Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Obtención, caracterización y evaluación de nanopartículas de cobre con posible actividad antimicrobiana en una fórmula cosmética

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Farmacéuticas con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética

AUTOR

Gabriela SEDANO CORZO

ASESORA

Dra. Mirtha ROQUE ALCARRAZ

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sedano G. Obtención, caracterización y evaluación de nanopartículas de cobre con posible actividad antimicrobiana en una fórmula cosmética [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2026.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Gabriela Sedano Corzo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07265628
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0002-8705-7407
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Mirtha Roque Alcarraz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08644654
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9154-5767
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Mario Carhuapoma Yance
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	28297248
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Carlos Alejandro Bell Cortez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06091747
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	José Fidel Jáuregui Maldonado
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06960780

Datos de investigación	
Línea de investigación	No aplica
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.055895 Longitud: -77.023312; Latitud: -12.059663 Longitud: -77.081732
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2024-2026
URL de disciplinas OCDE	Nanomateriales https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.10.01 Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05 Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS CON MENCIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA COSMÉTICA

Siendo las **12:00 hrs. del 21 de setiembre de 2026** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr. Mario Carhuapoma Yance e integrado por los siguientes miembros: Dra. Mirtha Roque Alcarraz (asesora), Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez y el Mg. José Fidel Jáuregui Maldonado; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **Obtención, caracterización y evaluación de nanopartículas de cobre con posible actividad antimicrobiana en una fórmula cosmética,** presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Gabriela Sedano Corzo.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Ciencias Farmacéuticas con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética.** Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

MUY BUENO - 17 (DIECISIETE)

Luego el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Gabriela Sedano Corzo**, el Grado Académico de **Magíster en Ciencias Farmacéuticas con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética.**

Se extiende el acta en Lima, a las 13:15 hrs. del 21 de setiembre de 2026

Dr. Mario Carhuapoma Yance (P. P. T.C.)
Presidente

Dra. Mirtha Roque Alcarraz (P. P. T.C.)
Miembro - Asesora

Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez (P. P. T.C.)
Miembro

Mg. José Fidel Jáuregui Maldonado (P. Asoc. T.C.)
Miembro

Observaciones:

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1
Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email:upg.farmacia@unmsm.edu.pe

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

Anexo 1

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dra. Mirtha Roque Alcarra, en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen N° 00108/FFB-UPG/2023 de la tesis, cuyo título es: **Obtención, caracterización y evaluación de nanopartículas de cobre con posible actividad antimicrobiana en una fórmula cosmética,** presentado por la Q.F. **Gabriela Sedano Corzo,** para optar al Grado Académico de Magíster en Ciencias Farmacéuticas con Mención en Ciencia y Tecnología Cosmética, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el **07** % de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del Grado Académico de Magíster en Ciencias Farmacéuticas con Mención en Ciencia y Tecnología Cosmética.

Lima, 22 de octubre de 2026

Firma de la asesora

UNMSM
Firmado digitalmente por ROQUE ALCARRAZ Mirtha FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 23.10.2026 15:26:26 -05:00

Dra. Mirtha Roque Alcarra----------

DNI: 08644654

* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

Dedicado a mi amado hijo Jorge Gabriel, quién con su fortaleza, me inspira constantemente a superar cada reto, a darle un nuevo significado a cada pequeña actividad de la vida, y a que, con constancia, se puede ser mejor cada día.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida y a los seres que tanto quiero.

A la Dra. Mirtha Roque A. por ser una guía constante en el desarrollo de esta investigación y por ser una inspiración en el trabajo dedicado, profesional y de excelencia.

A los miembros del Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales – CITBM de la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en forma especial al Dr. Justiniano Quispe M., Dr. Carlos V. Landauro S. y la Dra. María Verónica Carranza O., Ing. Geraldine D. Bazán P, por su invaluable dirección y apoyo en el desarrollo de la presente investigación.

A todo el equipo del Departamento de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Al Q.F. Paul I. Gutiérrez E. profesor del Departamento Académico de Farmacotecnia y Administración Farmacéutica, por su apoyo desinteresado en la primera parte del desarrollo de esta tesis.

A mis queridos familiares y amigos por estar siempre conmigo y por su cariño incondicional.

ÍNDICE

Página

RESUMEN ……. iii

ABTRACT ……. .iv

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN ……. 1

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes ……..…… 3

2.1.1. Antecedentes internacionales…… 3

2.1.2. Antecedentes nacionales…… 4

2.2. Aspectos teóricos…… 6

2.2.1. Nanotecnología …… 6

2.2.2. Nanopartículas y seguridad …… 6

2.2.3. Cobre como agente antimicrobiano …… 7

2.2.4. Nanopartículas de cobre (CuNP) …… 8

2.2.5. Citotoxicidad de las nanopartículas de cobre (CuNP) …… 9

2.2.6. Síntesis de nanopartículas …….. 9

2.2.6.1. Métodos físicos …….. 10

2.2.6.2. Métodos biológicos …… 10

2.2.6.3. Métodos químicos …….. 10

2.2.6.4. Métodos híbridos …… 11

2.2.6.5. Síntesis verde …….. 11

2.2.7. Síntesis de nanopartículas de cobre (CuNP) …… 11

2.2.8. Caracterización de nanopartículas …….. 12

2.2.9. Nanopartículas en productos cosméticos …… 12

2.2.10. *Staphylococcus aureus* …….. 13

2.2.11. *Pseudomona aeruginosa* …… 13

CAPITULO III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación ……. 14

3.2. Diseño metodológico ……. 14

3.3. Unidad de análisis ……. 14

3.4. Población de estudio ……. 14

3.5. Muestra o tamaño de muestra …… 14
3.6. Técnicas o instrumentos de recolección de la información o de datos …. 14
CAPITULO IV. RESULTADOS ..…… 20
CAPITULO V. DISCUSIÓN ……. 40
CAPITULO VI. CONCLUSIONES…… 44
CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA ……. 45
CAPITULO VII. ANEXOS …… 49

RESUMEN

La tecnología de los nanomateriales es usada en diferentes áreas, como la medicina y el área de la belleza integral de la piel; sus propósitos son variados e incluyen los tratamientos para controlar el desarrollo de microorganismos que han hecho resistencia bacteriana a los tradicionales antibióticos. Esta investigación de diseño metodológico experimental, tuvo como objetivo sintetizar y caracterizar nanopartículas de cobre mediante método químico, determinar su actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* y determinar su actividad antimicrobiana en una fórmula cosmética. Para la síntesis de las nanopartículas se optó por una modificación a la reacción química convencional, para hacerlas más propicias al uso y aplicación en fórmulas cosméticas. La caracterización demostró nanopartículas de cobre en fase metálica de 451,4 nm de tamaño, poliédricas con caras planas y bordes bien definidos, con -36,06 de potencial Z. En el enfrentamiento bacteriano, la acción de las nanopartículas de cobre sintetizadas, fue positiva para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*; sin embargo, en la prueba antimicrobiana de las fórmulas cosméticas que contenían a las nanopartículas de cobre sintetizadas, no se evidenció los mismos resultados, en las condiciones del presente experimento. Esta investigación servirá como punto de partida para la aplicación de estas tecnologías en productos cosméticos. El objetivo será atender diversas necesidades de la piel en rutinas diarias que requieran controlar el incremento de bacterias oportunistas y sus efectos derivados. Para ello, será necesario ajustar el proceso inicial de síntesis de las nanopartículas de cobre, así como evaluar su comportamiento en otros tipos de fórmulas cosméticas.

Palabras clave: Nanopartículas, cobre, antibacteriano, fórmula cosmética.

ABSTRACT

Nanomaterial technology is used in various fields, such as medicine and comprehensive skin care; Its applications are diverse and include treatments to control the growth of microorganisms that have developed resistance to traditional antibiotics. This research aimed to synthesize and characterize copper nanoparticles using a chemical method, determine their antimicrobial activity against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa, and assess their antimicrobial activity within a cosmetic formulation. For the synthesis of the nanoparticles, a modification to the conventional chemical reaction was adopted to make them more suitable for use and application in cosmetic formulations. Characterization revealed metallic-phase copper nanoparticles measuring 451.4 nm; they were polyhedral in shape, with flat faces and well-defined edges, and exhibited a zeta potential of -36.06. In antibacterial assays, the synthesized copper nanoparticles showed activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*; however, under the conditions of this experiment, the same results were not observed in the antimicrobial testing of the cosmetic formulations containing the synthesized copper nanoparticles. This research will serve as a starting point for the application of these technologies in cosmetic products. The objective is to address various skin needs within daily routines that require controlling the proliferation of opportunistic bacteria and their associated effects. To this end, it will be necessary to adjust the initial synthesis process for the copper nanoparticles and evaluate their behavior in other types of cosmetic formulations.

Kerwoords: Nanoparticles, copper, antibacterial, cosmetic formula.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El cobre ha demostrado tener propiedades antimicrobianas eficaces contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y virus. Estas propiedades se deben a la capacidad del cobre para dañar las membranas celulares e interferir con los procesos metabólicos de los microorganismos. Al incorporar nanopartículas de cobre en una fórmula cosmética, se puede potencialmente reducir la presencia de microorganismos y prevenir infecciones cutáneas.

Sabemos que, en los últimos años, ha habido un aumento preocupante en la resistencia antimicrobiana, lo que significa que muchos microorganismos son cada vez más difíciles de tratar con los antibióticos convencionales. El uso de nanopartículas de cobre en cosméticos puede ser una estrategia alternativa para combatir la proliferación de microorganismos resistentes, ya que el cobre tiene un modo de acción diferente y puede ser eficaz incluso contra cepas resistentes a los antibióticos.

Las infecciones cutáneas, como el acné y las dermatitis, son comunes y pueden tener un impacto significativo en la salud y el bienestar de las personas. Al agregar nanopartículas de cobre con propiedades antimicrobianas a una fórmula cosmética, se pueden obtener beneficios adicionales para la salud de la piel al ayudar a controlar el crecimiento de microorganismos patógenos y prevenir infecciones.

Por otro lado, los cosméticos son propensos a la contaminación microbiana debido a su uso repetido y la exposición al ambiente. La incorporación de nanopartículas de cobre con actividad antimicrobiana puede ayudar a mejorar la conservación del producto al inhibir el crecimiento de microorganismos y prolongar su vida útil.

Por último, es importante recordar que existe una creciente demanda por parte de los consumidores de productos cosméticos que contengan ingredientes naturales y sean seguros para su uso. El cobre es un elemento natural y ampliamente disponible, lo que lo convierte en una opción atractiva como ingrediente en formulaciones cosméticas. Además, las nanopartículas de cobre se pueden diseñar y controlar para minimizar cualquier efecto adverso potencial en la piel.

En resumen, la obtención, caracterización y evaluación de nanopartículas de cobre con actividad antimicrobiana en una fórmula cosmética se justifica por su potencial para

proporcionar propiedades antimicrobianas, abordar la resistencia antimicrobiana, mejorar la salud de la piel, aumentar la conservación del producto y cumplir con la demanda de ingredientes naturales y seguros por parte de los consumidores.

Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de cobre y evaluar su actividad antimicrobiana en una fórmula cosmética.

Objetivos específicos

1. Obtener y caracterizar las nanopartículas de cobre (CuNP).
2. Determinar la actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre (CuNP) frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.
3. Determinar la actividad antimicrobiana en una fórmula cosmética.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Antecedentes internacionales.

Marín D, Romano N, Pinotti A. (2018) (1). Sintetizaron nanopartículas de cobre a partir de polivinil pirrolidona (PVP) y usaron ácido ascórbico como agente antioxidante. Formularon nanocompuestos con soluciones filmógenicas de quitosano y evaluaron su acción contra *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, a través del método de difusión en disco modificado. Para las caracterizaciones de las nanopartículas utilizaron microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de infrarrojo (ATR-FTIR). Como resultado obtuvieron nanopartículas de 310 nm y un efecto bacteriostático inhibitorio contra la cepa estudiada.

Muñoz A. (2014) (2). Sintetizó soluciones coloidales de nanopartículas de cobre por ruta química convencional y otra asistida con microondas, se usaron como agentes precursores de cobre al $CuSO_4$ y $Cu(NO_3)_2$, y como agentes estabilizantes a la goma arábiga y al quitosano. Las soluciones se caracterizaron por espectrofotometría UV-Vis y los nanopolvos por microscopía electrónica de barrido (SEM). Posteriormente se evaluó su eficiencia antimicrobiana frente a bacterias aisladas de la planta de tratamiento del hospital general Tercer Milenio de Aguascalientes. Las bacterias aisladas *S. aureus, E. coli*, *E. faecalis* y *E. agglomerans* fueron sometidas al nanomaterial de cobre, el resultado de este enfrentamiento fue la inhibición del crecimiento de las cepas silvestres de *E. coli*, y para el caso de *S. aureus* se evidenció su acción bacteriostática y no bactericida. Además, se concluyó que la acción antimicrobiana, depende del tamaño, forma y características del nanomaterial.

Febré N, Silva V, Báez A, Palza H, Delgado K, Aburto I, *et al* (2016) (3). Evaluaron el comportamiento antibacteriano de partículas de cobre frente a microorganismos obtenidos de 71 pacientes con úlceras crónicas infectadas. Se testearon y estabilizaron las nanopartículas de cobre metálico, nanopartículas de óxidos de cobre, sales de cobre y un material nano/micrométrico inerte que soporta nanoestructuras en base de cobre. Se caracterizaron a través de difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), y espectrometría de masas (ICP-MS) y se eligió al que manifestó mayor nivel de liberación de cobre durante 48 horas.

Los compuestos de acetato monohidratado (CIM 826.6 µg/mL) y nitrato trihidratado de cobre (CIM 1133.33 µg/mL) son capaces de eliminar bacterias resistentes.

Alam I, Uddin S, Islam S, Bhowmik S. (2021) (4). Evaluaron diversos métodos de síntesis de nanopartículas de cobre, como los tradicionales métodos químicos y físicos y el método biológico; este último presentó mejor costo y menor daño ecológico, sin embargo, su reacción fue demasiado prolongada. Por su parte los métodos físicos fueron ideales para la preservación del medio ambiente, pero fueron costosos. Los más usados fueron los métodos químicos, pero poseen mayor toxicidad para el medio ambiente. Además, se informó que las nanopartículas de cobre mostraron mejor actividad antimicrobiana al aumentar sus concentraciones, siendo más efectivas en casos de bacterias gramnegativas *(E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) que frente a las grampositivas (*Staphylococcus aureus*).

Trepiana D. (2015) (5). Sintetizó suspensiones de nanopartículas de cobre, a partir de reactivos biocompatibles como almidón y ácido ascórbico, y además con el uso de polimetafosfato de sodio como agente lazante de quitosano. Luego se evaluaron sus propiedades frente a *Streptococcus mutans*; las nanopartículas de cobre, las de quitosano y sus combinaciones presentaron actividad antimicrobiana, frente a esta cepa. Además, se trató una superficie dental con nanopartículas híbridas de nanopartículas de cobre y nanopartículas con quitosano y presentó mayor efecto en la inhibición de la formación del biofilm; debido en parte a la mejor adhesión de la nanopartícula a esta superficie y al efecto sinérgico de las propiedades antimicrobianas de ambas partículas. Esta investigación mostró el potencial de los nanomateriales de cobre en aplicaciones odontológicas.

2.1.2. Antecedentes nacionales.

Marquez J, Figueroa A, Shleider C, Carnero C. (2022) (6). Sintetizaron nanopartículas de óxido de cobre mediante método químico asistido con ultrasonido y fueron impregnadas en seco sobre el tejido textil de algodón. Se evaluó la actividad antimicrobiana como funcionalidad del tejido, empleando el método de difusión en medio sólido de Kirby Bauer. Se evidenció los halos de inhibición que midieron en promedio, 1,5 mm para *E. coli* y 2 mm para *S. aureus*, demostrando así actividad antibacteriana del textil funcionalizado.

Guzmán A, Rengifo J, Echevarría J. (2020) (7). Sintetizaron primero acetato de cobre con la técnica Schlenk y lo usaron como precursor para la síntesis de nanopartículas de cobre. Esta nueva síntesis se realizó con el método químico asistido con microondas. Como reductor se usó ácido ascórbico, el cual fue probado en dos diseños experimentales, agregando antes y después del precursor. Se procedió con la caracterización de las nanopartículas de cobre realizando diferentes ensayos. En este estudio se evidenció que, al obtener las nanopartículas de cobre, a menor pH la fase metálica del cobre obtenido fue mayor que el óxido de cobre, es decir que el pH ácido favorece esta síntesis.

Ypanaqué J. (2022) (8). Evaluó el comportamiento antimicrobiano de nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas con el método biológico usando extracto de la hoja de *S. acuta*; los resultados fueron positivos a diferentes concentraciones para Gram negativos (*E. coli* y *Proteus vulgaris*) y Gram positivos (*Staphylococcus aureus*). Luego impregnó textiles médicos recogidos de diversas áreas del Hospital Regional de Tumbes, con nanopartículas de cobre y evaluó su acción antimicrobiana con el método de recuento microbiano, dando resultado positivo a través de la inhibición de crecimiento de cepas patógenas.

Sánchez J, Pillaca M, Landauro C, Ramírez P, Lovera D. Bernaldo J, *et al*. (2016) (9). Sintetizaron nanopartículas de cobre a partir de una fuente natural que fue procesada para cementarla y otra fuente pura de cobre comercial; el método de síntesis fue la molienda mecánica. Se determinó la acción antimicrobiana a través del Sarker con indicador rojo fenol, de las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram positiva) y *Escherichia coli* ATCC 35218 (Gram negativa). La acción microbiana fue positiva para *S. aureus* y no para *E. coli* usando nanopartículas obtenidas de cobre comercial. Las nanopartículas de cobre, sintetizadas de fuente natural, no mostraron efecto, en ninguna de las cepas.

Flórez L. (2017) (10). Evaluó la acción antimicrobiana de nanopartículas de óxido cúprico obtenidas por método químico. Se estudió la acción antimicrobiana de las nanopartículas de cobre solas y de un desinfectante preparado con las nanopartículas en solución tamponada; se realizó el enfrentamiento con *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Salmonella typhimurium* ATCC 25241. Las nanopartículas de cobre mostraron acción

contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*, mientras que la solución desinfectante mostró resistencia para *S. typhimurium* a la misma concentración.

2.2. Aspectos teóricos

2.2.1. Nanotecnología

En 1959, en la conferencia "There´s Plenty of Room at the Bottom" el físico norteamericano Richard Feynman, adelantado a su época, mostró la posibilidad de manipular diversos materiales a escalas antes imposibles de hacerlo, como son la escala molecular y la atómica. En 1974 se usó por primera el término "nanotecnología" cuando el investigador Norio Taniguchi de la Universidad de Tokio, explicó que podía manejarse materiales a escalas nanométricas; desde entonces, esta ciencia multidisciplinaria ha logrado aplicaciones en diferentes áreas aprovechando las propiedades físico químicas de las partículas con esas dimensiones. La nanotecnología entonces, involucra el diseño, caracterización, fabricación de materiales, estructuras, dispositivos, y aplicación de sistemas de escala nanométrica, así como su aplicación en diversas áreas donde se aprovechen sus propiedades. Por otro lado, y con el fin de regular esta creciente área, diversas instituciones internacionales, vienen emitiendo normativas, disposiciones y reglamentaciones, que salvaguarden la salud integral de las personas, así como el cuidado del medio ambiente; por ejemplo, la Agencia del Medio Ambiente (EPA) ha realizado una clasificación de los nanomateriales: naturales, accidentales y fabricados, a fin de que puedan ser usados en diversas industrias, sin dañar el medio ambiente (2,11).

El potencial de la nanotecnología es grande y las áreas donde se emplean cada vez son mayores, por lo tanto, estamos frente a una nanociencia que nos seguirá sorprendiendo sobre todo por sus beneficios (5).

2.2.2. Nanopartículas (NP) y seguridad

Se entiende por nanopartículas (NP) a toda partícula, natural o fabricada, que tenga un diámetro entre 0,1 y 100 nm, que se encuentre en dispersión, en un medio sólido, gaseoso o líquido. Estas dimensiones han permitido su uso en medicina, biología, rapidez en las comunicaciones y hasta en la educación; pero al mismo tiempo ha despertado el interés en los riesgos que podría presentar, su uso indiscriminado; por lo que ya se ha planteado su regulación, a fin de darle un uso responsable y garantice su seguridad (6,11).

La superficie de una nanopartícula es inversamente proporcional a su tamaño y su reactividad química está directamente relacionada a la superficie de la partícula, por ello una disminución en el tamaño logra un aumento de su reactividad química y gracias a ello, los nanomateriales pueden atravesar barreras biológicas, llegar a la sangre, migrar a órganos, tejidos y llegar al citoplasma de la célula, así como al núcleo. Este comportamiento podría crear un posible riesgo para la salud y también un daño al medio ambiente, sobre todo en la industria de la fabricación de estos materiales; área donde los reportes indican que el pulmón es uno de los órganos más afectados (2,12).

Pero estas características (tamaño de los nanomateriales y su reactividad) le permite también ser usada en aplicaciones biomédicas futuras, así como en diversas áreas; pero para evitar riesgos será preciso definir la composición química, el área superficial, la forma y la distribución de tamaños de estas nanopartículas, de tal modo que se garantice seguridad a los consumidores y se conozca a más detalle el impacto al medio ambiente (2,11,12).

2.2.3. Cobre como agente antimicrobiano

En la antigüedad el cobre fue usado por griegos, egipcios, romanos y aztecas para tratar el agua antes de consumirla y por ello era recolectada en recipientes de cobre, estos antecedentes fueron la base para las investigaciones donde se confirmaron estas propiedades. El cobre es llamado también “metal rojo” es un metal noble, blando y dúctil que, junto a la plata y el oro, pertenecen al grupo Ib de la tabla periódica; se encuentra en la naturaleza, libre o asociado como carbonatos, sulfuros o cloruros; no se degrada, no contamina, es reciclable sin perder sus propiedades, puede ser usado puro o en aleación con otros metales. Posee alta conductividad eléctrica y térmica, moldeable en caliente o frío, resistente a la corrosión, facilidad para la aleación metálica y baja reactividad química. En condiciones de humedad, forma pátina, un revestimiento tipo película verdosa que protege al metal (2,11).

El cobre es un metal esencial para todos los seres vivos, sobre todo para los mamíferos. Actúa como cofactor de procesos enzimáticos como la que realizan la enzima superóxido de dismutasa, citocromo c-oxidasa, tirosinasas (en la síntesis de melanina), dopamina-mono oxigenasas, entre otras; pero también ha demostrado tener propiedades bactericidas, sin causar resistencia y por esta razón está siendo objeto de muchos estudios, sobre todo para casos de resistencia bacteriana; esta propiedad le ha servido para

convertirse además, en una alternativa ideal en los procesos de purificación de aguas (2,11).

2.2.4. Nanopartículas de cobre

En la actualidad existe una preferencia por la síntesis y uso de nanopartículas metálicas como el oro, plata, cobre, hierro, titanio y zinc; pero las más usadas son las de cobre y plata debido a la practicidad en su síntesis y a su adaptación a diversas formulaciones y productos antimicrobianos como tejidos, dispositivos biomédicos, materiales quirúrgicos, purificadores de agua, sistemas de liberación de medicamentos, entre otros. Pero entre todas, las nanopartículas de cobre han captado mucho más interés, al ser un recurso más barato y de fácil acceso, comparado a la plata y al oro; por lo que es considerada como una alternativa ideal, al lograr buen desempeño en diversas áreas y con muy buena rentabilidad. Al sintetizar las nanopartículas de cobre, y la tener propiedad bactericida, estas presentan las mismas y mejores propiedades bactericidas ya que su relación redimensionada a la escala nanométrica, entre la superficie y el volumen, incremente esta acción por lo que su preferencia de uso, sigue ganando terreno (11).

En las investigaciones con las nanopartículas de cobre y sus óxidos (CuO y Cu_2O), se han comprobado que, debido al tamaño y forma de sus partículas, poseen capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos, ya que liberan iones que interactúan con la pared celular microbiana. Un estudio reporta que el mecanismo de acción de los iones de cobre es interrumpir procesos bioquímicos y se pueden unir al DNA provocando así desorden en la estructura helicoidal (11,12).

Pero además, este efecto bactericida de las nanopartículas de cobre se debería a una combinación de factores y mecanismos de acción; entre ellos destaca la liberación de iones de cobre Cu^{+2} y Cu^{+1}, los que reaccionan con la pared bacteriana ya que está presente en ella el peptidoglicano, cargado negativamente; así se producen especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y este daña la membrana citoplasmática; se produce la penetración y ruptura de la membrana celular, junto a la quelación de enzimas celulares y el posterior daño del ADN. Otro mecanismo aceptado refiere que el cobre ingresa a la célula por su membrana, y produce especies reactivas de oxígeno, las que dañan a la bacteria y además degradan al ADN, lo que conlleva a la muerte celular. Es importante resaltar que las nanopartículas de cobre poseen

un mayor espectro antimicrobiano ya que poseen la propiedad “antifouling”, es decir evitan la adhesión de los microorganismos sobre una superficie (2,12,13).

Para afianzar su preferencia, podemos indicar además que las nanopartículas de cobre no solo poseen actividad bactericida, sino también han demostrado otras propiedades, como ser excelentes antioxidantes, antinflamatorias, antifúngicas, mejora la cicatrización de heridas, y por su efecto citotóxico, está siendo estudiado en tratamientos para el cáncer; en suma, estamos frente a une nanopartícula que puede ser muy bien aprovechadas en diversas áreas como la medicina y la salud (14).

2.2.5. Citotoxicidad de las nanopartículas de cobre

Las propiedades del cobre se ven favorecidas cuando su tamaño es nanométrico, a esto se suma la forma de la partícula, la composición química, la estructura de la superficie y su solubilidad; haciendo que la relación superficie/volumen de las nanopartículas de cobre, muestren nuevas propiedades fisicoquímicas, pero además logran que la reactividad sea mayor. Para confirmar lo dicho, se realizó un estudio comparativo de partículas de cobre de 17 μm con nanopartículas de cobre de 23,5 nm, donde estás ultimas, si reportaron graves efectos toxicológicos y lesiones graves en bazo, hígado y riñones de ratones experimentales, a diferencia de las partículas micrométricas (11).

Por otro lado, la fisiología celular es un factor que influye en el efecto tóxico de las nanopartículas de cobre, así como el estado de proliferación, las características de las membranas celulares y la actividad de los fagocitos; por ejemplo, se ha evidenciado que las células cancerosas, son más resistentes a la toxicidad de las nanopartículas de cobre, que las células normales, y esto podría deberse a su alterada duplicación celular. Entonces, para los diversos ensayos de citotoxicidad se sugiere escoger células de la ruta de exposición y los órganos a los que se podrían dirigir las nanopartículas de cobre y para ello se debe estar atento a su ingreso, por inhalación, por vía dérmica y en los casos de aplicaciones biomédicas, estos son aplicados por diversas vías parenterales (11).

2.2.6. Síntesis de nanopartículas

Existen diferentes métodos para la obtención de las nanopartículas y su elección se hará de acuerdo a la factibilidad del proceso, de acuerdo al tipo de material a usar y de acuerdo al uso final que se le dará. Así podemos clasificar esta síntesis en los siguientes métodos:

2.2.6.1. Métodos físicos

A estos métodos se les conoce como “top-down” o de “arriba-abajo” y consisten en el uso de una pieza grande del material elegido, para obtener una nanoestructura a través de grabado o molienda, usando técnicas de alta precisión. Entre los más usados tenemos a la radiólisis gama, condensación usando algún gas inerte, la micro emulsión, corte por láser, pirólisis y pirólisis por aerosol y la alta energía de molienda por bolas. Estos dispositivos complejos, ofrecen alta confiabilidad, pero requieren mucha energía y generan desperdicios (2,5,11).

2.2.6.2. Métodos biológicos

Aquel que recurre al uso de diferentes tipos de microorganismos para la síntesis de los nanomateriales; estos métodos innovadores evitan el uso de sustancias tóxicas, y por esa razón están siendo una buena alternativa en diferentes áreas (5,11).

Dentro de este método, ha cobrado un interés particular el uso de hongos para sintetizar nanopartículas metálicas ya que secretan grandes cantidades de enzimas, no requieren agentes químicos reductores ni estabilizantes que podrían derivar en sustancias tóxicas y son más fáciles de manipular en el laboratorio. Las especies más usadas en estos ensayos son el *Penicillum sp* y el *Aspergillus niger* (14).

2.2.6.3. Métodos químicos

Estos métodos son conocidos como “buttom-up” o de abajo a arriba y consisten en la formación de estructuras átomo por átomo o molécula por molécula. Estos métodos son los más usados debido a su practicidad en el proceso de síntesis. En este grupo se encuentra el método de reducción en medio líquido y también los procesos que se realizan en sol-gel (2,5,11).

La reducción química es un método de fácil realización, es rentable y eficiente en sus resultados ya que permite controlar diversas variables durante la síntesis, como la elección de la sal precursora, el agente reductor, el pH, la temperatura y el tiempo. Cada una de estas variables influye en el resultado final, pero sobre todo en el tamaño de la nanopartícula (11).

2.2.6.4. Métodos híbridos

Corresponde a una mezcla de los métodos anteriores; como la síntesis láser, el procesamiento selectivo de tamaño post sintético y la dispersión atómica de metal solvatados (DAMS) (5).

2.2.6.5. Síntesis verde

Muchos de los reactivos que se usan en las síntesis anteriores, principalmente en la síntesis química, pueden derivar en posibles acciones tóxicas al medio ambiente y al organismo humano. En tal sentido, la síntesis verde intenta minimizar la contaminación, el uso de sustancias peligrosas, el desperdicio y hasta el uso indiscriminado de materias primas, usando productos químicos "verdes" o "limpios" que procedan de fuentes naturales, renovables y por la misma razón, que sean amigables con el medio ambiente y la salud. Así, los extractos naturales de diversas plantas, de frutos secos, están siendo empleados con el propósito de sintetizar nanomateriales más seguros y menos propensos a generar toxicidad (2,14).

2.2.7. Síntesis de nanopartículas de cobre

Para esta síntesis, los métodos de reducción química, son los más usados, debido a que esta síntesis facilita el control del tamaño de las partículas, su forma y distribución. En estos casos se realiza la reacción en medio acuoso usando sales precursoras (que contengan cobre), agentes reductores y hasta estabilizadores; muchas de estas sustancias pueden ser tóxicos, por esa razón cada vez existen variaciones a esta síntesis, con el fin de lograr resultados óptimos, con la menor toxicidad posible.

Los principales precursores de cobre usados para esta síntesis son el acetato de cobre [$Cu(CH_3COO)_2$], sulfato de cobre ($CuSO_4$) y cloruro de cobre ($CuCl_2$). Se suelen usar como agentes reductores al borohidruro de sodio ($NaBH_4$), hidracina (N_2H_4) y ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$). Como estabilizantes han tenido acción importante el alcohol de polivinilo (PVP), dodecil sulfato sódico (SDS), ácido ascórbico, chitosan, polietilenglicol y poliacrilato de sodio. Como lo mencionamos anteriormente, estos métodos, tienen diferentes desventajas, y una de ellas es la toxicidad de varios de los reactivos usados, además las nanopartículas de cobre sintetizadas por este método, presentan sensibilidad en medios acuosos, a comparación de otros metales; a esto se le suma el hecho que su exposición al aire puede causar oxidación en la superficie de la partícula, convirtiendo esta síntesis en un desafío (5,11).

Debido a las desventajas mencionadas de los métodos químicos, los métodos biológicos y la síntesis verde, también se están convirtiendo en una alternativa de síntesis de las nanopartículas de cobre, ya que sus componentes provienen de la naturaleza y por la misma razón son más amigables con el medio ambiente y poseen menos toxicidad; sin embargo, tienen una desventaja que es la dificultad de retirar impurezas o residuos, que provienen del precursor, en el producto final obtenido (2,5,11).

2.2.8. Caracterización de Nanopartículas

La información del arreglo espacial, el tipo de átomos de la estructura final, las impurezas, imperfecciones, tamaño promedio, etc., es importante para evaluar la reactividad y acciones de los nanomateriales sintetizados. Para ello existen una gran variedad de técnicas de caracterización como la dispersión dinámica de Luz (DLS), espectrofotometría UV-Visible, microscopía de barrido electrónico (SEM), difracción de Rayos X (DRX), espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), análisis termogravimétrico (TGA), técnicas que brindarán amplia información de las nanopartículas sintetizadas y sus posibles implicancias en los productos donde serán utilizados (2,5,7,14).

2.2.9. Nanopartículas en productos cosméticos

Actualmente el área de la cosmética ha innovado en recursos nanotecnológicos, lo que ha permitido lograr productos que aumenten beneficios, pero además que logren un incremento económico notable a las empresas que han optado por esta tendencia. Así, la nanotecnología ha permitido también el incremento científico y técnico durante el desarrollo de los nuevos "nanocosméticos", donde se han incluidos diferentes tipos de desarrollos, como los nanovectores, las nanoemulsiones, las nanocápsulas y diversos activos con esas dimensiones a fin de mejorar las condiciones de la piel. Sin embargo y como ya lo hemos indicado anteriormente, su tamaño también facilita su toxicidad; por esa razón es necesario el máximo control posible, ya que este tipo de productos al ser aplicados en la piel, podrían favorecer el ingreso de las nanopartículas por esta vía; sea hace entonces necesario, el mayor ajuste de características y factores que facilitan dicha toxicidad (15,16).

Por otro lado, las autoridades nacionales competentes, buscan regulaciones y normativas que aseguren la calidad e inocuidad de los cosméticos. En el Perú la normativa supranacional emitida por la Comunidad Andina de Naciones (CAN) mediante la

Decisión 833 (2018), por primera vez ya se define al nanomaterial como: “Material insoluble o biopersistente, fabricado intencionalmente, que presenta una o más dimensiones externas o una estructura interna del orden de 1 a 100 nm”. Esta normativa sigue los pasos de las normativas internacionales vigentes; y conforme al desarrollo de más nanotecnologías es seguro que crearán nuevas disposiciones a fin de lograr productos cosméticos eficaces pero seguros (16,17).

2.2.10. *Staphylococcus aureus*

Es un coco grampositivo, que se organiza en racimos irregulares, aeróbico o anaeróbico, inmóvil, no formador de esporas, catalasa y coagulasa positivo. Está presente en el medio ambiente, pero también en la piel y las mucosas de los humanos, formando microbiota de los seres humanos. Puede producir enfermedades debido a su capacidad de multiplicarse y propagarse rápidamente en el organismo. Además, posee la capacidad de producir enzimas y toxinas extracelulares. Puede producir forúnculos, sepsis cutánea, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones del tracto gastrointestinal, hasta condiciones mucho mayores como septicemia, endocarditis, osteomielitis y neumonía. En el tracto gastrointestinal puede producir una enterotoxina estafilocócica termoestable, que produce vómitos, diarrea, fiebre, dolor abdominal, perdida de electrolítico y líquidos (18).

2.2.11. *Pseudomona aeruginosa*

Es un bacilo gramnegativo, aeróbico y polarmente flagelado. Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*. Puede producir un pigmento azulado no fluorescente llamado piocianina, o pioverdina, un pigmento verde fluorescente. Puede causar diversas infecciones y enfermedades a personas con factores predisponentes, como zonas dañadas, quemaduras y heridas de cirugías. Si invade al organismo puede causar serias lesiones hasta septicemia y meningitis. Sus cepas son resistentes a diversos antibióticos por lo que tienen mucha predominancia en el área intrahospitalaria (18).

CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL/METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Investigación

Aplicado.

3.2. Diseño metodológico

Experimental.

3.3. Unidad de análisis

Nanopartículas de cobre sintetizadas.

3.4 Población de estudio

Cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* (6538) y *Pseudomona aeruginosa* (9027).

3.5. Muestra o tamaño de muestra

Nanopartículas de cobre sintetizadas.

3.6. Técnicas o instrumentos de recolección de la información o de datos

3.6.1. Síntesis de nanopartículas de cobre

Existen diferentes métodos para la síntesis de nanopartículas de cobre, que van desde los procesos físicos, químicos, síntesis verde, hasta los híbridos (5)(19); para esta investigación se desarrolló una adaptación del método químico (20)(21); y se realizó una reducción química en solución acuosa. Se usó una solución precursora 5 mM de acetato de cobre [$Cu(CH_3COO)_2$] en 110 mL de agua desionizada (pH 7), se agitó a 250 rpm, con magneto, a temperatura ambiente por 10 minutos; se agregó 0,3 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) y se mantuvo la agitación durante 20 minutos adicionales. La reacción terminó cuando se produjo el cambio de coloración. Se tomó pH de esta solución y se almacenó adecuadamente.

3.6.2. Caracterización de las nanopartículas de cobre

Para las caracterizaciones, la solución recién sintetizada, fue dejada en reposo, posteriormente fue decantada y se dejó secar en estufa a 42°, durante 24 horas.

3.6.2.1. Identificación de grupos funcionales

La caracterización por FTIR (Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier) se realizó con el objetivo de identificar los grupos funcionales presentes en la superficie de las nanopartículas y confirmar la formación de las nanopartículas de cobre a partir de los reactivos utilizados. Los espectros se adquirieron en el rango de 4000–400 cm^{-1} empleando un espectrómetro compacto FT-IR Bruker ALPHA II, equipado con accesorio de reflectancia total atenuada (ATR), operado mediante el software OPUS versión 7.5 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemania). Las vibraciones características esperadas en las muestras de nanopartículas de cobre incluyen: O-H alrededor de 3400 cm^{-1}, C=O o C=C en la región de 1650–1600 cm^{-1}, y la interacción Cu-O en la región de 600 a 400 cm^{-1}.

3.6.2.2. Difracción de rayos X (DRX)

La estructura cristalina de la partícula sintetizada se analizó mediante difracción de rayos X (DRX) utilizando un difractómetro Malvern Panalytical Empyrean Serie 3 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK). La muestra en forma de polvo se colocó directamente en el portamuestras y se evaluó bajo las siguientes condiciones operativas: rango de barrido (2θ) de 22.50° a 72.50°, tamaño de paso de 0.04°, velocidad de adquisición de 0.2°/s y fuente de radiación de tubo de cobre (Cu Kα, λ = 1.5406 Å). El difractograma obtenido permitió identificar las fases cristalinas presentes, estimar el grado de cristalinidad y evaluar la posible formación de especies oxidativas del cobre.

3.6.2.3. Análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología y estructura superficial de las partículas sintetizadas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Con la muestra seca se preparó una dispersión de 5 mg en 10 mL de alcohol isopropílico, la cual se sometió a ultrasonido durante 20 minutos; posteriormente, se depositó una gota de la dispersión sobre el portamuestras y se dejó secar en estufa a 40 °C durante 1 hora. La micrografía se obtuvo utilizando un microscopio Prisma E SEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bajo las siguientes condiciones operativas: distancia de trabajo de aproximadamente 10 mm, voltaje acelerador de 20 kV, presión de cámara de 0,10 mbar en modo de bajo vacío, tamaño de punto 5 y aumentos de 40× y 70×. Estas condiciones permitieron evaluar el tamaño del conglomerado, su distribución superficial y las características morfológicas de las partículas obtenidas.

3.6.2.4. Tamaño de partícula

El tamaño promedio de partícula se determinó mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés). Para ello, aproximadamente 1 mg de la muestra seca fue dispersada en 10 mL de agua ultrapura (18,2 MΩ·cm) y sometida a sonicación durante 10 minutos para asegurar una adecuada dispersión. Las mediciones se realizaron a 25 °C empleando un espectrómetro de correlación de fotones NICOMP Z3000 ZLS (Particle Sizing Systems, Port Richey, FL, USA), equipado con tecnología NANO ZLS.

3.6.2.5. Potencial Zeta

La determinación del potencial Zeta se realizó con el objetivo de evaluar la estabilidad coloidal del sistema. Aproximadamente 1 mg de muestra seca, fue dispersada en 10 mL de agua ultrapura (18,2 MΩ·cm) y sonificada durante 10 minutos para asegurar una dispersión homogénea. Las mediciones se realizaron a 25 °C utilizando el mismo espectrómetro de correlación de fotones NICOMP Z3000 ZLS (Particle Sizing Systems, Port Richey, FL, USA), equipado con tecnología NANO ZLS. El potencial Zeta se calculó a partir de la movilidad electroforética mediante el modelo de Smoluchowski, empleando el software integrado del equipo. Los valores obtenidos permiten inferir la magnitud de las fuerzas repulsivas entre partículas y, por tanto, la estabilidad coloidal de las partículas sintetizadas.

3.6.3. Preparación de la fórmula cosmética con las nanopartículas de cobre

Se usó una base cosmética tipo gel ligero, Polybase Serum Bio – Aqia (información técnica en Anexos 1 y 2). En beakers y potes estériles, se prepararon 3 muestras de base gel y se agregaron diferentes porcentajes de solución que contienen las nanopartículas de cobre sintetizadas, previamente sonicadas, para ello se usó el equipo: Baño digital Bransonic® CPX 1800 Branson. Se procedió a realizar la mezcla usando un homogeneizador analógico Daihan, por 10 minutos. Se dejó reposar.

3.6.4. Propiedades del producto cosmético

Con las fórmulas cosméticas que contenían las nanopartículas de cobre sintetizadas, se determinó el pH y la viscosidad utilizando el viscosímetro Brookfiel DV-E.

3.6.5. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana

3.6.5.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC)

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre fue evaluada mediante la técnica descrita en la recomendación del "Clinical Laboratory Standard Institute" (CLSI) para la obtención de la concentración mínima inhibitoria (MIC) con resazurina, en microplacas de 96 pocillos con fondo en "u", y con microdiluciones (22)(23).

Se escogieron dos cepas ATCC, una Gram positiva, *Staphylococcus aureus* (6538) responsable de diferentes infecciones, incluidas las infecciones a la piel; y otra Gram negativa *Pseudomona aeruginosa* (9027) una enterobacteria responsable de infecciones intrahospitalarias.

Dilución de la solución de nanopartículas de cobre

Se prepararon 10 diluciones de la solución de nanopartículas de cobre, previamente sometidas a Baño digital Bransonic® CPX 1800 Branson; la primera dilución fue de 2000 µL y las siguientes, la mitad de la anterior. Se completaron a 2 mL con suero fisiológico 0,9 % (estéril).

Preparación del inóculo

Se trabajó con cepas American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (6538) y *Pseudomona aeruginosa* (9027), recién activadas; para ello de la cepa liofilizada original, se hizo una siembra en caldo Tripticasa Soya (TSB), durante 24 horas, a estufa de 37°C; y a partir de este cultivo se realizó una siembra en placa con agar Tripteína Soya (TSA) por otras 24 horas, en estufa a 37°C. Con este cultivo y para cada cepa, se preparó un inóculo con suero fisiológico 0,9 % estéril, equivalente a 0,5 de la escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/µl), luego se realizó una primera dilución (1:30) y luego una segunda dilución (1:5), a partir de 40 µL; se completó hasta 6000 µL con caldo Mueller Hinton esterilizado. Se agregó el equivalente a 20 mg/mL de resazurina.

Preparación de las diluciones de ciprofloxacino.

Se partió de una concentración estandarizada de 640 µg/mL, para obtener 10 diluciones, a partir de 128 µg/mL, y las siguientes, la mitad de la anterior. Cada una se completó con caldo Mueller Hinton esterilizado.

Control de esterilidad y de crecimiento

Se hizo control al caldo Mueller Hinton esterilizado y a cada una de las cepas solas. A cada muestra se agregó resazurina 20 mg/mL.

Prueba Final

Se trabajó en cabina de bioseguridad tipo A2 Clase II, Telsar - BioII Advance. Con pipeta multicanales se agregó 100 µL de cada dilución de las nanopartículas de cobre sintetizadas a la microplaca de 96 pocillos, en las filas 1-3 y 5-7; la concentración más alta se ubicó en la columna 1, y así sucesivamente. Luego se agregó 100 µl a la fila 4 y 8, de las diluciones de ciprofloxacino; la concentración más alta también se ubicó en la columna 1. A continuación se agregó el inóculo de Pseudomona aeruginosa (p.a.) en las 4 primeras filas y luego el inóculo de Staphylococcus aureus (s.a.) en las filas 5-8. En la primera columna se puso al control de esterilidad (CE) y a la última columna, el control de crecimiento (CC). Se llevó a estufa a 37ºC, por 24 horas.

3.6.5.2. Prueba de difusión en placa agar

Las propiedades antibacterianas de la fórmula cosmética que contienen las nanopartículas de cobre, se evaluaron siguiendo el método de prueba de susceptibilidad de difusión en agar por incorporación de cepa (23).

Se trabajó con las mismas cepas (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (6538) y *Pseudomona aeruginosa* (9027), recién activadas; para ello se hizo una siembra en caldo Tripticasa Soya (TSB), durante 24 horas, a estufa de 37°C; y a partir de este cultivo se realizó una siembra en placa con agar Tripteína Soya (TSA) por otras 24 horas, en estufa a 37°C. De este cultivo y para cada cepa, se preparó un inóculo en suero fisiológico 0,9 % estéril equivalente a 0,5 de la escala McFarland (1,5 x 10^8 ufc/µL). Se agregó este inóculo a agar Plate Count (PCA) esterilizado, tibio y líquido, 1 mL por cada 25 mL de agar; se mezcló bien, se vertió a 4 placas de cultivo, para cada cepa y se esperó aproximadamente 15 minutos hasta que solidifique. Con un sacabocado de metal, de 9 mm y esterilizado, se procedió a hacer 3 pozos en cada placa y se agregó 100 µL de cada fórmula cosmética. Se llevó a estufa a 37°C por 24 horas. Para el control se usó Ciprofloxacino (0,05 mg/mL), base cosmética tipo gel ligero, Polybase Serum Bio – Aqia, y diluyente (agua desionizada).

3.6.5.3. Enfrentamiento microbiano por técnica de microdiluciones

Se trabajó con cepas American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (6538) y *Pseudomona aeruginosa* (9027), recién activadas; para ello de la cepa liofilizada original, se hizo una siembra en caldo Tripticasa Soya (TSB), durante 24 horas, a estufa de 37°C; y a partir de este cultivo se realizó una siembra en placa con agar

Tripteína Soya (TSA) por otras 24 horas, en estufa a 37°C. Con este cultivo y para cada cepa, se preparó un inóculo con suero fisiológico tamponado 0,9 % estéril, equivalente a 0,5 de la escala McFarland (1,5 x 10^8 ufc/µL).

De cada inóculo de cepa se tomó 100 µL y se agregó a 10 mL de la solución con nanopartículas de cobre recién sintetizadas, y de esta mezcla se procedió a realizar 5 diluciones (10^{-1}, 10^{-2},10^{-3},10^{-4} y 10^{-5}). Se sembró por incorporación en agar TSA, 1 mL de cada dilución. Adicionalmente, se sembró una muestra de las mismas diluciones de la cepa, sin el nanomaterial (control). Se llevó a estufa de 37 °C por 24 horas, y se procedió con el conteo.

CAPITULO IV. RESULTADOS

El desarrollo de la presente investigación se realizó en el Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales – CITBM de la Facultad de Ciencias Físicas y en el Departamento de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

4.1. Síntesis de nanopartículas de cobre

La síntesis se realizó por el método de reducción química en solución acuosa, usando como precursor acetato de cobre (II), sólido cristalino de color azul intenso. Según lo reportado, el acetato de cobre cumple un efecto estabilizante durante el proceso de obtención de las nanopartículas de cobre, ya que los iones carboxilatos estabilizan y se adhieren a la superficie de las partículas sintetizadas (7).



Figura 1: Acetato de cobre $Cu(CH_3COO)_2$

La disolución de acetato de cobre presentó una coloración inicial celeste, al agregarle el ácido ascórbico (de color blanquecino amarillento), el medio de reacción cambió progresivamente a amarillo y luego a ocre rojizo (Figura 2); este resultado fue igual al obtenido por Marín D. (1) y Trepiana D. (5).

Según lo reportado, el acetato de cobre se disuelve formando iones de acetato y iones Cu^{+2}, este reacciona con el ácido ascórbico reduciéndose primero a Cu^{+1} formándose nanopartículas de Cu_2O que tiene un color amarillo, posteriormente el ácido ascórbico sigue reduciendo al Cu_2O formando nanopartículas de cobre metálicas, por su parte el ácido ascórbico se oxida formando al ácido desoxiascórbico (7).

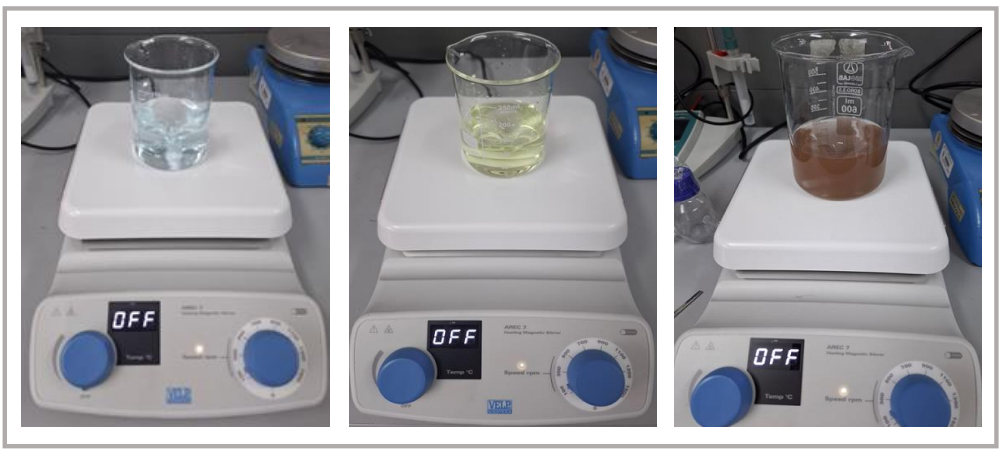


Figura 2: Síntesis química de nanopartículas de cobre en solución acuosa.

Este cambio de color es un primer indicio del avance de la reacción redox, ya que el cambio de color a rojizo, evidenció la reducción de Cu (II) a especies de menor valencia, pero no es suficiente para confirmar la formación de nanopartículas metálicas.

En este proceso, el ácido ascórbico actuó no solo como agente reductor, sino también como estabilizante, al evitar la oxidación prematura de las partículas obtenidas (1,4,5).

Al tomar el pH de la disolución final, el resultado fue 6. Los pH bajos, favorecen la síntesis de la fase metálica de cobre sobre la fase Cu_2O y por ello puede ajustarse la síntesis a pH neutro o menor a él (1,7).

4.2. Caracterización de las partículas obtenidas

La solución obtenida fue sometida primero a reposo, por unas 2 horas, durante ese tiempo se evidenció el precipitado, dejando un líquido sobrenadante transparente. Esto permitió su fácil decantación, eliminando suavemente este líquido sobrenadante. El resto que aun contenía líquido fue puesto en estufa a 42°C durante 24 horas, para así lograr el secado completo del precipitado. Se retiró suavemente con ayuda de una espátula y se procedió a su pesado en balanza analítica dando como resultado un peso de 0,090 g.

4.2.1. Identificación de grupos funcionales

El análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se realizó empleando la muestra en estado sólido previamente secada, con el objetivo de evaluar los grupos funcionales presentes en la superficie de las micropartículas. El espectro obtenido (Figura 3) mostró una banda ancha alrededor de 3400 cm^{-1}, atribuida al estiramiento O–H, asociada tanto a agua adsorbida como a residuos del ácido ascórbico

empleado como reductor. Asimismo, se registró una señal en torno a 1600 cm^{-1}, correspondiente a vibraciones de flexión del agua y posibles contribuciones de grupos carbonilo o dobles enlaces C=C derivados de productos de oxidación del agente reductor. En la región inferior a 1000 cm^{-1} se observaron únicamente señales débiles y poco definidas; si bien los óxidos de cobre presentan vibraciones Cu–O en el intervalo aproximado de 400–650 cm^{-1}, estas bandas suelen ser de baja intensidad y tienden a enmascararse por la presencia de compuestos orgánicos o por variaciones de la línea base, de modo que su ausencia no permite confirmar ni descartar la presencia de especies oxidadas. Este comportamiento coincide con lo reportado en la literatura, donde se enfatiza que el FTIR, por sí solo, no permite identificar de manera concluyente las fases de óxidos de cobre debido a la superposición de señales orgánicas y a la baja respuesta de las vibraciones metálico-oxígeno (24, 25). Por ello, y siguiendo lo ampliamente recomendado en estudios previos, la identificación estructural del material se complementó mediante difracción de rayos X (DRX), técnica indispensable para confirmar la presencia y naturaleza cristalina de las especies derivadas del cobre.

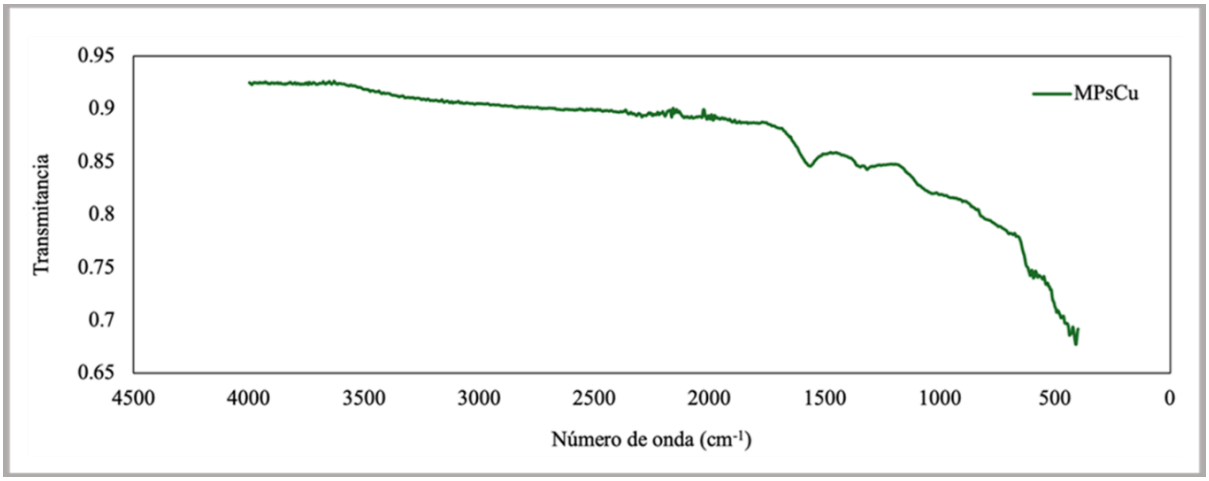


Figura 3. Espectro FTIR de las partículas de cobre obtenidas.

4.2.2. Difracción de rayos X (DRX)

La caracterización estructural mediante difracción de rayos X (DRX) permitió identificar las fases cristalinas presentes en el material sintetizado (Figura 4). El patrón obtenido mostró un pico ancho pero definido centrado aproximadamente en $2\theta \approx 43.3°$, el cual coincide con el plano cristalográfico (111) característico del cobre metálico de estructura cúbica centrada en las caras (Cu^0, fase FCC), según lo reportado en la tarjeta JCPDS 04-0836. La presencia exclusiva de este máximo difractado, sin la aparición de picos secundarios asociados a óxidos de cobre (Cu_2O o CuO), sugiere que bajo las condiciones

de síntesis empleadas predominó la formación de una fase metálica, coherente con la función reductora del ácido ascórbico. Este comportamiento es consistente con estudios previos que reportan la obtención de cobre metálico mediante rutas redox asistidas por compuestos orgánicos, en los cuales la baja intensidad de señales de óxidos se atribuye tanto a su mínima formación como al recubrimiento superficial residual de agentes reductores (26, 27). En conjunto, el análisis DRX respalda que las partículas sintetizadas corresponden principalmente a cobre en fase metálica, lo cual complementa y confirma la información obtenida a partir del FTIR.

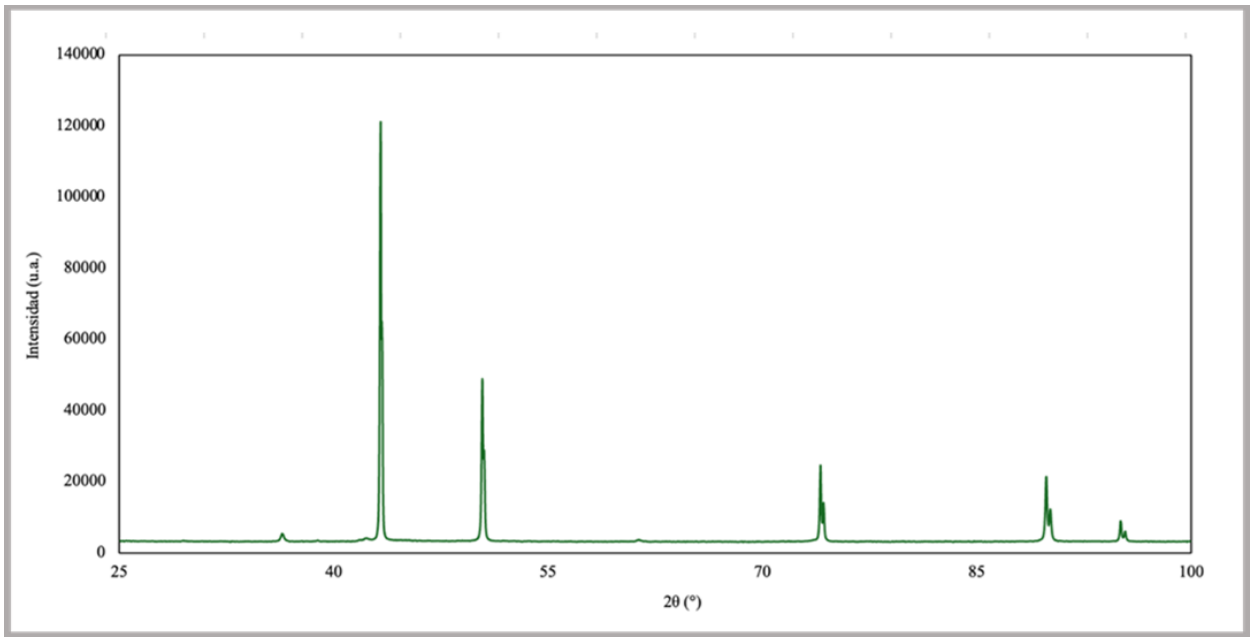


Figura 4. Difractograma DRX de las partículas de cobre sintetizadas.

4.2.3 Análisis morfológico por microscopía de barrido (SEM)

La morfología de las partículas se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), observándose estructuras predominantemente poliédricas con caras planas y bordes bien definidos (Figura 5). A mayores aumentos, las superficies se muestran lisas y compactas, sin evidencias de porosidad significativa, lo que sugiere un mecanismo de crecimiento faceteado durante la cristalización. Asimismo, se identificaron aglomerados formados por partículas de menor tamaño que se adhieren a los cristales principales, lo que puede deberse a interacciones electrostáticas residuales o a procesos de nucleación secundaria que ocurren de manera simultánea al crecimiento de las partículas micrométricas. La coexistencia de cristales bien formados y unidades más pequeñas

indica un crecimiento heterogéneo influenciado por variaciones locales en la disponibilidad del precursor y en la energía superficial del sistema.

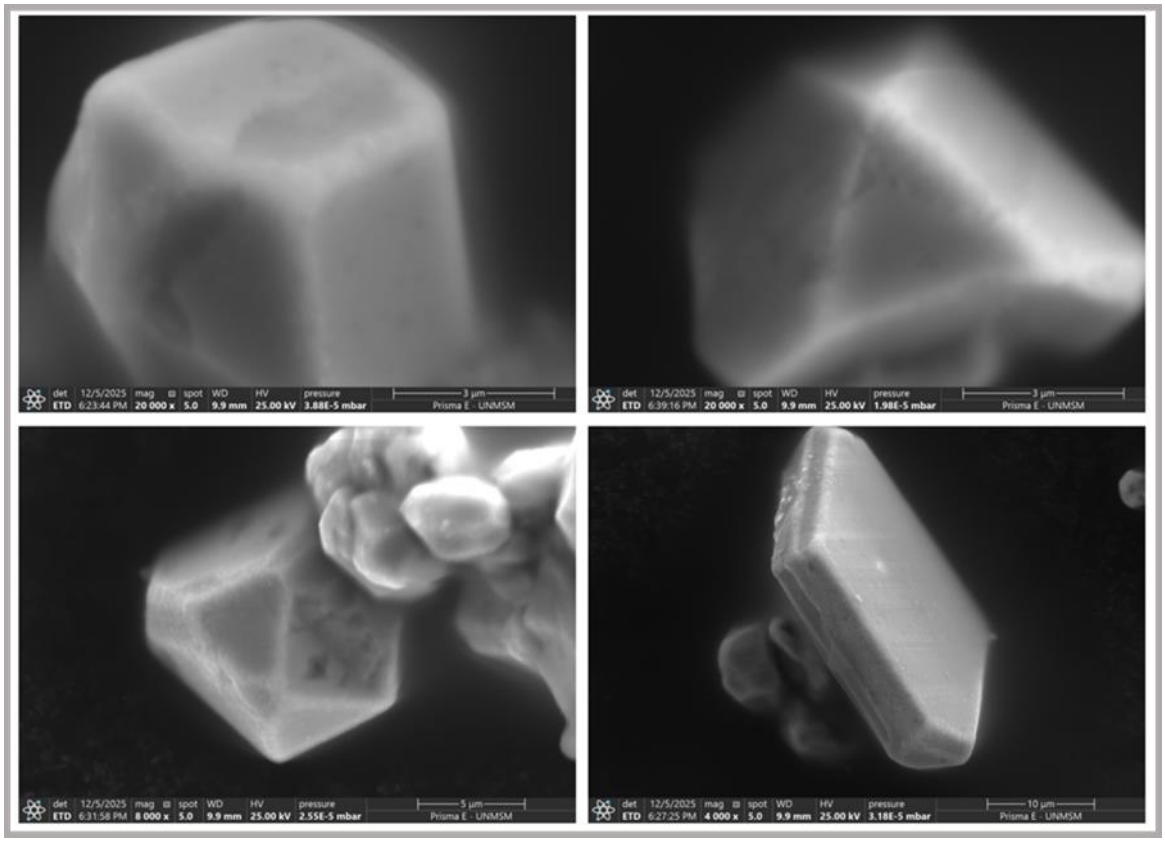


Figura 5: Imágenes SEM de las partículas de cobre sintetizadas.

Alam I, et al (4) reportan que la forma de las nanopartículas sintetizadas, depende de la concentración del agente reductor; así, las formas esféricas (maximizan el área superficial y son más efectivas) se obtienen a concentraciones bajas, mientras que las formas en cubos, pentágonos, tetraedros y formas alargadas se obtienen a concentraciones altas del agente reductor, que para nuestra investigación corresponde al ácido ascórbico.

Además, cuando hay un mayor exceso de ácido ascórbico en la reacción, se favorecerá la velocidad de nucleación (formación de los primeros grupos de átomos estables) sobre la velocidad de crecimiento (adhesión de más átomos a los núcleos ya formados), por lo que obtendrán nanopartículas de cobre de menor tamaño (7).

4.2.4. Tamaño de partícula

El tamaño promedio de partícula obtenido mediante dispersión dinámica de luz (DLS) fue de 451.4 nm (Figura 6). En las investigaciones revisadas, se han reportados la obtención de diferentes tamaños de partículas 5 nm (14), 10 nm (2), 22 nm (12), 100 nm

(7, 10), 201 nm (11), 310 nm (1). En un proceso usando los mismos reactivos que esta investigación, obtuvieron un tamaño de partícula de 530±80 nm (5). Si bien, el rango de los nanomateriales se considera hasta los 100 nm (6,11) y pasado ese valor podría pertenecer al rango de las micropartículas, las investigaciones revisadas, las siguen considerando como nanopartículas ya que esas dimensiones pueden ser beneficiosas para diferentes aplicaciones, como es el caso de la presente investigación.

En formulaciones de uso tópico, este tamaño es considerablemente mayor que el requerido para atravesar la barrera cutánea intacta, cuyos canales intracelulares e intercelulares suelen encontrarse por debajo de 40 nm, mientras que la interacción directa con la bicapa lipídica requiere tamaños incluso menores (<10 nm). Por ello, las nanopartículas de cobre obtenidas presentan una probabilidad muy baja de penetración dérmica, lo que reduce el riesgo de efectos sistémicos y las hace compatibles con aplicaciones cosméticas destinadas a permanecer en la superficie cutánea.

Por otro lado, Alam I, et al (4) indican que en los procesos de síntesis de nanopartículas de cobre el diámetro incrementa a bajas concentraciones de la sal precursora y disminuye a altas concentraciones del agente reductor, como ocurrió en el presente trabajo.

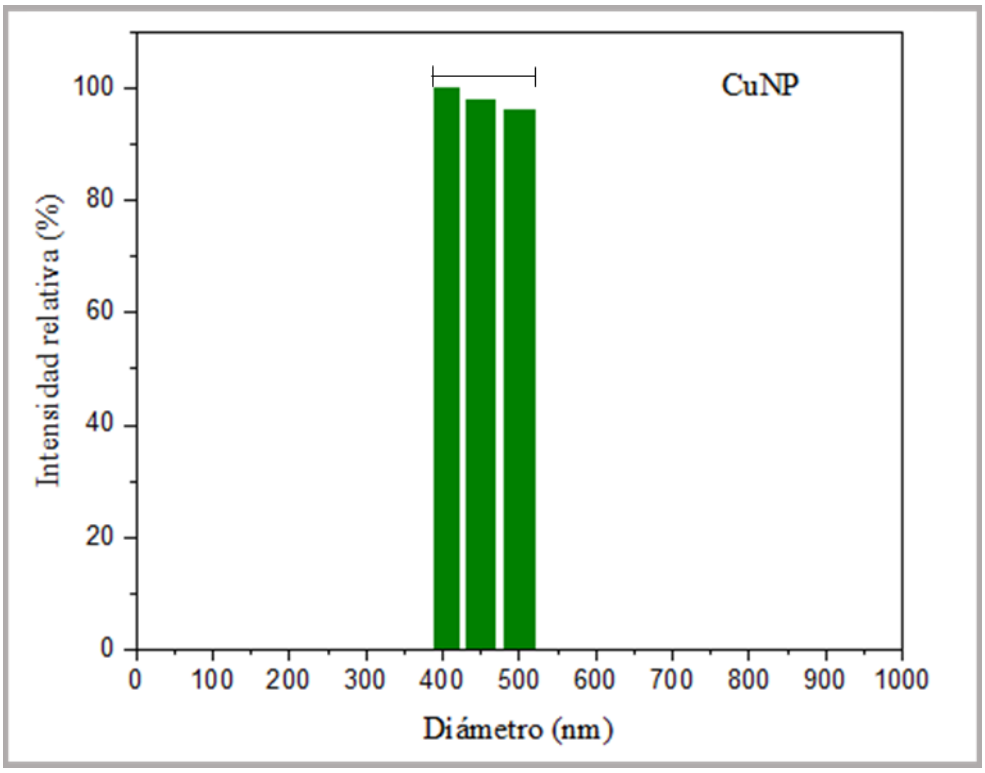


Figura 6. Distribución de tamaño de las partículas de cobre sintetizadas

4.2.5. Potencial Z

La medición del potencial zeta de arrojó un valor de –36.06 mV (Figura 7) lo que indica que las partículas sintetizadas presentan una buena estabilidad coloidal, atribuible a la carga negativa generada por grupos ionizables provenientes del ácido ascórbico adsorbido en la superficie. Según se reporta, los valores absolutos del potencial zeta superiores a ±30 mV se consideran indicativos de suspensiones electrostáticamente estables, ya que reflejan una repulsión suficiente entre partículas con la misma carga superficial (11, 14).

En el entorno cosmético, la estabilidad obtenida en esta investigación, es relevante porque favorece la dispersión homogénea de las partículas dentro del gel base, reduciendo la probabilidad de agregación o sedimentación durante la preparación y el almacenamiento del producto.

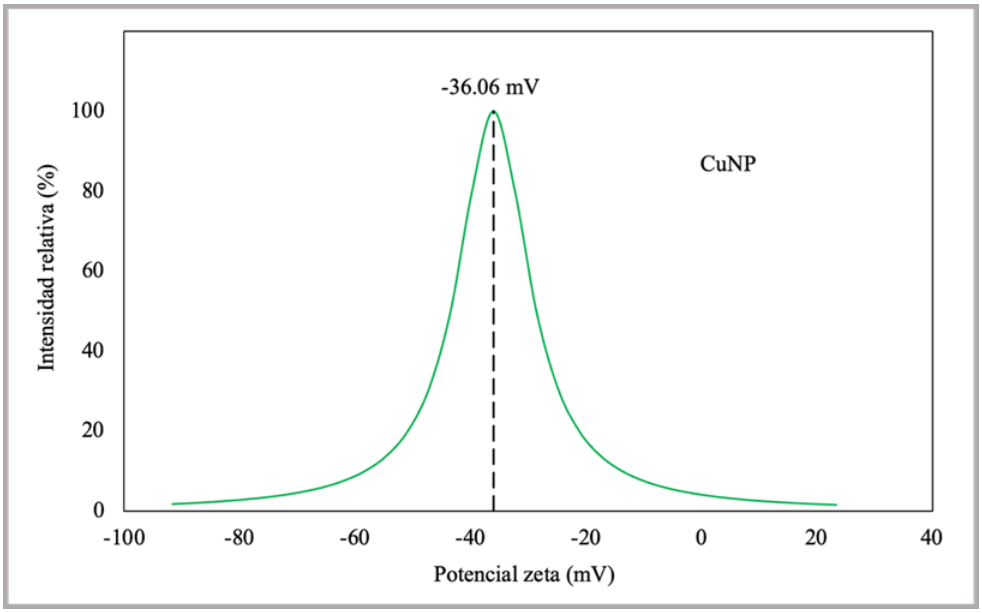


Figura 7. Distribución del potencial zeta de las partículas de cobre sintetizadas.

4.3. Preparación de la fórmula cosmética con las nanopartículas de cobre

Se realizó una nueva síntesis (conforme a lo indicado en el punto 3.6.1) a fin de tener los nanomateriales en la solución acuosa. Se realizó un primer ensayo con 10 g de la base gel ligero, con concentraciones de 5 10 y 15 % de la solución con las nanopartículas de cobre. Se prepararon las muestras (Figura 8) en envases previamente esterilizados. Desde la homogenización, se evidenció una rápida mezcla y sus características finales fueron uniformes (Tabla 1). Previamente a cada mezcla, la solución que contenía a las nanopartículas fue sonicada a fin de tener una solución homogénea y evitar la precipitación de estas nanopartículas.

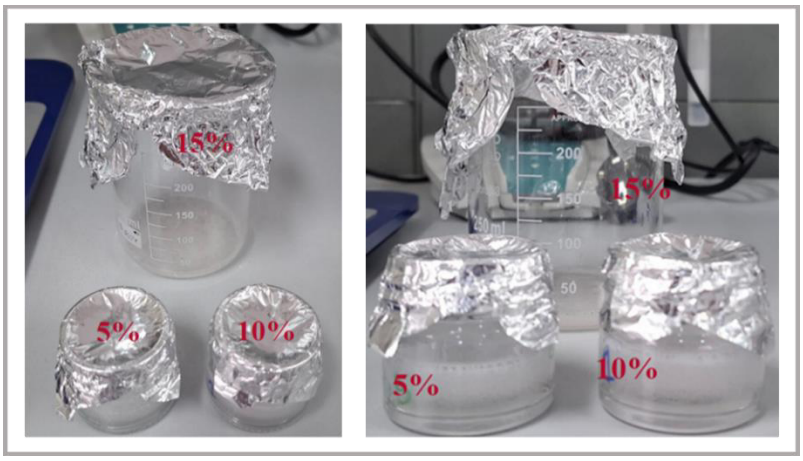


Figura 8. Primer ensayo de la fórmula cosmética con las nanopartículas de cobre sintetizadas.

Tabla 1. Análisis organoléptico de las primeras concentraciones evaluadas.
FC: Fórmula cosmética. CuNP: Nanopartículas de cobre sintetizadas.

	Aspecto	Color	Olor	Textura
FC + 5% CuNP	Homogéneo	Blanco transparente	Sin aroma especial	Suave y ligero
FC + 10% CuNP	Homogéneo	Blanco transparente	Sin aroma especial	Suave y ligero
FC + 15% CuNP	Homogéneo	Blanco transparente	Sin aroma especial	Suave y ligero

Posteriormente se realizó un segundo ensayo con 125 g de base gel ligero, donde se aumentó la concentración de la solución que contenía las nanopartículas de cobre sintetizadas al 20, 25 y 30 %, se homogenizó y también se dejó reposar (Figura 9). Para este caso la homogenización también fue rápida y las características de color fueron más intensas al aumentar la concentración (Tabla 2).



Figura 9. Segundo ensayo de la fórmula cosmética con las nanopartículas de cobre sintetizadas.

La base gel ligero original, tiene un aspecto homogéneo, ligeramente blanquecino, al agregar las primeras concentraciones, el color final varió muy poco, pero en caso de las siguientes concentraciones la coloración final presentó una ligera coloración rosada, para cada concentración un poco más que la anterior. Se optó por la preparación de estas últimas concentraciones, ya que se realizó una primera prueba microbiológica de susceptibilidad por difusión en placa con agar, con las concentraciones 5, 10 y 15 %, y el resultado fue negativo en esas condiciones.

Tabla 2. Análisis organoléptico del segundo ensayo con mayores concentraciones de nanomaterial. FC: Fórmula cosmética. CuNP: Nanopartículas de cobre sintetizadas.

	Aspecto	Color	Olor	Textura
FC + 20% CuNP	Homogéneo	Ligeramente rosado	Sin aroma especial	Suave y ligero
FC + 25% CuNP	Homogéneo	Color rosado visible	Sin aroma especial	Suave y un poco más ligero
FC + 30% CuNP	Homogéneo	Color rosado moderado	Sin aroma especial	Suave y mas ligero

El color original de la fórmula cosmética fue cambiando progresivamente a un color verde transparente. La figura 10, muestra el cambio luego de 15 días de haber sido preparada fórmula cosmética. Como se puede apreciar para cada concentración, la intensidad aumentó conforme fue mayor la concentración de las nanopartículas de cobre usadas.

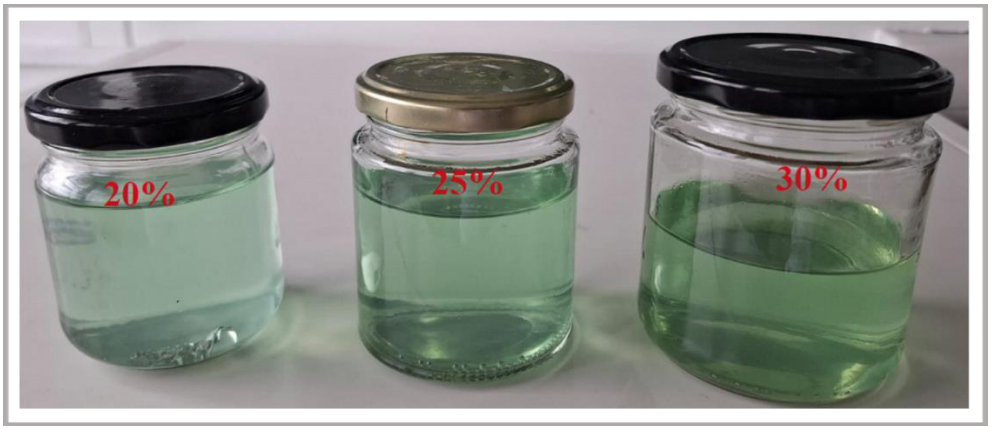


Figura 10. Luego de 15 día del ensayo, se evidenció el cambio de coloración.

Las lecturas de las características organolépticas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis organoléptico después de 15 días.
FC: Fórmula cosmética. CuNP: Nanopartículas de cobre sintetizadas.

	Aspecto	Color	Olor	Textura
FC + 20% CuNP	Homogéneo	Ligeramente verde	Sin aroma especial	Suave y ligero
FC + 25% CuNP	Homogéneo	Color verde intenso	Sin aroma especial	Suave y un poco más ligero
FC + 30% CuNP	Homogéneo	Color verde mas marcado	Sin aroma especial	Suave y mas ligero

4.4. Resultados de las pruebas del producto cosmético.

4.4.1. Viscosidad

Los resultados para la viscosidad se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Viscosidad de las fórmulas cosméticas 1 (20 %), 2 (25 %) y 3 (30 %), con nanopartículas de cobre sintetizadas

Fórmula	Spindle Speed		V (cP)	Torque
1	Spin 05	10 RPM	840	9,2%
		50 RPM	728	9,1%
		100 RPM	588	14,8%
2	Spin 04	10 RPM	940	4,7%
		50 RPM	700	17,4%
		100 RPM	568	28,5%
3	Spin 02	10 RPM	1108	27,8%
		50 RPM	724,2	91,5%
		30 RPM	864	64,9%
		20 RPM	970	48,52%

4.4.2. pH

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. pH de las fórmulas 1 (20 %), 2 (25 %) y 3 (30 %) con nanopartículas de cobre sintetizadas

pH1	4,354	21,8 °C
pH2	4,427	22,5 °C
pH3	4.33	21,8 °C

4.5. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana

4.5.1 Concentración mínima inhibitoria (MIC)

La preparación del inóculo, las diluciones de la solución con las nanopartículas de cobre sintetizadas y las diluciones de ciprofloxacino, se realizaron en un ambiente controlado

(figura 11) bajo las normas microbiológicas correspondientes, para garantizar resultados óptimos y evitar contaminaciones cruzadas.

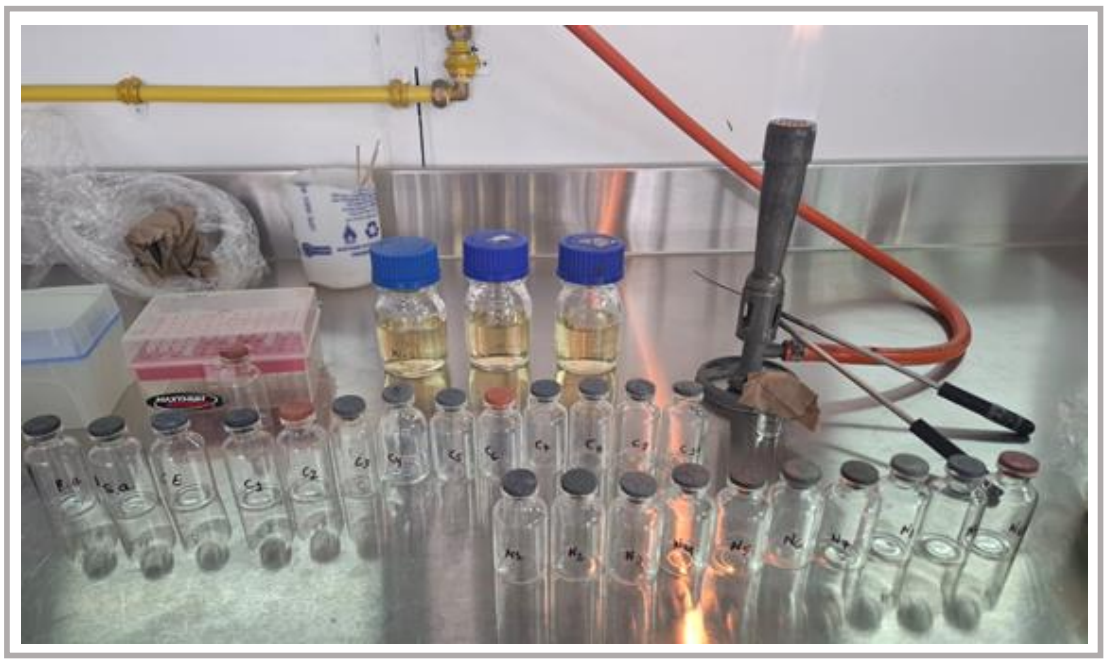


Figura 11: Preparación de inóculo y las diluciones de ciprofloxacino

Durante el ensayo las diluciones de la solución que contiene las nanopartículas de cobre fueron sometidas a sonicación (figura 12), para garantizar la homogeneidad y evitar la precipitación de las nanopartículas de cobre.



Figura 12. Sonicación de las diluciones de la solución que contiene nanopartículas de cobre.

El sembrado en las microplacas fue realizado en cabina de bioseguridad (Figura 13), siguiendo la técnica indicada. Luego del sembrado se dejó a estufa, a 37 °C. A las 24 horas se hizo la lectura (Figura 14). La resazurina utilizada en este ensayo, es un indicador redox (oxidada es color azul), luego de la incubación, si las bacterias se desarrollan o son

viables, producen enzimas oxidorreductasas, que reducen a la resazurina a un compuesto rosa fluorescente (resorufina) y posteriormente a un compuesto incoloro y no fluorescente llamado hidroresorufina (23).

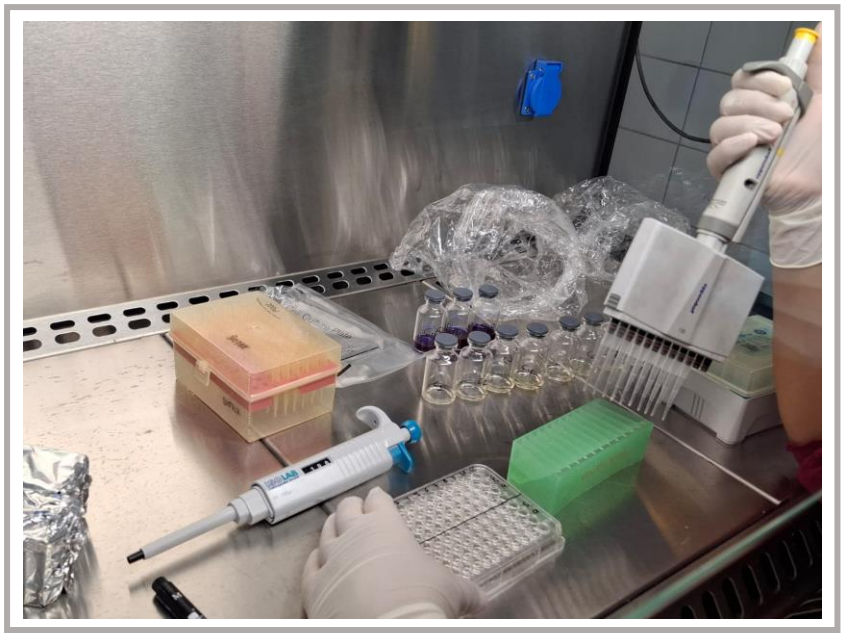


Figura 13. Siembra de las diluciones con nanopartículas de cobre en microplacas.

En la microplaca (Figura 14) vemos que para la cepa bacteriana Gram negativa *Pseudomona aeruginosa* (p.a.), la dilución 1 mostró un ligero cambio de la coloración desde el inicio del ensayo (instantáneo), pero a las 24 horas, el cambio fue mucho mayor y por ello se evidencia que no hay crecimiento bacteriano. Para la dilución 2, se evidencia un cambio menor en la coloración y en la dilución 3 es mucho menor aún. A partir de la dilución 4, el color rojo es más intenso, indicativo de desarrollo bacteriano. Entonces se evidencia que la concentración mínima inhibitoria corresponde a la dilución más alta, 2000 µL; si bien es cierto que en las diluciones 2 y 3 hay cambio de color, esto no asegura una completa acción inhibitoria.

Para la cepa bacteriana Gram positiva *Staphylococcus aureus* (s.a.), la dilución 1 también muestra cambio de color y por lo tanto no hay crecimiento bacteriano. Para la dilución 2 el cambio de color es menor. A partir de la dilución 3, el color rojo es intenso, lo que indica crecimiento bacteriano normal. También en este caso la concentración mínima inhibitoria es la más alta.

El control de esterilidad nos indica que los medios de cultivo están libres de contaminantes y el control de crecimiento indican que las cepas usadas son viables y se han desarrollado.

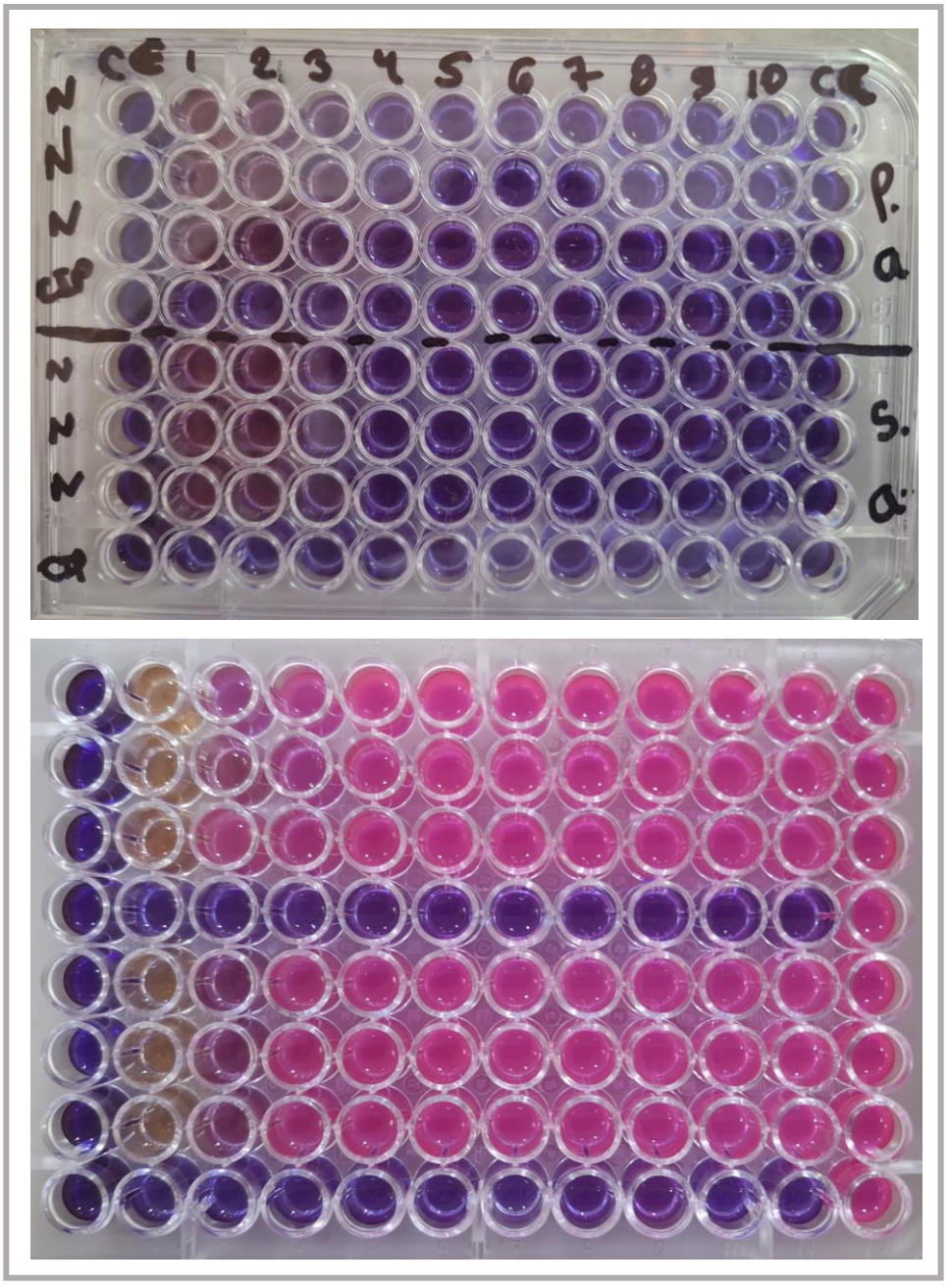


Figura 14. Resultados del ensayo MIC. La dilución 1 manifiesta cambio de coloración para ambas cepas.

Para el caso del ciprofloxacino, se muestra su acción inhibitoria frente a ambas cepas, en todas las diluciones, incluyendo la dilución menor; por lo tanto, para este ensayo la cantidad mínima inhibitoria corresponde a 0,25 µl/mL.

4.5.2. Prueba de susceptibilidad por difusión en agar

Como se comentó anteriormente, se realizó primero este ensayo con la fórmula cosmética a la que se agregó 5, 10 y 15 % de la solución que contenía las nanopartículas de cobre sintetizadas y los resultados, a las 24 horas de incubación, mostraron ausencia de formación de halo de inhibición de crecimiento, para las 3 concentraciones, para ambas cepas. El crecimiento de cada bacteria fue evidente en cada cepa.

Se procedió con la preparación de la fórmula cosmética con mayores porcentajes de nanopartículas de cobre sintetizadas: 20, 25 y 30 %. Se dejó incubar por 24 horas.

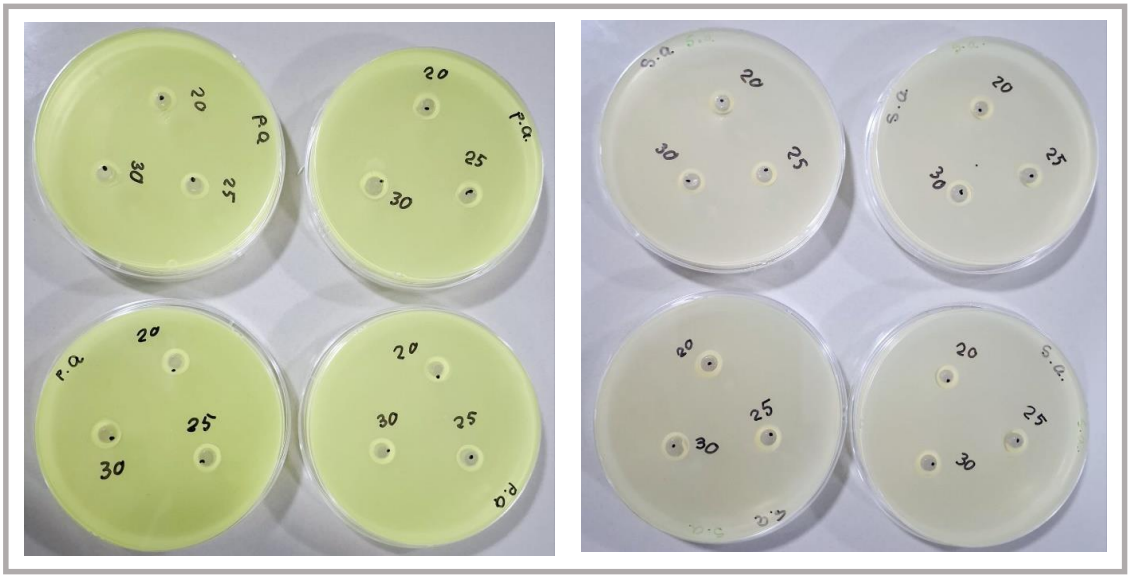


Figura 15. Prueba de difusión en agar de las fórmulas cosméticas que contienen 20, 25 y 30 % de solución con nanopartículas de cobre, frente a *Staphylococcus aureus* (s.a.) y *Pseudomona aeruginosa* (p.a.)..
No se observó halo de inhibición de crecimiento.

Los resultados mostraron ausencia de formación de halo, para las 3 concentraciones de nanopartículas de cobre sintetizadas, para las dos cepas estudiadas, lo que representa que no se evidenció inhibición del crecimiento de estas cepas (Figura 15). Es importante indicar que en las placas se evidencia el crecimiento normal de las cepas; es más para el caso de la *Pseudomona aeruginosa*, el agar Plate Count (PCA) cambió la coloración a verde amarillento, típico de su producción de piocianina.

Para el control, podemos ver que el ciprofloxacino (0,05 mg/mL), presenta halo; para *Staphylococcus aureus* (s.a.) el diámetro fue de 3,1 cm y para *Pseudomona aeruginosa* (p.a.) fue de 3,5 cm, demostrando su poderosa acción antibacteriana. Tanto la base gel

cosmética usada, así como el agua desionizada no presentan actividad antibacteriana (Figura 16), lo que representa que ambas no influyen en ninguno de los resultados.

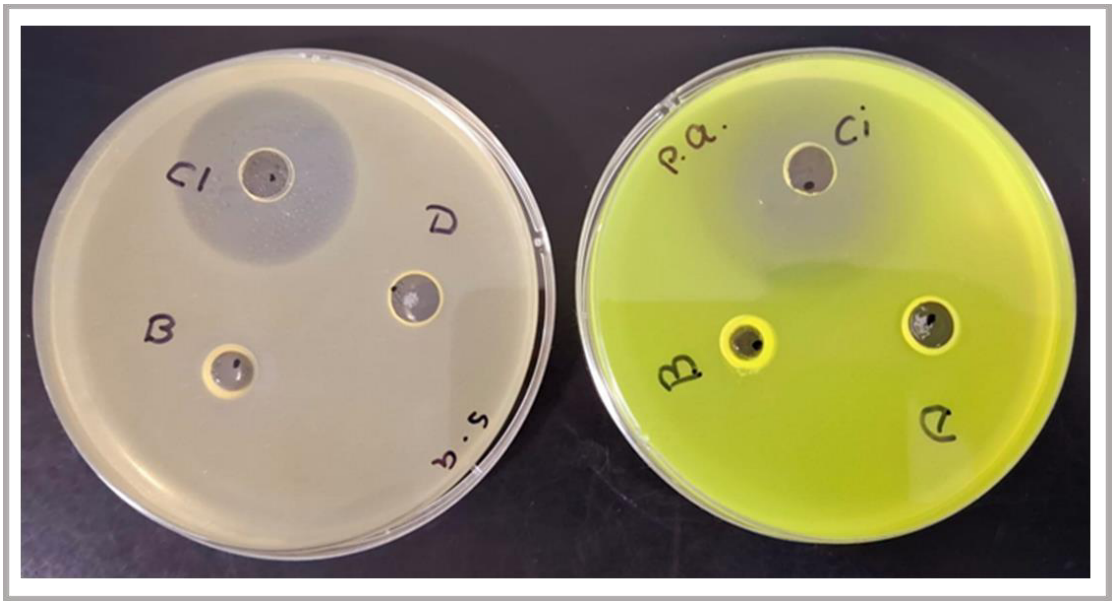


Figura 16. Prueba de difusión en agar. Ciprofloxacino (0.05mg/ml) mostró halo de inhibición de crecimiento para ambas cepas, mientras que la base gel ligero (B) y el agua desionizada (D) no manifestaron desarrollo de halo de inhibición de crecimiento.

4.5.3. Enfrentamiento microbiano por técnica de microdiluciones

Luego de la incubación se hizo la lectura (Figura 17) y el conteo respectivo. Los resultados se muestran a continuación y se resumen en la Tabla N°1.

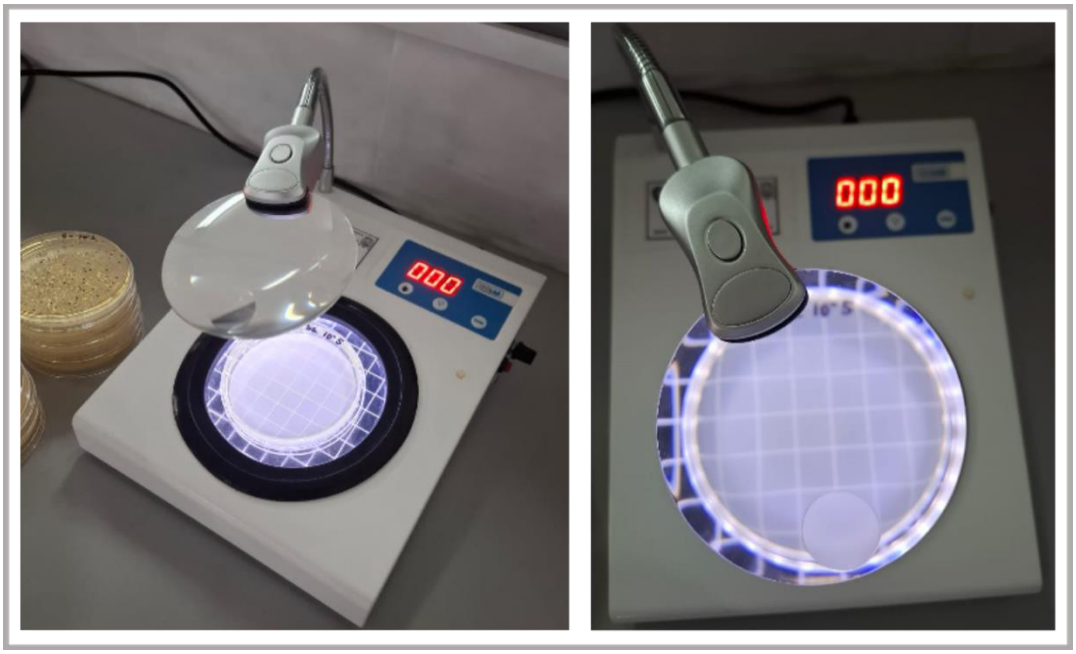
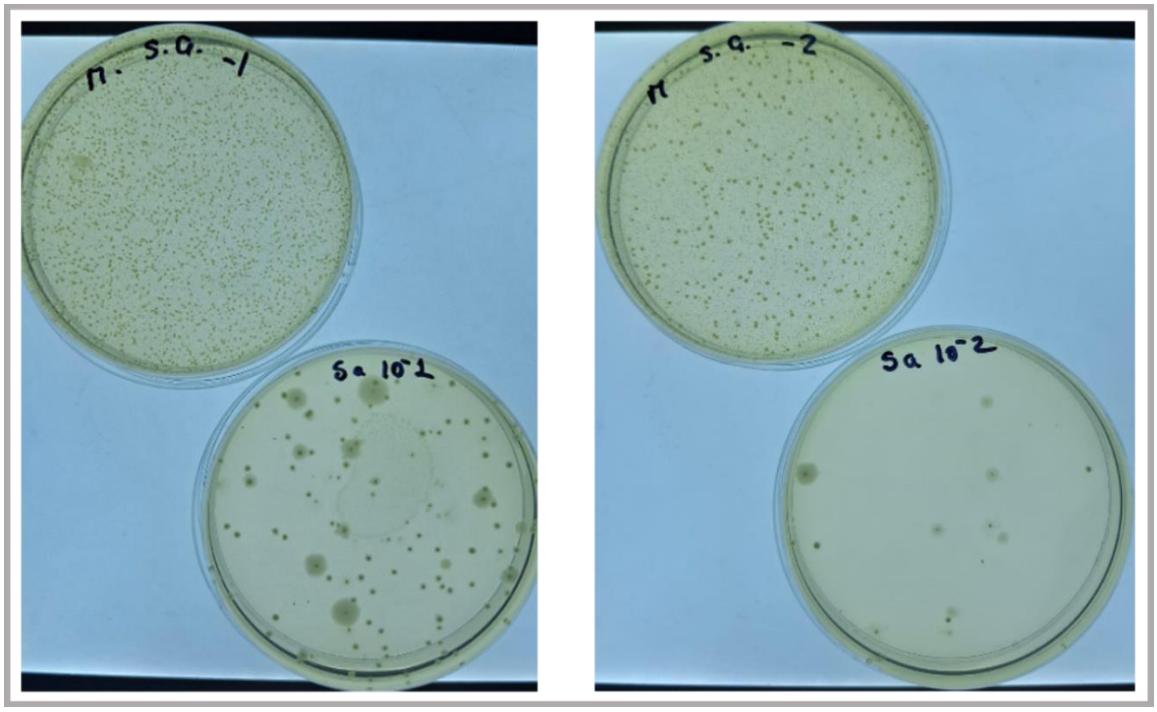


Figura 17. Conteo microbiano.

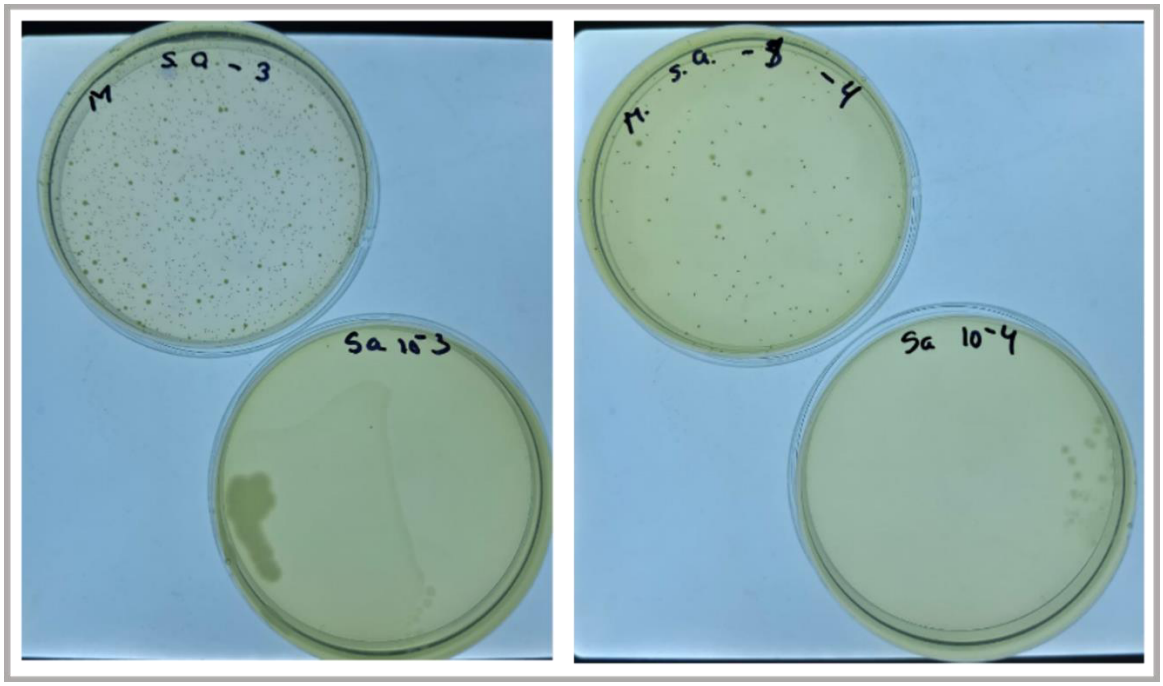
***Staphylococcus aureus* (6538)**



Dilución 10^{-1}
M (sin nanomaterial): Incontables

Sa con CuNP: 123 UFC

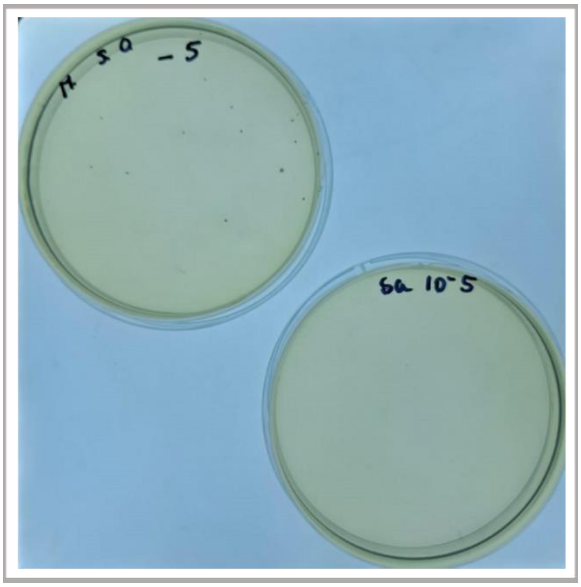
Dilución 10^{-2}
M (sin nanomaterial): 332 ufc + 1700 ufc pequeñitas
Sa con CuNP: 17 UFC



Dilución 10^{-3}
M (sin nanomaterial): 80 UFC+ 880 UFC pequeñas
Sa con CuNP: 6 UFC

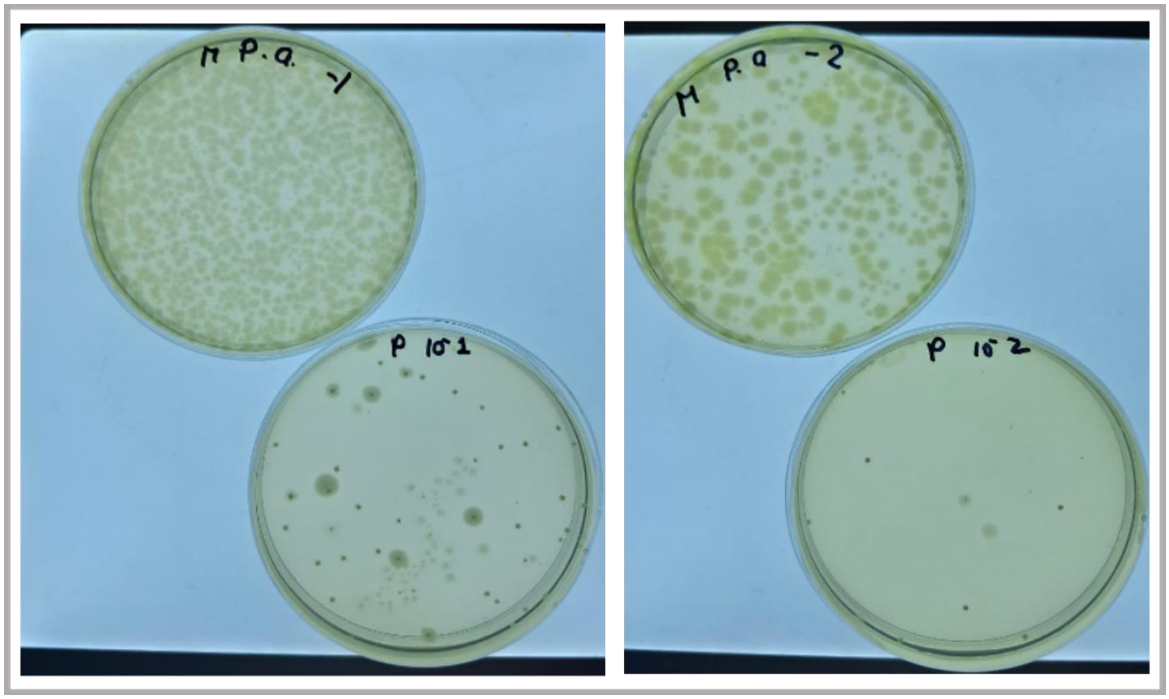
Dilución 10^{-4}
M (sin nanomaterial): 93 UFC

Sa con CuNP 17 UFC



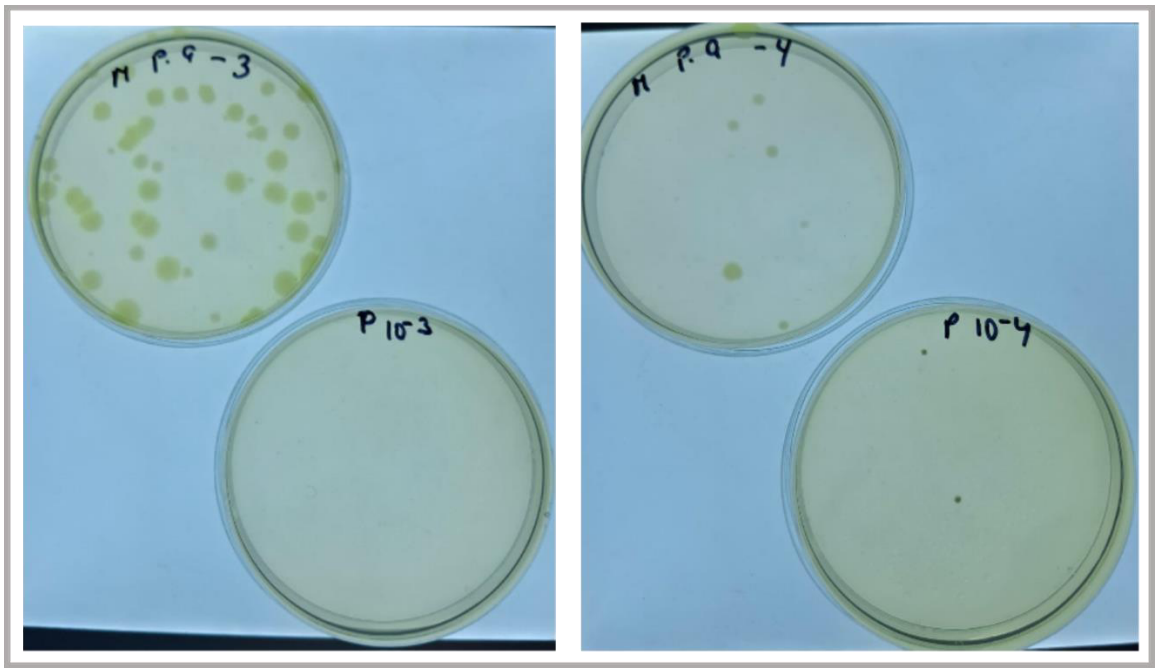
Dilución 10^{-5}
M (sin nanomaterial): 17 UFC
Sa con CuNP: 0 UFC

***Pseudomona aeruginosa* (9027):**



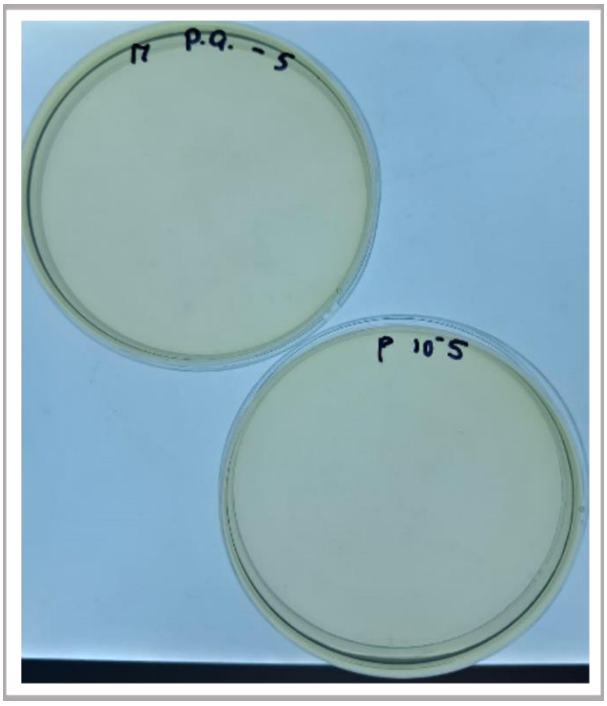
Dilución 10^{-1}
M (sin nanomaterial): Incontable
Pa con CuNP: 95 ufc

Dilución 10^{-2}
M (sin nanomaterial): 348 ufc
Pa con CuNP: 12 ufc



Dilución 10^{-3}
M (sin nanomaterial): 65 ufc + 312 pequeñas
Pa con CuNP: 2 ufc

Dilución 10^{-4}
M (sin nanomaterial): 5 ufc + 90 pequeñas
Pa con CuNP: 2



Dilución 10^{-5}
M (sin nanomaterial): 0 ufc
Pa con CuNP: 0 ufc

Tabla N°6 Cepas *Staphylococcus aureus* (S.a.) y *Pseudomona aeruginosa* (P.a.). M: Cepa sola. CuNP: Nanomateriales de Cobre.

Diluciones / Cepas	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
S.a. (M)	Incontable	332 grandes + 1700 pequeñas UFC	80 grandes + 880 pequeñas UFC	93 UFC	17 UFC
S.a. + CuNp	123 UFC	17 UFC	6 UFC	17 UFC	0 UFC
P.a. (M)	Incontable	348 UFC	65 + 312 pequeñas UFC	5 UFC + 90 pequeñinas UFC	0 UFC
P.a. + CuNP	95 UFC	12 UFC	2 UFC	2 UFC	0 UFC

Estos resultados son expresados en la tabla 7 y 8 como disminuciones logarítmicas para cada caso:

Tabla N°7 Recuento de la Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Recuento *Staphylococcus aureus* ATCC 6538			Recuento *Staphylococcus aureus ATCC 6538 +CuNp*			
Dilución	ufc	Log ufc	ufc	Log ufc	Red log	
1	50000000	7.698970004	1230	3.08990511	4.61	
2	1700000	5.230448921	1700	0.71853897	4.5	
3	800000	7.903089987	17000	0.89779693	7.0	
4	930000	5.968482949	60000	0.77586396	5.2	
5	1700000	5.230448921	0	0.71853897	4.5	5.17

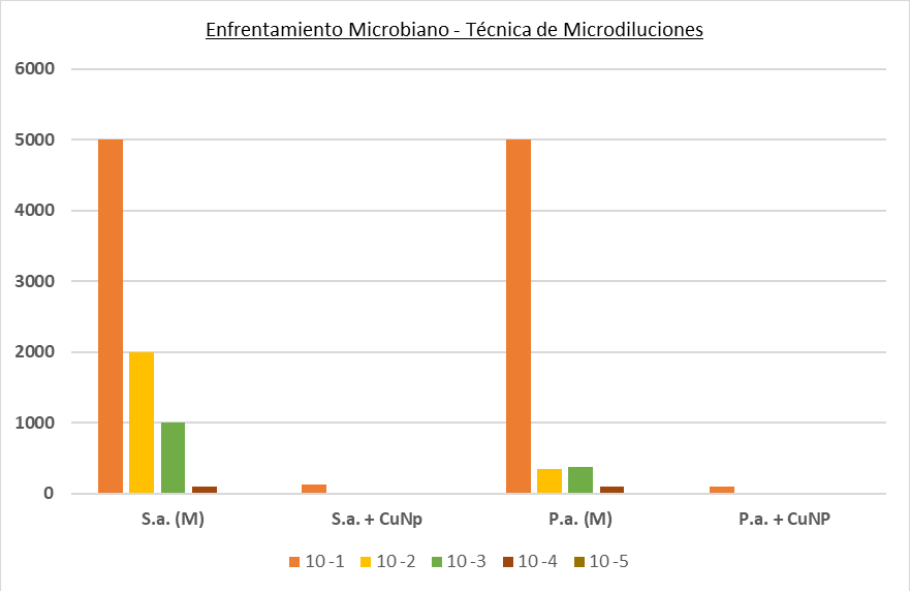
Tabla N°8 Recuento de la Cepa *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027

Recuento *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027			Recuento *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 +CuNp*			
Dilución	ufc	Log ufc	ufc	Log ufc	Red log	
1	60000000	7.77815125	950	2.97772361	4.80	
2	3480000	6.541579244	1200	0.81568261	5.7	
3	312000	4.494154594	2000	0.65264801	3.8	
4	90000	4.954242509	20000	0.69497726	4.3	
5	10	5	10	1	4.0	4.53

Este resultado indica que las nanopartículas de cobre lograron la inhibición del desarrollo de las bacterias enfrentadas. En las preparaciones tópicas, se acepta una reducción logarítmica mayor a 2 y por lo tanto en ambos casos se cumple con el parámetro.

También podemos hacer una comparación entre los resultados de la Tabla 6 y el Cuadro 1, donde se muestran claramente la mayor acción inhibitoria para *P. aeruginosa* a diferencia de *S. aureus*. El cuadro también muestra la inhibición progresiva, conforme aumenta la dilución.

Cuadro N°1: Enfrentamiento microbiano por técnica de microdiluciones.



CAPITULO V. DISCUSIÓN

Para la síntesis de las nanopartículas de cobre (CuNP) se usó como sal precursora al acetato de cobre y como agente reductor se escogió especialmente al ácido ascórbico, ya que, al ser un antioxidante, podría proteger a las nanopartículas recién sintetizadas, del proceso de oxidación inherente al cobre (1,4,20). Además, dentro de las síntesis químicas revisadas, se usó al ácido ascórbico por sus propiedades estabilizante (5,7,11); ambas propiedades fueron consideraras debido a que el nanomaterial sintetizado en este experimento, sería luego usado como componente de una fórmula cosmética y en consecuencia el producto final, podría verse beneficiado.

Respecto al potencial zeta (-36.06mV), la estabilidad observada en este caso puede atribuirse a la presencia de grupos funcionales ionizables del ácido ascórbico adsorbidos sobre la superficie de las nanopartículas, los cuales generan una carga negativa que contribuye a mantenerlas dispersas en solución. Esta característica es especialmente importante en formulaciones cosméticas, ya que favorece la homogeneidad del producto final y disminuye el riesgo de sedimentación o agregación durante el almacenamiento.

En cuanto al tamaño de las partículas sintetizadas en esta investigación, el valor obtenido (451,4 nm), corresponde a nanopartículas grandes, las que podrían considerarse dentro de la escala micrométrica. Sin embargo, este tamaño también podría asociarse a la disminución de la toxicidad asociada a las nanopartículas de menor tamaño.

Esta toxicidad no depende únicamente del tamaño, sino de un conjunto de propiedades fisicoquímicas, tales como el área superficial, la morfología, la composición química, el pH, la solubilidad y la liberación de iones metálicos (28)(19)(34). De todas estas variables, el tamaño es uno de los factores más estudiados, ya que influye directamente en la biodisponibilidad, la interacción celular y la capacidad de penetración en el organismo. Se ha reportado, por ejemplo, que nanopartículas de cobre de 23,5 nm resultan más tóxicas que otras de mayor tamaño (14 μm), debido a su facilidad para atravesar membranas celulares, distribuirse sistémicamente y acumularse en órganos (19).

Es necesario indicar que los procesos toxicológicos producidos por las nanopartículas en el cuerpo humano, están relacionados a la producción de especies reactivas de oxígeno ROS (O_2^- , OH y H_2O_2), las que producen inflamación y estrés oxidativo; esto se traduce en peroxidación lipídica, ruptura de la membrana celular, desnaturalización de las

proteínas, daño en el ADN y en la mitocondria, lo que representa un daño severo en el organismo (19,28,29, 32). Debido a estas posibles consecuencias perjudiciales en el cuerpo humano, los estudios recomiendan reducir esta toxicidad modificando parámetros como el tamaño de las partículas, las características de la superficie y regulando la liberación de iones de cobre (19). Del mismo modo, esta toxicidad ha creado la necesidad de buscar nuevas formas de síntesis que minimicen estos efectos tóxicos y a la vez disminuyan los costos; así la "síntesis verde" está convirtiéndose en una alternativa en auge (22)(34).

Desde el enfoque cosmético, la barrera cutánea es la primera defensa del cuerpo humano y en virtud a esa función también es barrera de ingreso de sustancias nocivas extrañas, incluso a las nanopartículas. Pero si la piel ve alterada su homeostasis, disminuye su manto hidrolipídico o se lesiona, la probabilidad de ingreso podría ser mayor. Por la piel las nanopartículas tienen las mismas vías de ingreso que para otras sustancias: a través de las células, intercelular y a través de los anexos cutáneos (folículo piloso y glándula sudorípara). Los poros tienen un diámetro superficial de 0,4 a 36 nm, por lo tanto, las nanopartículas que tengan un tamaño menor a 36 nm, podrían tener más probabilidad de ingresar; para que ingresen por la bicapa lipídica del estrato corneo el tamaño debería ser de 5 a 7 nm. Por su parte el folículo pilosebáceo mide en promedio de 10 a 210 μm, pero su fisiología favorece la dispersión de los nanomateriales dificultando su ingreso (33)(34).

Por lo antes expuesto, las nanopartículas de mayor tamaño, como las sintetizadas en este experimento, y usadas en la formulación del producto cosmético, tendrían poca probabilidad de ingreso por la barrera cutánea y por lo tanto ofrecerían menor riesgo de toxicidad, inducida por la nanopartícula de cobre.

En relación a la actividad antibacteriana de las nanopartículas de cobre, éstas tienen diferentes mecanismos de acción, siendo el más común el estrés oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS). En las bacterias, las ROS se forman a partir de la respiración aeróbica, y su exceso está controlado por el sistema antioxidante bacteriano; pero ante un ataque adicional de ROS producido por las nanopartículas, la defensa antioxidante se desequilibra y se desencadena el estrés oxidativo; este produce peroxidación lipídica de la membrana celular y altera la estructura de proteínas y al ácido desoxirribonucleico cromosómico (ADN), produciendo un daño severo y muerte de la bacteria. Además, existen reportes que dan cuenta que las nanopartículas de cobre son

eficaces contra patógenos al evitar la formación de biopelículas que las bacterias crean como mecanismo de defensa (4,6,13,19,20).

Los dos tipos de bacterias, Gram negativas y las Gram positivas poseen paredes celulares diferentes, y estas paredes son las responsables de la resistencia bacteriana. Las Gram negativa (*Pseudomona aeruginosa*) están formadas por una membrana celular, cubierta por una delgada pared celular constituida por peptidoglicano; sobre esta estructura se encuentra una capa externa recubierta por lipopolisacáridos, con carga negativa. Las nanopartículas de cobre pueden liberar iones positivos, los que se ven atraídos por la carga de la pared, produciendo acumulación y absorción de estos iones, y en consecuencia daño intracelular. Mientras que las Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) están formadas por una membrana celular, cubierta por una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano y con carga negativa (no posee capa externa). Esta pared actúa como una capa protectora, que minimiza la interacción iónica con las nanopartículas y por ello poseen mayor resistencia a su acción antibacteriana (6,19,20). Esto explicaría los resultados obtenidos en la prueba de concentración mínima inhibitoria (MIC) donde las columnas 2 de la microplaca muestran el color azulado un poco más marcado en *Staphylococcus aureus*, que en *Pseudomona aeruginosa*, demostrando así la resistencia reportada para las Gram positivas. Igualmente, el cambio de color fue casi inmediato al iniciar la prueba MIC para el caso de *Pseudomona aeruginosa* lo que fue diferente para *Staphylococcus aureus*, esto confirmaría su acción bacteriostática más que bactericida, reportada en pruebas similares (1,2,3,8).

Por otro lado, en las 3 fórmulas cosméticas que contienen a la solución con nanopartículas de cobre sintetizadas, en diferentes porcentajes, se evidenció un cambio de color progresivo a verde claro. Esto podría deberse a que, en un medio acuoso, la sensibilidad de estas nanopartículas (5,6,11) es mayor y su exposición al aire, a pesar de los cuidados realizados, pudieron causar oxidación en la superficie de las nanopartículas.

Si bien los resultados para la prueba MIC, y el enfrentamiento microbiano por diluciones de los nanomateriales de cobre sintetizados fueron alentadores, no se obtuvieron los mismos resultados cuando fueron incorporadas a la fórmula cosmética. Este resultado sugiere una posible pérdida de biodisponibilidad del nanomaterial dentro de la matriz cosmética y esto puede deberse a varios factores. Es posible que el tipo de vehículo usado no haya permitido la difusión del nanomaterial en el medio de cultivo, o tal vez se necesitó

de una dispersión previa en otro tipo de vehículo antes de ser agregado a la fórmula final, etc. La estabilidad física y química de las nanopartículas dependerá del medio en que se dispersa y de la estabilidad que le puede proporcionar la fórmula cosmética o vehículo ideal escogido; esto debe sumarse a la finalidad del producto cosmético (33,35).

Luego del análisis de estos resultados, se sugiere ajustar los parámetros del proceso de síntesis para reducir el tamaño de partícula, dentro de los márgenes seguros para aplicaciones tópicas, de modo que se favorezca su interacción con estructuras cutáneas sin comprometer la seguridad del producto final.

Respecto al diseño final del cosmético, se recomienda evaluar la incorporación de un agente dispersante, surfactante polimérico o modificador reológico antes de su inclusión en la formulación cosmética, con el objetivo de mantener su estado coloidal activo, además de tener en cuenta los diversos componentes de la fórmula: dispersantes, agentes quelantes, antioxidantes, acondicionadores, conservantes, colorantes, fragancias, etc. que brinden sensorialidad, que aseguren la estabilidad de la fórmula cosmética y que además no alteren la estabilidad física de la nanopartícula de cobre, para garantizar la eficacia del producto sin riesgo de toxicidad.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES

1. La síntesis mediante reducción química en solución acuosa dio como resultado nanopartículas de cobre. Los ensayos de caracterización indicaron que se obtuvieron nanopartículas de cobre en fase metálica, de 451,4 nm de tamaño, poliédricas con caras planas y bordes bien definidos, con -36,06 de potencial Z.

2. Las pruebas microbiológicas, mostraron que las nanopartículas de cobre sintetizadas presentaron actividad antimicrobiana frente a las dos cepas estudiadas *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, dando como concentración mínima inhibitoria 2000 μL.

3. La actividad antimicrobiana de las nanopartículas en la fórmula cosmética, no evidenció actividad inhibitoria frente a las mismas cepas, en las condiciones del presente experimento.

CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marín D, Romano N, Pinotti A. Matrices de quitosano funcionalizadas con nanopartículas de cobre. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas CLICAP - San Rafael, Mendoza- Argentina. 866-874 (2018).
2. Muñoz A. Síntesis, caracterización y evaluación de la actividad microbiana de nanomateriales de cobre. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias área Toxicología. Universidad Autónoma de Aguas calientes. 2014.
3. Febré N, Silva V, Báez A, Palza H, Delgado K, Aburto I, Silva V. Comportamiento antibacteriano de partículas de cobre frente a microorganismos obtenidos de úlceras crónicas infectadas y su relación con la resistencia a antimicrobianos de uso común. Rev. Med Chile. 2016; 144: 1523-1530.
4. Alam I, Uddin S, Islam S, Bhowmik S. Síntesis de nanopartículas de cobre (CuNP): una revisión de los diversos métodos con actividad fotocatalítica y antibacteriana Orient. J. Chem. 2021;37(5), 1030-1040.
5. Trepiana D. Síntesis de suspensiones de nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluación de sus propiedades antimicrobianas frente a Streptococcus mutans. Trabajo de investigación para optar al título de Cirujano Dentista. Universidad de Chile. 2015.
6. Marquez J, Figueroa A, Shleider C, Carnero C. Impregnación de nanopartículas de CuO en tejidos de algodón con acabado antimicrobiano. Véritas 2022; 23(1).
7. Guzmán A, Rengifo J, Echevarría J. Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre (NPs Cu) por el método poliol asistido vía microondas (MW). Rev Soc Quím 2022;86(4).
8. Ypanaqué J. Efecto antibacterial de nanopartículas de cobre impregnadas en textiles médicos del Hospital José Alfredo Mendoza Olavarría, Tumbes. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Tumbes. 2022.
9. Sánchez J, Pillaca M, Landauro C, Ramírez P, Lovera D. Bernaldo J, et al. Actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano por cobre nanoestructurado obtenido de minerales de la región Marañón: comparación con cobre comercial. Rev. peru. biol. 2016; 23(3): 305 – 310.

10. Flórez L. Estudio de la actividad de las nanopartículas de óxido cúprico suspendido en PBS en cepas bacterianas estándar. Tesis para la obtención de Título de Licenciado en Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2017.

11. Calvillo A. Evaluación de la viabilidad celular y la actividad antimicrobiana de nanopartículas de cobre. Tesis para obtener el grado de Magister en Ciencias Aplicadas. Universidad Autónoma de San Luis de Potosí. 2019.

12. Reyes P. Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre y óxido de cobre y su incorporación en una matriz polimérica y el estudio de sus propiedades antibacterianas. Tesis para obtener el grado de Maestría en Tecnología de Polímeros. Centro de Investigación Aplicada. 2012.

13. Miranda H. Evaluación de la incidencia y severidad de estomatitis subprotésica en pacientes portadores de prótesis dentales antimicrobianas fabricadas con nanopartículas de cobre. Trabado de investigación para optar al título de Cirujano Dentista. Universidad de Chile. 2019.

14. Flores K. Biosíntesis de nanopartículas de cobre: caracterización, evaluación de biocompatibilidad y propiedades antimicrobianas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. México. 2022.

15. Audicana M. Impacto de la nanotecnología en el sector internacional de la cosmética. Tesis de Grado. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 2019.

16. Arteaga E, Foladori I. Nanomateriales en alimentos, cosméticos y agroquímicos en México. Red Latinoamericana de Nanotecnología y Sociedad (ReLANS) - Red Internacional de Eliminación de Contaminantes (IPEN). 2023.

17. Comisión de la Comunidad Andina. Decisión 833: Armonización de Legislaciones en Materia de Productos Cosméticos. Comunidad Andina de Naciones, (2018)

18. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for Drinking-water Quality. 4° Edición, 2011.

19. Michaela C, Mocan T, Mocan L. Copper Nanoparticles: Synthesis and Characterization, Physiology, Toxicity and Antimicrobial Applications. Appl. Sci. 12(141), 1-18 (2022).

20. Pariona N, Hermida L, Mtz A, Sánchez D, Carrión G, López D, *et al*. Síntesis de nanopartículas de cobre para el control de hongos fitopatógenos. Revista ECIPerú, 15(2), 109-116 (2018).

21. Khan A, Rashid A, Younas R, Chong R. A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles. Int Nano Lett. 6, 21–26 (2016).

22. Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols. 3(2), 163-175 (2008).

23. Goswami M, Hati J, Saikia R, Dutta U, Kakati D. Synthesis, antimicrobial and antioxidant bioevaluation of silver nanoparticles using leaf extract of *Sarcochlamys pulcherrima*. Next Nanotechnology. 5, 1-11 (2024).

24. Kumar N, Parui S, Limbu S, Kumar D, Tiwari N, Narayan R. Structural and optical properties of sol–gel derived CuO and Cu2O nanoparticles. Materials Today: Proceedings. (2020).

25. Gawande M, Goswami A, Felpin F, Asefa T, Huang X, Silva R, *et al*. Cu and Cu-Based Nanoparticles: Synthesis and Applications in Catalysis. Chem.Rev.116(6), 3722−3811 (2016).

26. International Centre for Diffraction Data. (2004). JCPDS Card No. 04-0836: Copper (fcc). International Centre for Diffraction Data

27. Rao, C. N. R., Müller, A., & Cheetham, A. K. (Eds.). (2004). The chemistry of nanomaterials: Synthesis, properties and applications (Vols. 1–2). Wiley-VCH.

28. Brito R, Cortez M, Flores M. Aplicaciones tecnológicas de las nanopartículas en la medicina e industria. Epistemus, 33(16), 46-54 (2022).

29. Gupta V, Mohapatra S, Mishra H, Farooq U, Kumar K, Ansari M. *et al.* Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals—A Review of Latest Advancements. Gels, 8(173), 1-31 (2022).

30. Cardoza, C., Nagtode, V., Pratap, A., Mali, S. Emerging applications of nanotechnology in cosmeceutical health science: Latest updates. Health Sciences Review, 4:100051 (2022).

31. Dzyhovskyi V, Romani A, Pula W, Bondi A, Ferrara F, Melloni E, *et al*. Characterization Methods for Nanoparticle–Skin Interactions: An Overview. Life 14:599, (2024).

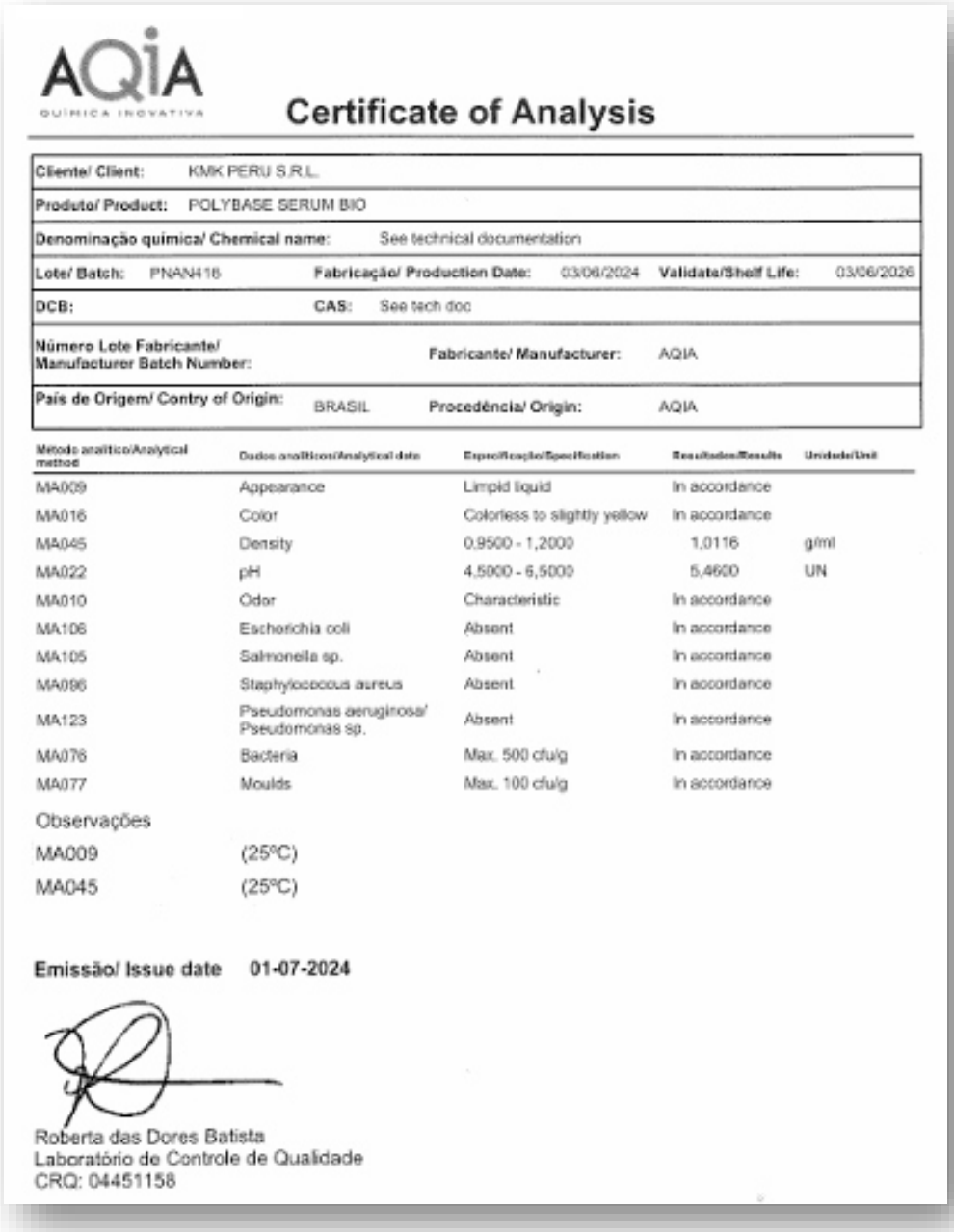
32. Naz S. Gul A, Zia M. Toxicity of copper oxide nanoparticles: a review study. IET Nanobiotechnol. 14 (1), 1-13 (2020).

33. Salvioni L, Morelli, L, Ochoa E, Labra M, Fiandra L, Paluga L, *et al*. The emerging role of nanotechnology in skincare. Advances in Colloid and Interface Science. 293, 1-23 (2021).

34. Sani A, Cao C, Cui D. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. Biochemistry and Biophysics Reports. 26 (2021).

35. Baptista P, McCusker M, Carvalho A, Ferreira D, Mohan N, Martines M, *et al*. Nano-Strategies to fight multidrug resistant bacteria – "A battle of the titans". Frontiers in Microbiology. 9(1441), 1-26 (2018).

CAPITULO VII. ANEXOS 1



AQIA
QUÍMICA INOVATIVA

Certificate of Analysis

Cliente/ Client:	KMK PERU S.R.L.				
Produto/ Product:	POLYBASE SERUM BIO				
Denominação química/ Chemical name:	See technical documentation				
Lote/ Batch:	PNAN416	**Fabricação/ Production Date:**	03/06/2024	**Validate/Shelf Life:**	03/06/2026
DCB:		**CAS:**	See tech doc		
Número Lote Fabricante/ Manufacturer Batch Number:		**Fabricante/ Manufacturer:**	AQIA		
País de Origem/ Contry of Origin:	BRASIL	**Procedência/ Origin:**	AQIA		

Método analítico/Analytical method	Dados analíticos/Analytical data	Especificação/Specification	Resultados/Results	Unidade/Unit
MA009	Appearance	Limpid liquid	In accordance	
MA016	Color	Colorless to slightly yellow	In accordance	
MA045	Density	0,9500 - 1,2000	1,0116	g/ml
MA022	pH	4,5000 - 6,5000	5,4600	UN
MA010	Odor	Characteristic	In accordance	
MA106	Escherichia coli	Absent	In accordance	
MA105	Salmonella sp.	Absent	In accordance	
MA096	Staphylococcus aureus	Absent	In accordance	
MA123	Pseudomonas aeruginosa/ Pseudomonas sp.	Absent	In accordance	
MA078	Bacteria	Max. 500 cfu/g	In accordance	
MA077	Moulds	Max. 100 cfu/g	In accordance	

Observações

MA009 (25°C)

MA045 (25°C)

Emissão/ Issue date **01-07-2024**

Roberta das Dores Batista
Laboratório de Controle de Qualidade
CRQ: 04451158

ANEXOS 2

AQIA
QUÍMICA INOVATIVA

Guarulhos – SP
Monday, June 06th, 2022

Subject: breakdown composition

POLYBASE SERUM BIO

Dear customer,

Under confidential basis, we inform you the breakdown composition of the above mentioned product.

INCI name [EU]	INCI name [US]	Concentration (%)
Methyl Gluceth-20	Methyl Gluceth-20	7.00
Propylene Glycol	Propylene Glycol	5.50
Polyquaternarium -10	Polyquaternarium -10	5.50
Phenoxyethanol	Phenoxyethanol	0.80
Hydroxyethylcelullose	Hydroxyethylcelullose	3.00
EDTA Dissodium	EDTA Dissodium	0.15
Aqua	Water	q.s.p. 100

We are at your disposal for further information.

Best regards.

Caroline Y. Nakamura
Regulatory affairs

AQIA QUÍMICA INOVATIVA LTDA.
Matriz: Rua Rosa Maffei, 563 - Bonsucesso - CEP: 07177-110 - Guarulhos/SP - Tel.: 55 11 2436 3133
Escritório: Rua Comendador Eduardo Sarasá, 215 – Conjunto 411 - CEP: 04601-070 - Campo Belo - São Paulo/SP - Tel.: 55 11 5094 9911
WWW.AQIA.NET