037      | 0.0042      | 0.0037      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0043      | 0.0050      | 0.0058      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0041      | 0.0044      | 0.0054      |

**Q-ZnO 5%**

| Tiempo (min)          | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0020      | 0.0017      | 0.0018      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0050      | 0.0033      | 0.0043      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0056      | 0.0044      | 0.0058      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0061      | 0.0064      | 0.0064      |

**Q-ZnO 7.5%**

| Tiempo (min)          | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0014      | 0.0014      | 0.0014      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0030      | 0.0031      | 0.0034      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0037      | 0.0037      | 0.0038      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0037      | 0.0041      | 0.0039      |

**Q-ZnO 10%**

| Tiempo (min)          | 1) Peso (g) | 2) Peso (g) | 3) Peso (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>W<sub>0</sub></b>  | 0.0021      | 0.0018      | 0.0020      |
| <b>W<sub>10</sub></b> | 0.0043      | 0.0043      | 0.0042      |
| <b>W<sub>20</sub></b> | 0.0054      | 0.0051      | 0.0042      |
| <b>W<sub>30</sub></b> | 0.0062      | 0.0052      | 0.0045      |