



**Comprobación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de yoduro de cobre
sobre microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media**

Fajardo Cuti, Samantha Mishell

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Ing. Izquierdo Romero, Andrés Ricardo PhD.

25 de agosto del 2023



Plagiarism and AI Content Detection Report

PUIC Antiplagio Fajardo Samantha.d...

Scan details

Scan time:
September 4th, 2023 at 20:55 UTC

Total Pages:
34

Total Words:
8414

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	1%	80
Minor Changes	0%	0
Paraphrased	0.6%	54
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage		Words
AI text	6.3%	528
Human text	93.7%	7886

[Learn more](#)

🔍 Plagiarism Results: (9)

🌐 **Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: ...** **0.7%**

<https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/umed/61-2%2...>

Secciones Resumen Referencias Cómo citar ...

🌐 **eleg - Novedades** **0.3%**

<https://international.eleg.app/articulo/uso-de-oxido-de-zinc-r...>

¿Quienes s...

🌐 **eleg - Novedades** **0.3%**

<https://international.eleg.app/articulo/uso-de-oxido-de-zinc-r...>

¿Quienes s...



ANDRES RICARDO
ISQUIERDO ROMERO



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “Comprobación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de yoduro de cobre sobre microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media” fue realizado por la señorita Fajardo Cuti, **Samantha Mishell** el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 14 de septiembre del 2023



.....
Msc. Izquierdo Romero, Andrés Ricardo Ph.D.

C. I. 1714479506



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Biotecnología
Responsabilidad de Autoría

Yo **Fajardo Cuti, Samantha Mishell**, con cédula de ciudadanía n°1725887911, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Comprobación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de yoduro de cobre sobre microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 14 de septiembre del 2023

Fajardo Cuti, Samantha Mishell

C. I. 1725887911



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Biotecnología
Autorización de Publicación

Yo **Fajardo Cuti, Samantha Mishell**, con cédula de ciudadanía n°1725887911, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Comprobación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de yoduro de cobre sobre microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 14 de septiembre del 2023

Fajardo Cuti, Samantha Mishell

C. I. 1725887911

Dedicatoria

Dedico este trabajo con mucho amor a mis padres Martha y Luis:

A mi cielito Martha, más que mi madre es mi amiga y confidente, con mucho amor ha sabido brindarme las palabras exactas que he necesitado escuchar para levantarme ante cualquier situación. Por recordarme que siempre puedo llegar a donde yo quiera.

Al amor de mi vida, mi padre, quien me enseñó desde escribir mis primeras letras en un cartel pegado en la pared, hasta descubrir mis mayores hobbies y sobre todo que el “no puedo” no existe para mí. Por todo el amor y llenarme de hermosos recuerdos de mi infancia.

A mi hermana Johanna por cuidarme y a pesar de nuestras diferencias, sé que prometimos estar las dos hasta el final.

Agradecimiento

A mis padres Martha y Luis, por todo el esfuerzo y el apoyo tanto académico, económico y moral para poder continuar con mis estudios, por saber inculcarme sabiduría, responsabilidad, honestidad, empatía.

¡Hoy cosechamos los frutos de todo su esfuerzo!

A Quim. Erika Murgueitio PhD, por haberme hecho parte de este proyecto, por su confianza, la entrega, el conocimiento impartido y por todo el apoyo brindado desde mis inicios como su practicante.

A mi tutor Andrés Izquierdo PhD, por abrirme las puertas de su laboratorio para poder desarrollar eficazmente el trabajo bajo sus correcciones y conocimientos.

Al centro de nanociencia y nanotecnología CENCINAT por permitirme ser parte de este espacio para el desarrollo de mi proyecto, al igual que a las técnicas de laboratorio quien con su experiencia formaron parte de mi aprendizaje.

A todos mis amigos que conocí a lo largo de mi carrera, a los que se fueron y a los que se quedaron hasta el final, gracias por soportar mi carácter, apoyarme en los momentos en que ya no avanzaba y por todo el cariño que me brindaron.

Índice de contenido

Informe antiplagio.....	2
Certificación docente	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento.....	7
Índice de contenido	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras	12
Resumen	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción	16
Planteamiento del problema.....	16
Justificación del problema	16
Objetivos de la investigación	18
<i>Objetivo General</i>	18
<i>Objetivos específicos</i>	18
Hipótesis	18
Capítulo II: Marco Teórico	19
Síntesis de nanopartículas	19
<i>Química verde</i>	20
<i>Agentes reductores y estabilizadores</i>	20
<i>Nanopartículas con actividad antimicrobiana</i>	21
<i>Nanopartículas de cobre</i>	23

<i>Nanopartículas de yoduro de cobre</i>	23
Caracterización de nanopartículas.....	24
Materiales de construcción	25
<i>Biodeterioro en materiales de construcción</i>	26
<i>Microorganismos presentes en el hormigón</i>	27
Aislamiento e identificación de microorganismos.....	27
<i>Identificación microscópica</i>	28
<i>Aditivos antifúngicos para el control del biodeterioro</i>	29
<i>Evaluación de la actividad antimicrobiana</i>	29
Capítulo III: Metodología.....	31
Preparación del extracto de taxo.....	31
Síntesis de nanopartículas de yoduro de cobre	31
<i>Caracterización equipo UV-Vis y DLS</i>	32
<i>Caracterización equipo DRX, SEM y TEM</i>	32
Sitios de muestreo de microorganismos.....	34
Aislamiento e identificación de microorganismos	35
<i>Identificación macroscópica y microscópica</i>	35
<i>Extracción y Secuenciación de ADN</i>	36
<i>Identificación molecular de las colonias más predominantes</i>	38
Aplicación de nanopartículas.....	39
<i>Evaluación de la actividad antimicrobiana</i>	39
<i>Halos de inhibición</i>	43
Análisis estadístico	43
Capítulo IV: Resultados	45
Síntesis de nanopartículas de yoduro de cobre	45
<i>Caracterización UV-VIS</i>	45

<i>Caracterización DRX, TEM y SEM</i>	46
Aislamiento e identificación de microorganismos	50
<i>Identificación macroscópica y microscópica</i>	50
<i>Identificación molecular</i>	52
Aplicación de nanopartículas.....	57
<i>Evaluación de la actividad antimicrobiana</i>	57
Cinetica de los halos de inhibicion	61
<i>Bacteria 1B: Ralstonia pickettii</i>	61
<i>Hongo 4H</i>	64
<i>Hongo 5H</i>	67
Hongo 13H	69
<i>Hongo 18H</i>	72
Capítulo V: Discusión.....	75
Capítulo VI: Conclusiones	77
Capítulo VII: Recomendaciones.....	79
Capitulo VIII: Bibliografía.....	80
Apéndices	94

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Resumen de técnicas químicas y físicas de caracterización de nanopartículas.....</i>	24
Tabla 2 <i>Primeros 10 microorganismos con mayor similitud para la bacteria 1B: Ralstonia picketti.....</i>	53
Tabla 3 <i>Primeros 10 microorganismos con mayor similitud para 2B: Pseudomonas azotoformans</i>	55
Tabla 4 <i>Medias y desviación estándar de los halos de inhibición medidos a bacteria Ralstonia pickettii</i>	62
Tabla 5 <i>Medias y desviación estándar de los halos de inhibición medidos del hongo 4H.....</i>	65
Tabla 6 <i>Medias y desviación estándar de los halos de inhibición medidos a la hongo 5H.....</i>	67
Tabla 7 <i>Medias y desviaciones estándar de los halos de inhibición medidos del hongo 13H... </i>	70
Tabla 8 <i>Medias y desviación estándar de los halos de inhibición medidos del hongo 18H.....</i>	72

Índice de figuras

Figura 1 Principales métodos de síntesis de nanopartículas	19
Figura 2 <i>Mecanismos de acción de las nanopartículas metálicas en la célula bacteriana</i>	22
Figura 3 <i>Representación esquemática de la síntesis de NPs de Cul</i>	32
Figura 4 <i>Equipos de caracterización de nanopartículas</i>	33
Figura 5 <i>Sitio de muestreo</i>	35
Figura 6 <i>Método CTAB para extracción de ADN</i>	37
Figura 7 <i>Nanopartículas de yoduro de cobre a tres diferentes concentraciones</i>	39
Figura 8 <i>Protocolo actividad antimicrobiana usado en bacterias</i>	40
Figura 9 <i>Protocolo actividad antimicrobiana usado en hongos</i>	41
Figura 10 <i>Modelo de pozos realizados con una pipeta estéril</i>	42
Figura 11 <i>Diferentes concentraciones de NPs aplicadas para bacterias y hongos</i>	43
Figura 12 <i>Diseño multifactorial para la comprobación de la actividad antimicrobiana in vitro contra la bacteria 1B</i>	44
Figura 13 <i>Nanopartículas de yoduro de cobre</i>	45
Figura 14 <i>Espectro UV-Vis y de las NPs de Cul sintetizadas con extracto de taxo</i>	46
Figura 15 <i>Patrón XDR de NPs de Cul sintetizadas con extracto de taxo</i>	47
Figura 16 <i>Imágenes TEM de las nanoestructuras de Cul</i>	48
Figura 17 <i>Imágenes SEM de las nanoestructuras de Cul</i>	49
Figura 18 <i>Espectro SEM/EDS y mapeo elemental de nanopartículas de Cul</i>	49
Figura 19 <i>Identificación macroscópica de microorganismos aislados</i>	51
Figura 20 <i>Aislamiento y purificación de la colonia predominante (13H)</i>	52
Figura 21 <i>Árbol filogenético para la Bacteria 1B: Ralstonia picketti</i>	55
Figura 22 <i>Árbol filogenético para la Bacteria 2B: Pseudomonas azotoformans</i>	57
Figura 23 <i>Halos de inhibición en la bacteria Ralstonia pickettii</i>	58
Figura 24 <i>Halos de inhibición frente a la bacteria Pseudomonas azotoformans</i>	58

Figura 25 Halos de inhibición en hongos	60
Figura 26 Halos de inhibición frente al hongo 28H	61
Figura 27 Diámetro de los halos de inhibición de la bacteria <i>Ralstonia pickettii</i> a partir de caldo nutritivo.....	63
Figura 28 Diámetro de los halos de inhibición de la bacteria <i>Ralstonia pickettii</i> a partir de solución bacteriana.....	64
Figura 29 Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 4H a partir de caldo PDB.....	66
Figura 30 Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 4H a partir de solución de espora.....	66
Figura 31 Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 5H a partir de caldo PDB.....	68
Figura 32 Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 5H a partir de solución de espora.....	69
Figura 33 Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 13H a partir de caldo PDB.....	71
Figura 34 Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 13H a partir de solución de espora.....	71
Figura 35 Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 18H a partir de caldo PDB.....	73
Figura 36 Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 18H a partir de solución de esporas.....	74

Resumen

El bioteterioro en materiales de construcción se ve afectado por la colonización de microorganismos debido a qué factores como el pH, la temperatura y sobre todo la humedad contribuyen a su supervivencia. La nanotecnología aplicada en materiales de construcción para el mejoramiento de las tecnologías en cuanto a edificación aún se encuentra en desarrollo. Por lo que, el objetivo del presente estudio es la comprobación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de yoduro de cobre sobre microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media, mediante síntesis verde utilizando extracto de taxo como agente reductor y estabilizador. El análisis de difracción de rayos X permitió conocer la naturaleza cristalina con estructura cúbica de las nanopartículas, la composición elemental a través de microscopía electrónica de barrido y las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión revelaron la pureza de la muestra y la morfología esférica además de un tamaño promedio de 35 nm. La selección e identificación de los microorganismos más predominantes aislados previamente del hormigón, se realizó mediante la técnica de hisopado y posteriormente se utilizó técnicas dependientes e independientes de cultivo para su identificación. Finalmente, la actividad antimicrobiana de las nanopartículas se realizó mediante el método de difusión en pozo, la cual es una técnica cualitativa, presentando inhibición en el crecimiento de bacterias Gram negativas identificadas molecularmente como *Ralstonia pickettii* y *Pseudomonas azotomorfans* y para los hongos aislados, pero no identificados molecularmente. Las síntesis de nanopartículas de yoduro de cobre mediante química verde obtenidas en esta investigación, poseerían potenciales aplicaciones antimicrobianas de microorganismos provenientes de materiales de construcción como el hormigón.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, yoduro de cobre, síntesis verde, difusión en pozo, Gram negativas.

Abstract

The biodeterioration of building materials is affected by the colonization of microorganisms because factors such as pH, temperature and, above all, humidity contribute to their survival. Nanotechnology applied to building materials for the improvement of building technologies is still under development. Therefore, the objective of the present study is the verification of the antimicrobial activity of copper iodide nanoparticles on microorganisms isolated from a medium-strength concrete, by green synthesis using taxo extract. X-ray diffraction analysis revealed the crystalline nature with cubic structure of the nanoparticles, elemental composition through scanning electron microscopy and images obtained by transmission electron microscopy revealed spherical morphology and an average size of 35 nm. The selection and identification of the most predominant microorganisms previously isolated from the concrete was carried out using the swabbing technique and then culture-dependent and culture-independent techniques were used for their identification. Finally, the antimicrobial activity of the nanoparticles was performed by the well diffusion method, which is a qualitative technique, presenting inhibition in the growth of Gram-negative bacteria molecularly identified as *Ralstonia pickettii* and *Pseudomonas azotomorfans* and for fungi isolated, but not molecularly identified. The synthesis of copper iodide nanoparticles by green chemistry obtained in this research, would have potential antimicrobial applications for microorganisms from construction materials such as concrete

Key words: antimicrobial activity, copper iodide, green synthesis, well diffusion, Gram negative.

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

El biodeterioro es un proceso de degradación de un material por la intervención de forma directa o indirecta de un organismo, el deterioro puede ser de tipo mecánico, químico o producto de la combinación de ambos (De Greef et al., 2020). Los principales agentes potenciales del biodeterioro son los organismos (Galindo-Alcázar et al., 2018), ya que estos desarrollan sobre la superficie de las estructuras, comunidades de microorganismos denominadas biopelículas (Gorbushina, 2007). El crecimiento microbiano sobre los diferentes materiales provoca el rompimiento, agotamiento y en repetidas ocasiones hasta su destrucción completa (Liu et al., 2018). Mediante estudios previos, distintos autores han llegado a establecer que factores como; pH, temperatura, luz, humedad relativa, contenido de agua y la disposición de nutrientes escogen la supervivencia de algunos organismos sobre los sustratos contribuyendo así en el deterioro (Gámez Espinosa, 2022).

Por otro lado, se sabe que el hormigón está compuesto de cemento, arena y grava, al fraguar el cemento se forman los denominados silicatos de calcio, los cuales ayudan a la dureza, a mantener un medio básico y finalmente, le dan la consistencia similar a la piedra. Cabe mencionar que el ataque químico puede llegar a modificar el pH hasta una descomposición completa de dichos compuestos de silicato de calcio hidratados (Ibarrondo Armendia , 2020). Además, el hormigón posee una gran comprensión y resistencia al peso encima, pero poca resistencia a la tracción por lo que suele quebrarse fácil antes de doblarse más aún en la humedad.

Justificación del problema

Los biocidas son productos químicos usados en el control del biodeterioro, pero estos a su vez, suelen generar impactos negativos sobre la misma superficie aplicada, al ecosistema e incluso afectan la salud humana (Correa et al., 2020). La propuesta novedosa de hoy en día es el uso de la química verde, la misma que emplea rutas sintéticas sencillas con la menor

cantidad de químicos y energía, disminuyendo la generación de residuos contribuyendo así al medio ambiente y a minimizar el riesgo contra la salud humana (Saleh y Koller, 2018).

Asimismo, utiliza organismos como algas, hongos, bacterias y plantas, estas últimas, se cree, poseen biomoléculas en su extracto que actúan como precursores para la síntesis y la estabilidad de diversas nanopartículas metálicas (Devatha y Thalla, 2018).

La implementación de la nanotecnología en materiales de construcción para obras civiles ha renovado las tecnológicas para la edificación (Bermúdez-Medina y Villamil-Rojas, 2021), y a pesar de que los principales problemas suelen ser costos y tiempo de ejecución de proyectos, se ha ido planificando formas para abaratar los precios sin afectar la calidad de los materiales. Por ende, la industria de la construcción en la necesidad de implementar métodos para mejorar características de calidad como; una baja permeabilidad, bajo coeficiente de difusión de carbonatos, anti-moho, anti-humedad, entre otras (Gao et al., 2018), está elaborando el uso de nanomateriales y nanopartículas ya que favorece el desarrollo de peculiares propiedades funcionales como; mecánicas, hidrofóbicas, superhidrofóbicas, autolimpieza, bactericidas (He et al., 2019).

Por este motivo, el presente trabajo sintetizó nanopartículas de yoduro de cobre a base del extracto del taxo, ya que al contener una considerable cantidad de polifenoles, estos además de contribuir a la estabilidad de las nanopartículas actúan como precursores en la síntesis. En conjunto con el cobre, que por su capacidad antifúngica podrían reducir el crecimiento de microorganismos presentes en el hormigón.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Comprobar la actividad antimicrobiana de nanopartículas de yoduro de cobre sobre microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media

Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de yoduro de cobre mediante química verde, para su posterior caracterización UV-VIS y DLS.
- Caracterizar las nanopartículas de yoduro de cobre mediante las técnicas de TEM, SEM y DRX, para la medición de la morfología, tamaño, distribución y mineralogía.
- Aislar e identificar microorganismos presentes en un hormigón de resistencia media ($f'c = 240 \text{ kg/cm}^2$) mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo para la selección de las cepas más predominantes.
- Aplicar las nanopartículas de yoduro de cobre sobre los microorganismos mediante el método de difusión en pozo para comprobar la actividad antimicrobiana.

Hipótesis

Las nanopartículas de yoduro de cobre tienen un efecto antimicrobiano sobre microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media.

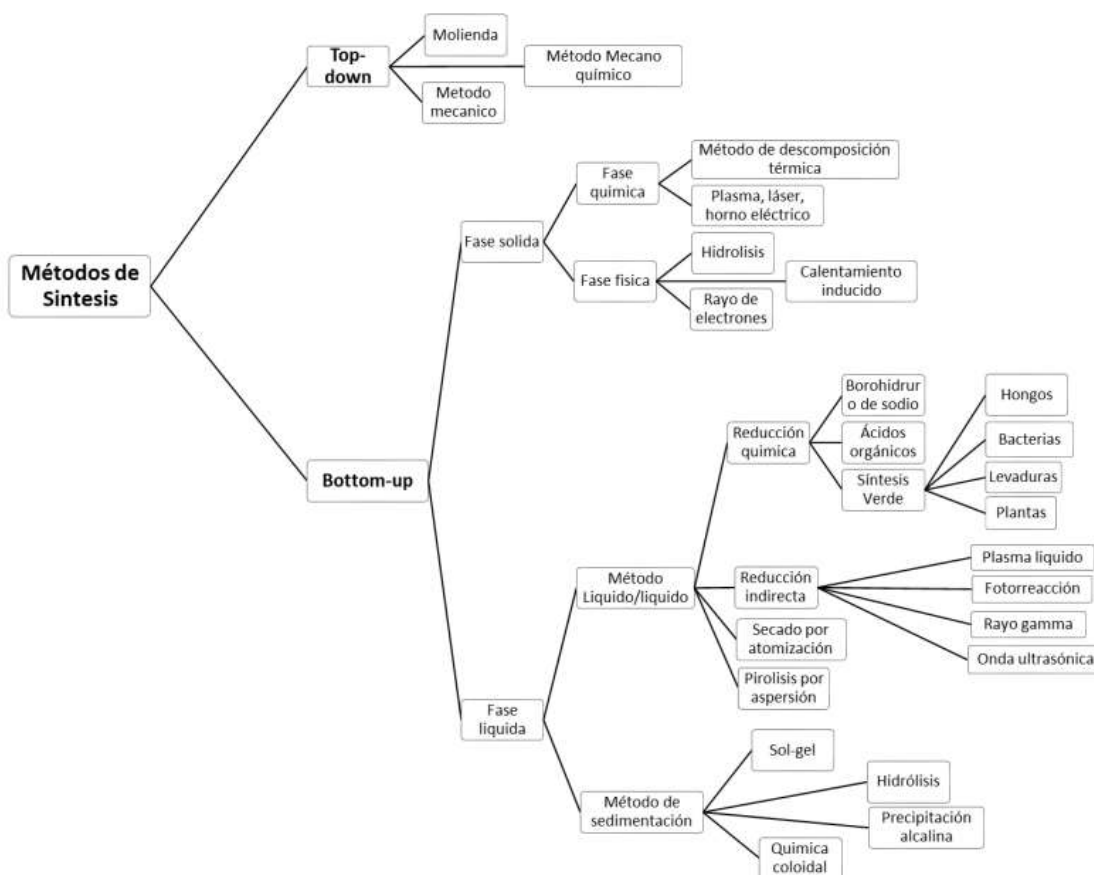
Capítulo II: Marco Teórico

Síntesis de nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) pueden sintetizarse mediante dos métodos; bottom-up o top-down, el primer método incluye la síntesis química y básicamente es la construcción de estructuras de mayor tamaño a partir de componentes atómicos, aquí dependiendo los factores de reacción como el pH, concentración, temperatura, el agente reductor, etc; se van a ver controlados la forma y el tamaño de las NPs (Ortega et al., 2023 ; Shankar y Rhim, 2014). Por otro lado, el segundo método top-down es todo lo contrario y consiste en fragmentar material macroscópico hasta llegar a un tamaño nanométrico (Gómez-Garzón, 2018).

Figura 1

Principales métodos de síntesis de nanopartículas



Nota. El gráfico representa la clasificación para la síntesis de nanopartículas (NPs) y los principales métodos. Tomado de (Ore Payano, 2022).

Química verde

Comúnmente, muchos de los reactivos que son usados como estabilizadores, reductores y agentes de recubrimiento para controlar el crecimiento de cristales suelen ser tóxicos para el ambiente por lo que se ha buscado remplazar por compuestos más amigables, como son; el almidón, el azúcar, el ácido ascórbico, los extractos de plantas o frutas, entre otros, surgiendo así la denominada química verde. En sí, compuestos como enzimas, proteínas, terpenos, flavonoides, polifenoles, ácidos fenólicos, entre otros, encontrados en frutas, plantas y sus extractos son los responsables de reducir los iones metálicos para luego estabilizarlos, es decir, evitar que se agreguen (Iravani , 2011 ; Ore Payano, 2022), y, dependiendo de la concentración del extracto, se puede variar el tamaño de nanopartícula y mejorar altamente la calidad (Shah et al., 2015).

Agentes reductores y estabilizadores

Por ejemplo, los fenoles llevan en su estructura uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático, estos están presentes en cereales, hortalizas, raíces y frutas, cumpliendo funciones metabólicas importantes como el crecimiento, reproducción de plantas e incluso defensa contra patógenos externos y a situaciones de estrés ambiental (Peñarrieta et al., 2014). En este contexto, frutas como el taxo contiene una alta cantidad de polifenoles como taninos, ácidos fenólicos y flavonoides que también por su actividad antioxidante sirve para atrapar los radicales libres provocados por el oxígeno (Rojano et al., 2012).

En sí, los metabolitos secundarios como enzimas, proteínas, terpenos, flavonoides entre otros, se encuentran en diferentes partes de plantas y frutas (Iravani , 2011), al hacer uso de los extractos vegetales estos actúan como agentes reductores en la síntesis de NPs metálicas

además de mejorar altamente en la calidad, morfología y tamaño (Shah et al., 2015).

Nanopartículas metálicas

Para la síntesis de NPs metálicas es importante considerar el elemento metálico y más aún el extracto vegetal, debido a que en este último se encuentran los diferentes compuestos con capacidades reductoras y la suma de estos provocan un mayor potencial reductor y, por tanto, estabilizador (Santos-Espinoza et al., 2020).

Las NPs de algunos metales de transición suelen tener variados efectos tóxicos sobre los microorganismos como antibacterianas y antifúngicas (Seabra y Duran, 2015), debido a que poseen la capacidad de conjugarse con agentes antibióticos por sus propiedades antimicrobianas (Allahverdiyev et al., 2011).

Nanopartículas con actividad antimicrobiana

Se ha estudiado que el mecanismo de acción de las NPs metálicas es la producción de ROS dentro de las células (Rajput et al., 2018) y entre las hipótesis están que los iones de los metales alteran los procesos fisiológicos como la generación de ATP producido por el cambio en el gradiente electroquímico, el estrés oxidativo que se generan por especies reactivas de oxígeno y finalmente, la ruptura de la membrana celular a causa de la penetración de las NPs (Mamonova et al., 2015).

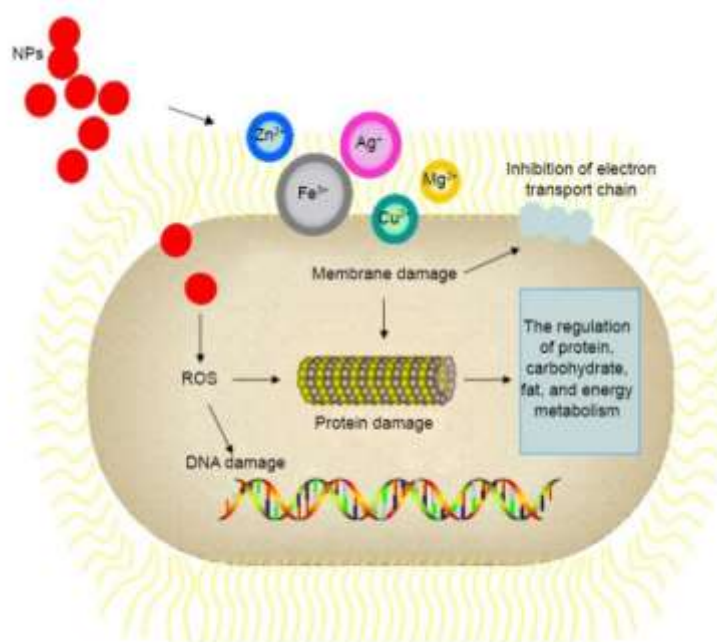
Además, la efectividad de las nanopartículas para aplicaciones antimicrobianas depende de algunos factores como la morfología, el tamaño de partícula, la estabilidad y en sí, las propiedades físico-químicas que estas posean (Moritz y Geszke-Moritz, 2013). Los radicales libres se forman a partir del estrés oxidativo, en este proceso, el oxígeno es el responsable del daño celular al alterar varios mecanismos de las células relacionado con la actividad patogénica (Vega, 2009).

En este sentido, la actividad antimicrobiana de las NPs de Cu, se basa en el área de superficie en relación con los microorganismos, se ha estudiado que entre menor sea el tamaño de las NPs mayor es la actividad antibacteriana (Trepiana Fica, 2015), puesto que los

iones de cobre ingresan a las células atravesando la membrana celular, alteran su función enzimática y finalmente provocan la muerte de la bacteria (Ren et al., 2009). También induce reacciones de oxidación que son catalizadas por metales que generan daño celular a proteínas, las membranas o a nivel de ADN, además producen ROS (Kumar et al., 2018). Se ha descrito que los compuestos de cobre (Cu) poseen propiedades multifuncionales como antibacterianos, antivirales e incluso antifúngicos, puesto que se ha estudiado el cobre como NP para aplicaciones industriales y comerciales; algunas investigaciones se han hecho acerca del efecto inhibitorio de las NPs de óxido de Cu contra bacterias Gram positivas y negativas, donde el tamaño es el factor que resalta para su actividad antimicrobiana (Ramos Cortez, 2018).

Figura 2

Mecanismos de acción de las nanopartículas metálicas en la célula bacteriana



Nota. El gráfico representa los mecanismos de acción de las nanopartículas metálicas en la célula bacteriana, en donde se destacan la producción de ROS, daño al ADN, a las proteínas y a la membrana celular. Tomado de (Ramos Cortez, 2018).

Nanopartículas de cobre

La síntesis de NPs de Cu es mucho más compleja con respecto a otros metales puesto que suelen ser elevadamente inestables en soluciones acuosas; la reducción química es una de los métodos más empleados (Alaniz Hernández, 2023). Este método consiste en reducir las sales o complejos metálicos a nanopartículas metálicas que pueden ser dispersadas en varios disolventes (Moraes et al., 2020). Otro método es el de síntesis verde, el cual se destaca por no utilizar precursores tóxicos si no que emplea microorganismos como bacterias, levaduras, hongos e incluso extractos de plantas; este último posee moléculas como alcaloides, aminoácidos, proteínas, enzimas, flavonoides, terpenoides y polifenoles los cuales son los responsables de que ocurra la reducción de los iones metálicos (Jiménez Carrasco, 2023).

Nanopartículas de yoduro de cobre

El yoduro de cobre o yoduro cuproso (CuI) es un compuesto semiconductor que puede ser formado por cobre y yodo mediante reacciones redox (Ezealigo et al., 2019), se puede encontrar en tres fases de cristalinidad; α - CuI, β - CuI y γ - CuI con estructura cúbica, hexagonal y cúbica respectivamente, a una temperatura inferior a 350°C (Ali y Khairy, 2021).

El CuI como NPs presenta peculiares propiedades como la gran bandgap, alta ionicidad, gran dependencia de la temperatura (Byranvand y Kharat, 2014), actividad antimicrobiana y sistemas para administrar diferentes fármacos (Tavakoli et al., 2013 ; Xu et al., 2012). Además, se han encontrado algunas aplicaciones para las NPs de CuI como catalizador altamente selectivo para varias reacciones (Mallick et al., 2019), ya sea para la síntesis de triazoles (Chavan et al., 2019), síntesis verde de andamios de imidazol (Kohli et al., 2023), alilación regioselectiva de índoles y últimamente, como antimicrobiano sobre superficies (Awed et al., 2021), adsorbente de contaminantes de metales pesados y nanocatalizadores para transformaciones orgánicas. El yodo (I₂) es comúnmente utilizado para desinfectar superficies en laboratorios y hospitales, también es usado como tabletas y soluciones de yodo para tratamiento de agua en situaciones de emergencia (Ongerth et al., 1989). Por ende, la

elaboración de NPs metálicas con yodo producen nuevas nanoestructuras de halógenos metálicos que muchas veces llegan a mejorar las propiedades ópticas, mecánicas e incluso antimicrobianas del yodo (El-Batal et al., 2018).

Caracterización de nanopartículas

La detección y caracterización de NPs se puede llevar a cabo mediante varias técnicas ya sean estas físicas o químicas como; espectroscopia (Kyrsting et al., 2011), dispersión dinámica de luz (Ore Payano, 2022), fototérmicas, microscopía óptica y es importante tener en cuenta las propiedades del nanomaterial para saber qué técnica es la más adecuada (Brabazon y Raffer, 2015).

Tabla 1

Resumen de técnicas químicas y físicas de caracterización de nanopartículas

Técnicas químicas	
Espectroscopía ultravioleta y visible (UV-Visibles)	Se basa en la absorción de radiación electromagnética por analitos en las regiones ultravioleta y visible del espectro (Ore Payano, 2022). Es decir, es una técnica que crea una huella espectral con la longitud de onda y ancho de banda, para cada metal y varía dependiendo del tamaño y la forma que tengan las nanopartículas en estudio (Serra et al., 2009).
Técnicas físicas	
Difracción de rayos-x (DRX)	El equipo de difracción de rayos-x (DRX) permite establecer la cristalinidad, Jaimes et. al (2019) mencionan también indicadores como la forma geométrica de la red cristalográfica, distancia interplanar, parámetros de red, entre otros.
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	Se permite la observación de muestras a través de cortes ultrafinos, este equipo emite un haz de electrones hacia la muestra, los electrones rebotan o se absorben proyectando una imagen aumentada.
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	También hace uso de electrones para crear una imagen de alta resolución lo que significa que características espacialmente cercanas a la muestra se pueden observar a una alta magnificación.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

Dynamic light scattering por sus siglas en inglés, se conoce como una técnica físico-química, su fundamento consiste en transmitir luz láser a través de una solución, las partículas suspendidas en el ambiente producen el movimiento browniano (movimiento aleatorio) que, a su vez colisionan entre sí y mediante un detector de luz se puede conocer el tamaño de las NPs ya que, a mayor tamaño, existe menor movimiento, menor dispersión de luz y menos fluctuaciones en la intensidad (Ticllacuri Perales y Travezaño Neyra, 2019). Por lo tanto, la técnica DLS establece una medida promedio de la distribución del tamaño de partícula (Neira Garcia , 2015).

Nota. Modificado de (Aragon Mamani, 2020).

Materiales de construcción

Por otra parte, dentro de los materiales de construcción con mayor antigüedad se encuentra el concreto u hormigón (Rendón Díaz Mirón y Rendón Lara, 2017), este se compone de cemento portland, arena, grava, agua y según las cantidades de sus componentes el concreto puede variar sus propiedades según el uso que se le quiera dar (Troyano-Moreno, 2019 ; Villarreal Guerrero, 2021). En el curado del concreto se forman pequeños poros debido a la evaporación del agua, por aquí ingresa el dióxido de carbono (CO_2) de la atmósfera y se produce la reacción con el hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) producto de la reacción de los silicatos de calcio con el agua (Licor, 2016 ; Ramirez, 2016).

Las influencias de algunos factores asociados al ambiente logran acelerar los procesos corrosivos en el concreto, las variaciones del clima son la principal causa (Wang et al., 2012), entre los distintos factores se encuentran la humedad, ya que la presencia de agua en el hormigón sirve como puente electrolítico y a su vez como solvente para muchos iones contaminantes en el ambiente (Picos Pérez, 2016), otro factor es la temperatura, mientras mayor sea, la velocidad de corrosión aumenta.

El cemento en equilibrio posee un pH alcalino de 12.5 sin embargo, factores como el ataque químico puede provocar el decrecimiento de este valor a 9, provocando así la

descomposición completa de compuestos de silicato de calcio hidratados (Ibarrondo Armendia , 2020).

Biodeterioro en materiales de construcción

Se define al biodeterioro como cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por la actividad de seres vivos (Hueck, 1965), dentro del biodeterioro se pueden clasificar tres tipos dependiendo de las consecuencias sobre el material y son; estético, físico y químico. Además, el estado de degradación de un material es provocado por cuatro aspectos clave; primero, la presencia del microorganismo, el tipo de elemento estructural, la situación ambiental y finalmente el material que lo compone (Rose, 1981) ; (Gaylarde et al., 2003). El biodeterioro sobre los distintos materiales de construcción ya sean piedra, cerámica, cemento, hormigón, entre otros, es un conflicto generalizado y además costoso, no sólo para la industria de la construcción, sino también para la sociedad (Romani et al., 2022). Dentro de los parámetros que favorecen el desarrollo de esta comunidad de microorganismos en los materiales están los materiales con poros puesto que tienen la capacidad de retener abundante agua por prolongados tiempos (Gómez-Cornelio et al., 2012), la presencia de nutrientes sobre las superficies ya sea por compuestos orgánicos usados en restauraciones o incluso por excremento de aves (Adams et al., 2016), el pH del sustrato, debido a la tolerancia frente a un amplio rango (Pinna, 2021), por ejemplo; el hormigón cuando se encuentra fresco tiene un pH entre 12 y 13 lo cual permite el desarrollo microbiano cuando se produce la carbonatación (reducción debido a la reacción con el dióxido de carbono) (Allsopp et al., 2004). Se ha encontrado también que los hongos tienen cierta afinidad por sustratos moderadamente ácidos mientras que las cianobacterias son afines a sustratos alcalinos como piedra caliza y mármol (Caneva y Ceschin, 2008).

Microorganismos presentes en el hormigón

Entre los microorganismos endolíticos presentes en el concreto se encuentran las algas, bacterias, musgos y hongos. Las algas se encuentran en zonas de humedad y provocan la decoloración de las superficies y la retención de agua en los poros, las bacterias por su parte suelen ser los más agresivos puesto que metabolizan diversos compuestos que conducen a reacciones químicas que desgastan la durabilidad del concreto, los musgos descomponen el concreto en ácidos débiles lo que conlleva al desmoronamiento y agrietamiento de la superficie lo que permite la entrada de agresores como el H_2CO_3 y por último, los hongos oxidan el hierro y sintetizan ácidos orgánicos que disuelven minerales como el calcio, potasio y el aluminio (Forero Osorio y Culmo Rodriguez, 2021).

Bach y Rangel (2005) destacan que las pinturas contienen nutrientes en su composición, lo que causa que se desarrolle crecimiento microbiano ya sea en estado húmedo como seco. Además, según Parjo et. al (2015) los hongos que suelen encontrarse sobre capas de pintura seca son; *Aureobasidium*, *Alternaria* y *Penicillium* y otros como; *Aspergillus niger*, *Stachybotrys* y *Cladosporium* dentro de paneles de recubrimiento (Shirakawa et al., 2002).

Aislamiento e identificación de microorganismos

Las técnicas para aislar microorganismos tienen la finalidad de obtener cultivos de una sola cepa en un medio de cultivo a partir de cultivos mixtos (con más de uno) la técnica de siembra por estría en un medio de cultivo sólido en cajas de Petri es la técnica más utilizada para aislar microorganismos como las bacterias, consiste en tomar una pequeña cantidad de muestra con un asa bacteriológica estéril y repartirla en forma de zigzag en otra caja (Díaz Barajas et al., 2022). Posteriormente pueden ser identificados mediante métodos rápidos como la microscopía, pruebas bioquímicas, PCR en tiempo real, detección de antígenos y anticuerpos, también cabe mencionar que la identificación preliminar mediante pruebas morfológicas de primer nivel permite tener el conocimiento previo para la aplicación de

posteriores pruebas moleculares, las mismas que permiten identificar los microorganismos hasta un nivel de género y/o especie (Aguilera Páramo , 2021).

La secuenciación genómica implica la determinación del orden de los nucleótidos (T, G, A y C) del genoma de un organismo (Carballo , 2021). La secuenciación por el método de Illumina tiene como características; la ampliación de los fragmentos de ADN para la generación de clúster (colonias del mismo fragmento) y la detección de bases en la secuenciación por medio de etiquetas fluorescentes (Rubio et al., 2020). Además, tiene una exactitud determinada por la intensidad de la señal y la longitud de las lecturas, hoy en día se logra ejecutar hasta 300 pares de bases (Zhang et al., 2014).

Para la identificación de bacterias Bou et. al (2011) menciona tres técnicas; primero, el método fenotípico que básicamente se identifican mediante las características a simple vista de su morfología, segundo, el método molecular, que consiste en el análisis del ARN y finalmente está el método basado en proteómica, aquí se aborda el estudio en conjunto de proteína, lo más usado es la electroforesis y la espectrometría de masas (Huaman Alvarado y Mandujano Galarza, 2021), mientras que, Andersen et. al (2011) menciona que para la identificación de hongos generalmente se la hace mediante la observación morfológica de las esporas capturadas o después de su cultivo.

Identificación microscópica

Las tinciones consisten en preparaciones acuosas u orgánicas de colorantes para colorear microorganismos, fragmento de tejidos vegetales o animales y otras muestras de importancia biológica y así visualizar de mejor manera al microscopio su morfología, estructura y agrupamiento (Koneman y Allen, 2008 ; Vergara de Arco et al., 2019).

En la tinción simple el colorante empleado únicamente ayudar a observar la morfología de las células mientras que, en una tinción diferencial, se emplea más de un colorante y estos a su vez denotan las diferencias existentes entre células bacterianas o entre partes de la misma,

la más conocida es la tinción Gram la cual clasifica a las bacterias por la estructura de su pared celular tiñendo de color violeta a bacterias gran-positivas y gran-negativas de rosa.

Aditivos antifúngicos para el control del biodeterioro

Según la EPA (Agencia de Protección Ambiental de estados Unidos), los antimicrobianos son una combinación de sustancias entre los que destacan los pesticidas, fungicidas, herbicidas, desinfectantes y los denominados biocidas, los cuales son empleados para destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos como; bacterias, virus y hongos, sobre la superficie de objetos, (Ganguli y Chaudhuri, 2021).

Una de las estrategias implementadas frente al biodeterioro causado por microorganismos es recubriendo las superficies o sustratos expuestos con nanomateriales con actividad antimicrobiana; se han realizado estudios de nanopartículas metálicas como; aditivos en las pinturas sin que afecte el color (Barbería Roque, 2022), recubrimientos de base sol-gel (Gámez Espinosa, 2022), biocidas a partir de extractos de plantas, de aceites con actividad repelente e insecticida (Medina Tierres, 2022), entre otros.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Existen algunas técnicas para determinar la susceptibilidad de microorganismos como las bacterias hacia los diferentes antimicrobianos, por ejemplo; el método de difusión en agar, el cual posee características que lo hacen uno de los más sencillos con resultados fáciles de interpretar. Es importante tener en cuenta aspectos como el microorganismo y el grado de solubilidad del compuesto a evaluar para saber qué método seleccionar, generalmente se ha encontrado que para evaluar compuestos polares se usan los métodos de difusión ya sea por discos o en pozos y los métodos de dilución tanto en agentes polares como no polares (Ramirez y Marin Castaño, 2009).

Método de difusión en agar con disco y pozo

La evaluación mediante difusión en agar con discos es uno de los más utilizados en laboratorios de microbiología, a pesar de que no se tenga resultados exactos para todas las bacterias, se ha estandarizado el método para algunas como; *Neisseria meningitides*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* y estreptococo (Eras Díaz , 2019). La técnica consiste en inocular las cajas de agar con los microorganismos a estudiar, colocar los discos de papel de aproximadamente 6 mm de diámetro que contienen el agente microbiano sobre la superficie del agar a distancias significativas e incubar, finalmente se mide los halos de inhibición de cada disco (Balouiri et al., 2016). Sin embargo, Burgess et. al (1999) mencionan una posible desventaja del método y es que los sensidiscos por estar compuestos de celulosa presentan muchos grupos hidroxilos libres provocando que la superficie del disco se vuelva hidrofílica, si el agente antimicrobiano presenta compuestos catiónicos de los productos naturales, estos son adsorbidos por el disco y no llegan a difundirse por completo en el medio sólido.

El método de difusión en pozo es similar en cuanto a la técnica de difusión en disco, comenzando por inocular el microorganismo de estudio en medio de cultivo agar, la diferencia se encuentra en realiza orificios de diámetro entre 6 y 8 mm con una punta previamente esterilizada (LLontop Delgado y Minaya Delgado, 2022). Posteriormente se coloca un volumen entre 20 a 100 μ L de la sustancia antimicrobiana y se incuba durante toda la noche.

Capítulo III: Metodología

Preparación del extracto de taxo

La preparación del extracto de taxo se obtuvo siguiendo el protocolo previo de (Bauz Lara, 2023) en base a (Murgueitio et al., 2016) con modificaciones. Se presionó el fruto sin cáscara en la licuadora, a continuación, se agregó 10 mL de etanol al 70% por cada 5 g con agitación orbital durante 4 horas, se recogió el sobrenadante y se centrifugó. Se volvió a tomar el sobrenadante y se filtró con un filtro PTFE de 0.45 μm y una jeringa. Finalmente se guardó el extracto filtrado a 4°C hasta su uso.

Síntesis de nanopartículas de yoduro de cobre

Para la síntesis de nanopartículas, se siguió el protocolo establecido de (Markin y Markina, 2019) modificado, para esto se preparó sulfato de cobre (CuSO_4) y yoduro de potasio (KI) en relación 1:2.

A 2 mL del extracto previamente filtrado se añadió la solución de CuSO_4 y KI con agitación magnética a temperatura ambiente hasta presenciar el cambio de color y un precipitado en la solución, finalmente se midió el pH transcurrido unos minutos. El precipitado sintetizado se separó por centrifugación y se dejó secar para su posterior caracterización.

Figura 3

Representación esquemática de la síntesis de NPs de CuI



Caracterización equipo UV-Vis y DLS

Las nanopartículas de yoduro de cobre producidas se caracterizaron a partir del precipitado resuspendido con agua tipo I, con la ayuda de un espectrofotómetro de haz único UV-Visible (Thermo Spectronic, GENESYS™ 8, Inglaterra, Quartz Cell, longitud de paso 10 mm). De igual manera las distribuciones de tamaño hidrodinámico de las nanopartículas se analizaron siguiendo el manual de uso del equipo de dispersión de luz dinámica (DLS) (HORIBA LB550).

Caracterización equipo DRX, SEM y TEM

Para el análisis DRX, SEM y TEM las nanopartículas fueron llevadas al laboratorio de docencia, área de microscopía de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. En primera instancia, se analizó la muestra en el equipo de difracción de rayos X para conocer su pureza y posteriormente seguir con la caracterización.

La estructura cristalina de yoduro de cobre en las NPs se identificó mediante difracción de rayos X (DRX) en un difractómetro Empyrean (Malvern Panalytical) utilizando un tubo de rayos X de cobre (Empyrean Cu LFF) y radiación Cu-K α a $2\theta=5^{\circ}$ - 90° con 45 kV y 40 mA (ver **Figura 4a**). La composición elemental se midió mediante microscopía electrónica de barrido

(SEM) con ayuda de un microscopio (Mira 3 Tescan, Brno, Moravia del Sur, República Checa) (Figura 4b). Finalmente, la morfología de las NPs de Cul se observó por microscopía electrónica de transmisión (TEM), las imágenes se grabaron en (FEI Tecnai G2 Spirit Twin, Eindhoven, Brabante Septentrional, Países Bajos) con una velocidad de voltaje de 80 kV (Figura 4c).

Figura 4

Equipos de caracterización de nanopartículas



Nota. Las imágenes representan los equipos del laboratorio de microscopía de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE usados para la caracterización de las NPs. a) Difractómetro de rayos X, Empyrean. b) Microscopio electrónico de barrido, Mira 3 Tescan. c) Microscopio electrónico de transmisión, FEI Tecnai. Fotografías propias.

Sitios de muestreo de microorganismos

Se llevaron a cabo tres muestreos microbiológicos en el mes de mayo del presente año, en un hormigón de resistencia media proporcionado por el área de Ingeniería Civil de la Universidad de las Fuerzas Armadas ($0^{\circ}18'53''S$ $78^{\circ}26'36''O$). En la **Figura 5** se muestran registros fotográficos.

Las muestras se realizaron mediante la técnica del hisopado a partir del hormigón con evidente presencia del biodeterioro (Verdier y otros, 2014), luego, los hisopos se introdujeron en tubos de vidrio de tapa rosca con solución fisiológica estéril (0.85g de NaCl en 100 mL de agua destilada) considerada esta como solución madre. Adicionalmente, se inoculó directamente por estriado en cajas Petri (una con PDA y otra con RB), para esto, se remojó el hisopo previamente en la solución fisiológica estéril para posteriormente tomar la muestra con la técnica del hisopado, las cajas fueron llevadas al laboratorio de Microbiología Ambiental del CENCINAT. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de 1:10, 1:100 y 1:1000 de la solución madre para inocular 0.1 mL de cada dilución en cajas Petri preparadas con medio de cultivo Agar de Dextrosa y Papa (PDA) y Rosa Bengala suplementado con cloranfenicol (RB) con su respectiva repetición. Finalmente, las placas fueron incubadas a $28^{\circ}C$ para su posterior aislamiento.

Figura 5

Sitio de muestreo



Nota. Sitio de muestreo. A: Hormigón con presencia del biodeterioro. B: Ubicación de la Universidad de las Fuerzas Armadas tomado de Google maps.

Aislamiento e identificación de microorganismos

Se realizó el aislamiento de todos los microorganismos con morfologías distintas presentes en los tres muestreos ya sean estos provenientes de la siembra directa o por dilución, en cajas con medio PDA, (incluidos los provenientes del medio RB, ya que, al ser un medio selectivo para hongos, estos se desarrollan en PDA sin ningún inconveniente).

Se denotaron los nombres de las diferentes colonias aisladas mediante letras del abecedario en mayúscula, minúscula y números cardinales según su procedencia; M1, M2 y M3 respectivamente.

Identificación macroscópica y microscópica.

Para la identificación microscópica de todos los microorganismos encontrados en los tres muestreos se realizó tinción Gram para las bacterias y azul de lactofenol para hongos filamentosos, se usó la técnica de tinción respectiva bajo el criterio de observación macroscópica.

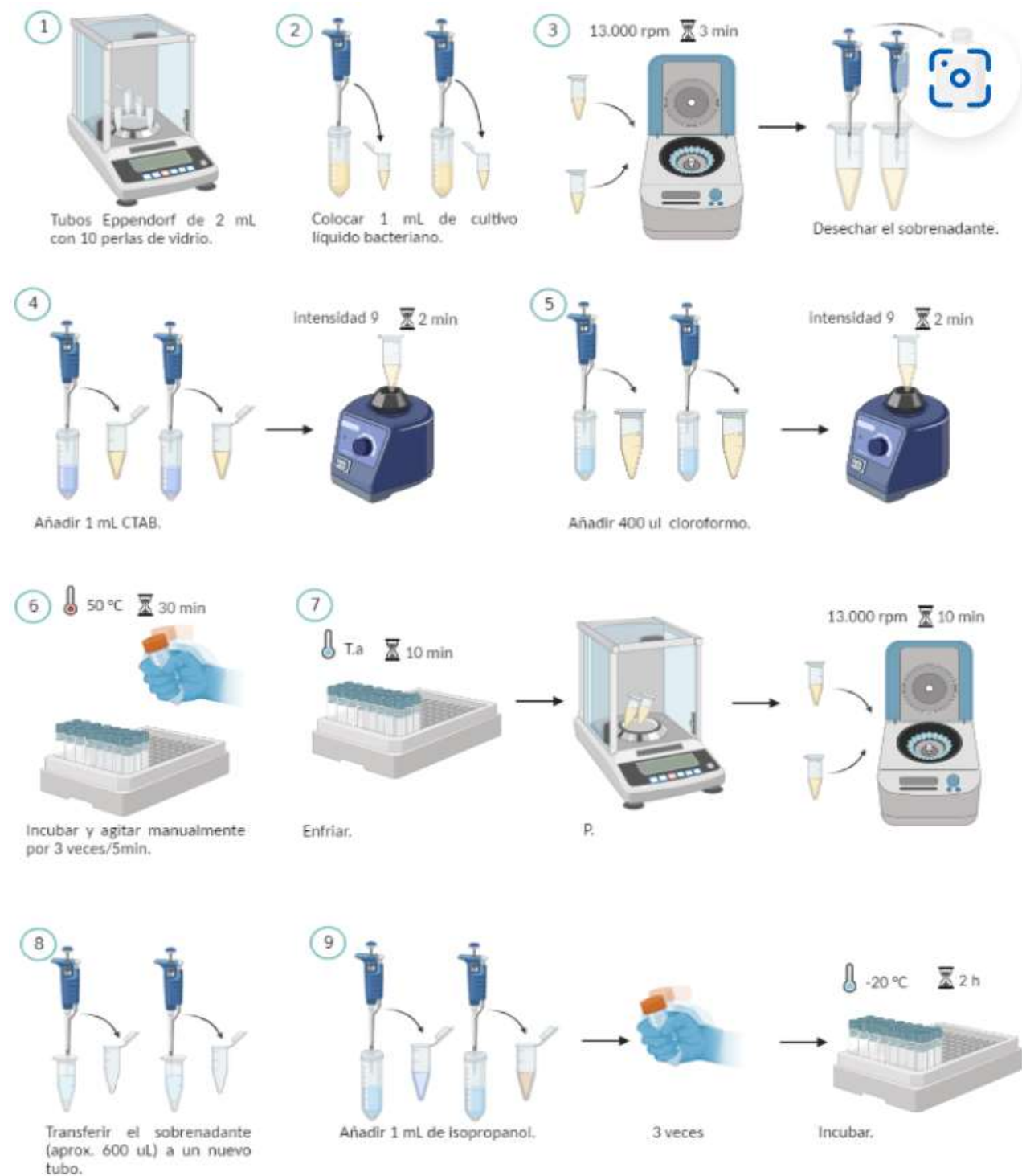
Posteriormente se seleccionaron los microorganismos más predominantes mediante un análisis de frecuencia y densidad relativa con la comparación de todas las colonias de los tres muestreos, escogiendo así las de mayor repetitividad. Todas las cepas escogidas se purificaron en PDA hasta evidenciar su crecimiento y mediante la visualización se catalogaron como 2 bacterias (1B y 2B) y 5 hongos (3, 10, 13, 18 y 28) H. Las cepas bacterianas fueron aisladas una vez más, mediante subcultivos pero esta vez en medio Agar Nutriente para su óptimo desarrollo según sus requerimientos nutricionales.

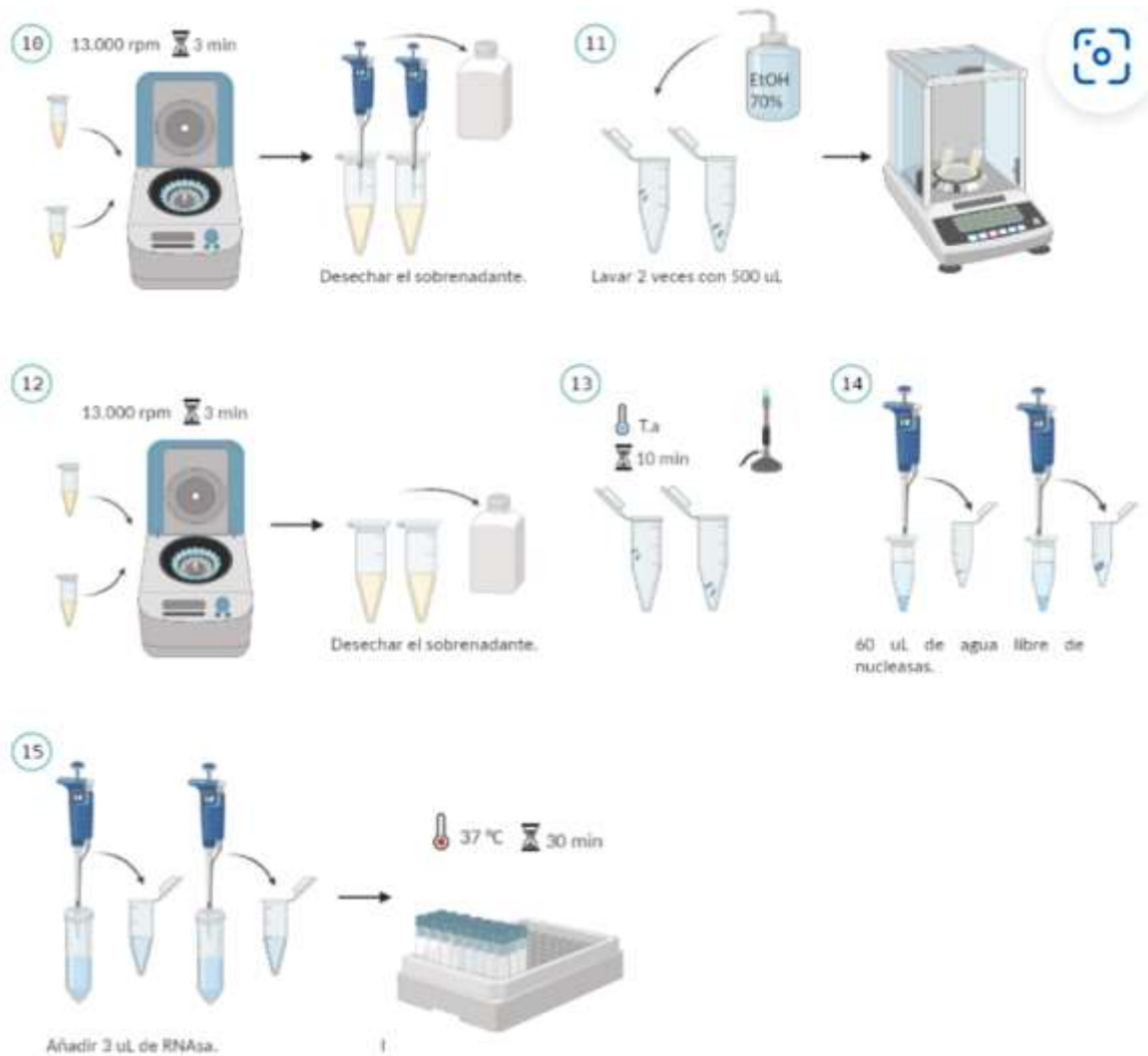
Extracción y Secuenciación de ADN

Una vez escogidos los microorganismos más predominantes, se extrajeron el ADN para su posterior secuenciación, comprobación e identificación molecular de las siete cepas escogidas. La **Figura 6** muestra el protocolo por el método CTAB para bacterias (Weising et al., 2005) y hongos (**ver apéndice 1 y 2**). Una vez obtenido ADN de alta calidad y pureza considerando un rango de 1.8 – 2 y de 2 - 2.2 para los ratios de 260/280 y 260/230 respectivamente, medidos mediante Nanodrop 8000 (Spectrophotometer, Thermo Scientific), se almacenaron según el protocolo de envío de la empresa BioSequence en Quito (<https://biosequenceec.com/>) quien llevó a cabo la secuenciación de alto rendimiento (SNGs) de las muestras mediante la tecnología Illumina.

Figura 6

Método CTAB para extracción de ADN





Nota. Elaboración propia

Identificación molecular de las colonias más predominantes

Se llevó a cabo un análisis bioinformática para la comprobación de los resultados adquiridos, el análisis se ejecutó en Ubuntu la cual es una distribución del sistema operativo Linux. El proceso consistió en una serie de pasos que van desde la descarga de los archivos, instalación de programas (Trim galore y Unicycler para la eliminación de secuencias no deseadas, control de la calidad de las secuencias y el ensamblaje completo respectivamente) y alineación de secuencias en BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) el cual contiene la base de datos GenBank. Además se elaboró un árbol filogenético con el programa

MEGA (Kumar et al., 2018) para la representación de las relaciones evolutivas con los primeros 10 microorganismos resultantes en cuanto a similitud

Aplicación de nanopartículas

Se realizaron tres diluciones a partir de la solución madre de nanopartículas de yoduro de cobre sintetizada, es decir, de la solución madre se diluyó en una relación 1:2 con agua destilada para la primera concentración alta (0.014M), de esta solución se tomó para la concentración media (0.007M) y así con la concentración baja (0.0035) (**ver Figura 7**).

Figura 7

Nanopartículas de yoduro de cobre a tres diferentes concentraciones



Evaluación de la actividad antimicrobiana

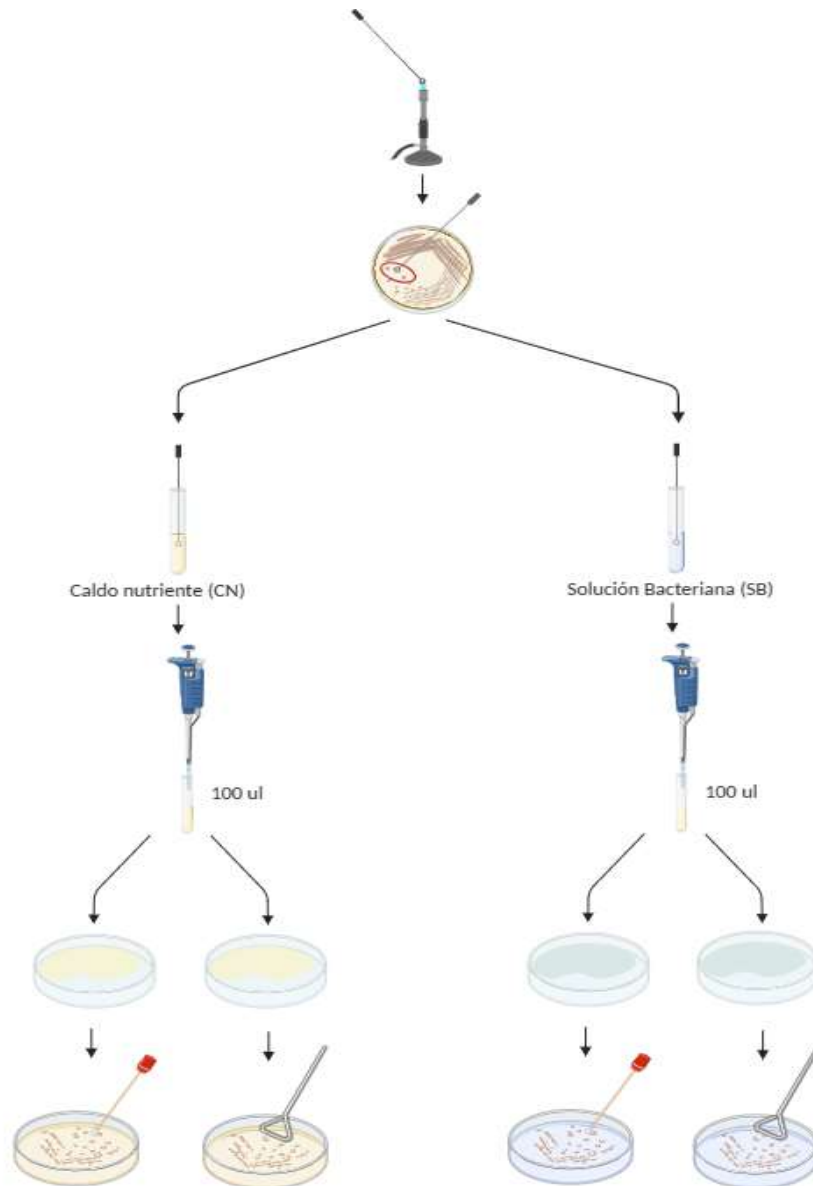
Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se empleó el método de difusión en pozo tanto para las Bacterias (1 y 2) B como para los hongos, se siguió el protocolo de (Olmedo Fonseca , 2019) con modificaciones del inóculo.

Para las bacterias, los inóculos provenían de caldo nutriente (CN) y solución bacteriana (SB) (**ver Figura 8**) mientras que para los hongos, los inóculos fueron provenientes de caldo (PDB) y solución de esporas (SE) (**ver Figura 9**) se colocaron 100 μ L de cada uno en cajas con agar nutriente en bacterias y agar PDA para hongos y se extendió mediante dos técnicas, la

primera con un hisopo estéril siguiendo tres direcciones por todo el agar (Shiva Ramayoni y Calvo Torras , 2007) y la otra con un triángulo de vidrio.

Figura 8

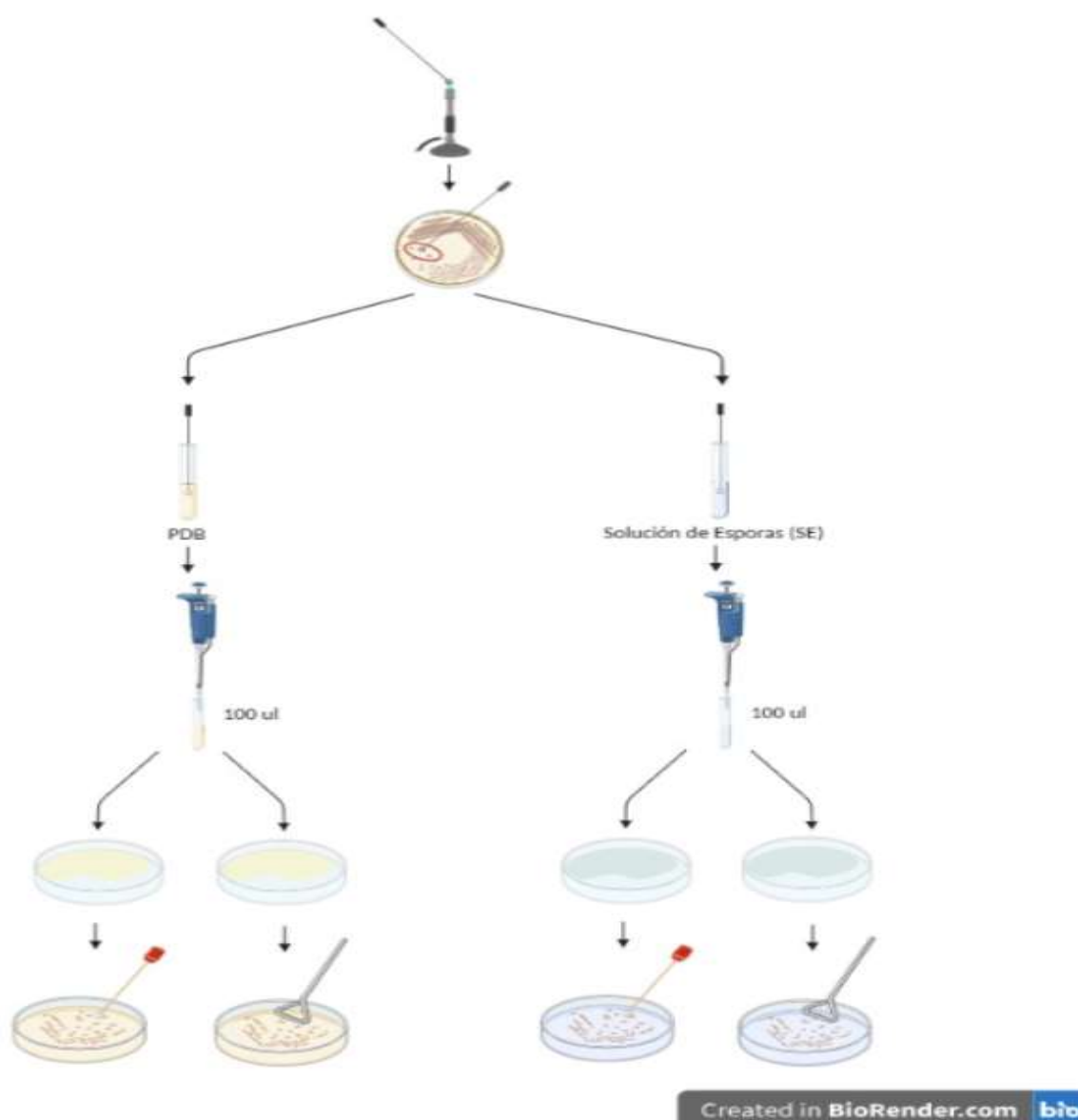
Protocolo actividad antimicrobiana usado en bacterias



Nota. La imagen representa los tipos de inóculo utilizados a partir de la bacteria aislada; Caldo nutritivo (CN) al lado izquierdo, solución bacteriana (SB) del lado derecho. Así como los dos métodos de siembra hisopo (H) y triángulo (T) para cada inóculo. Elaboración propia.

Figura 9

Protocolo actividad antimicrobiana usado en hongos

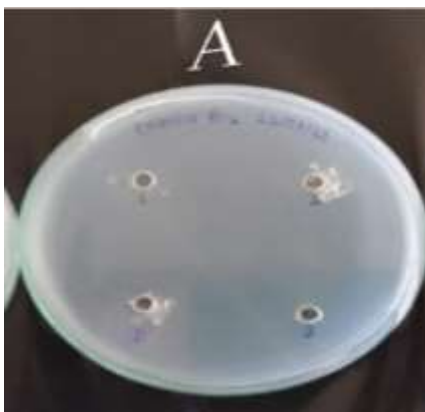


Nota. La imagen representa los tipos de inóculo utilizados a partir del hongo aislado; Caldo PDA (PDB) al lado izquierdo, como la Solución de esporas (SE) del lado derecho. Así como los dos métodos de siembra hisopo (H) y triángulo (T) para cada inóculo. Elaboración propia.

Luego se dividió la caja en cuatro cuadrantes y se realizó un pocillo en el centro de cada cuadrante con la parte superior de una pipeta Pasteur estéril (**ver Figura 10**). Posteriormente se cargaron 50 uL de cada concentración de NPs de Cul; baja, media y alta para los pozos 1, 2 y 3 respectivamente y el cuarto pozo para el control negativo con agua tipo I (**ver Figura 11**). Finalmente se incubaron las cajas a 38 °C durante 24 horas para la observación de los primeros resultados para las bacterias y a 28 °C durante 48 horas para hongos.

Figura 10

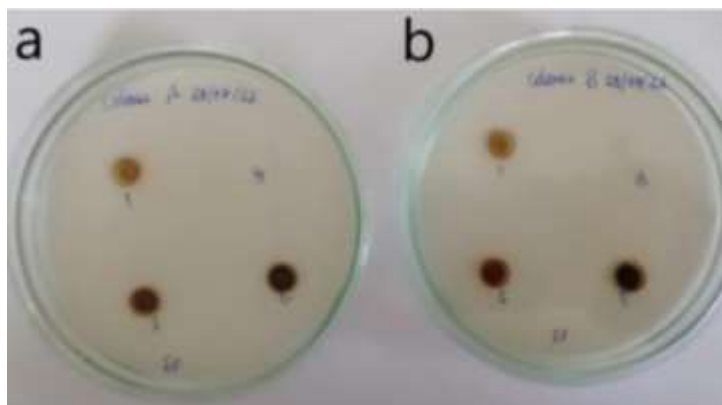
Modelo de pozos realizados con una pipeta estéril



Nota. La imagen representa los pozos realizados con una pipeta Pasteur estéril en caja Petri con medio Nutritivo para bacterias y medio PDA para hongos.

Figura 11

Diferentes concentraciones de NPs aplicadas para bacterias y hongos



Nota. La figura representa el método de difusión en pozo con las NPs de CuI aplicadas a las diferentes colonias a y b) bacterias (1 y 2) B en agar nutriente.

Halos de inhibición

Se midió el diámetro de los halos de inhibición formados frente a las diferentes concentraciones tanto en bacterias como en hongos, con un calibrador digital pie de rey durante 6 días para las bacterias (cada 24 horas desde su aplicación) y 7 días para los hongos (cada 24 horas a partir del segundo día desde su aplicación)

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron en el programa informático libre “OriginPro 2023b” con los datos de los ensayos por triplicado. Se utilizó un ANOVA y la prueba de Bonferroni para la determinación de las diferencias significativas entre las medias de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos con un nivel de significancia de $\alpha = 0.005$.

La **Figura 12** representa un ejemplo de la matriz con los diámetros de los halos de inhibición durante 6 días para la bacteria 1B, siendo caldo nutriente (CN) y solución bacteriana (SB) los dos inóculos. Las tres replicas tanto para la siembra por hisopo (H1, H2 y H3) como por triangulo (T1, T2 y T3). Además, las concentraciones 1, 2 y 3 como baja, media y alta.

Figura 12

Diseño multifactorial para la comprobación de la actividad antimicrobiana in vitro contra la bacteria 1B

		BACTERIA (1B)											
		Caldo Nutriente (CN)						Solución bacteriana (SB)					
Día (h)	Concentración	Hisopo (H)			Triangulo (T)			Hisopo (H)			Triangulo (T)		
		H1	H2	H3	T1	T2	T3	H1	H2	H3	T1	T2	T3
24	1	16,04	15,56	14,2	21,99	14,13	18,26	24,14	21	20,64	13,96	0	18,69
	2	27,19	24,29	23,33	29,16	23,36	26,7	28,56	37,9	32,76	36,3	26,72	25,4
	3	39,15	37,11	36,75	35,02	33,53	33,89	39,78	52,12	47,54	35,96	34,4	44,84
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	1	16,07	15,56	14,21	21	14,15	18,28	24,16	21,3	20,65	13,99	7,6	18,74
	2	27,21	24,3	23,33	29,18	23,38	26,8	28,5	37,88	32,68	30,03	33,42	25,34
	3	39,16	37,12	36,77	35,04	33,6	33,9	39,8	46,94	46,87	34,56	33,64	41,5
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	1	16,07	15,55	14,41	21,1	14,2	18,28	25,13	21,54	20,78	14,21	9,11	18,83
	2	27,22	24,31	23,35	29,18	23,38	26,81	28,3	37,81	32,56	26,76	30,65	25,12
	3	39,16	37,13	36,77	35,07	33,6	33,92	39,8	40,21	44,9	33,41	31,29	37,62
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	1	16,08	15,56	15,22	21,11	14,21	17,29	25,15	24,67	21,3	14,33	14,33	14,33
	2	27,22	24,3	23,36	29,14	23,38	26,81	28,1	37,76	32,49	24,38	29,88	24,68
	3	39,17	37,13	36,78	35,07	33,6	33,92	39,24	36,89	44,25	31,95	30,55	31,24
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
144	1	17,77	15,53	15,7	21,62	14,41	17,55	25,15	22,68	21,56	14,51	13,81	20,35
	2	26,12	25,94	24,6	29,04	25,28	28,26	28,02	37,74	32,34	23,36	26,3	24,44
	3	37,87	38,88	38,24	35,6	34,1	33,92	39,46	26,74	43,24	31,58	29,64	25,01
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	1	1,79	15,42	15,88	19,93	14,67	16,31	25,16	22,23	21,65	14,61	15,11	21,34
	2	25,42	25,35	25,37	29,69	25,3	21,33	28,04	39,44	32,48	22,78	26,27	23,84
	3	37,55	36,72	37,64	36,62	36,1	29,18	40,49	52,8	45,12	30,24	28,28	33,06
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota. La imagen representa los valores de los halos de inhibición obtenidos pasado 144 horas desde la aplicación de NPs (6días) en la bacteria 1B con el inóculo proveniente de caldo nutriente (lado izquierdo) y solución bacteriana (lado derecho) por medio de hisopo (H) y con triangulo (T) por triplicado en cada caso. Elaboración propia.

Capítulo IV: Resultados

Síntesis de nanopartículas de yoduro de cobre

Se logró sintetizar NPs de CuI con extracto de taxo, primero por la observación en el cambio de la coloración y posteriormente por la presencia de un precipitado blanquecino tras la agitación a temperatura ambiente. Adicionalmente, se midió la concentración de cobre en la muestra mediante el equipo de absorción atómica con una cámara de cobre y se hizo una relación 1:2 para obtener CuI.

Figura 13

Nanopartículas de yoduro de cobre

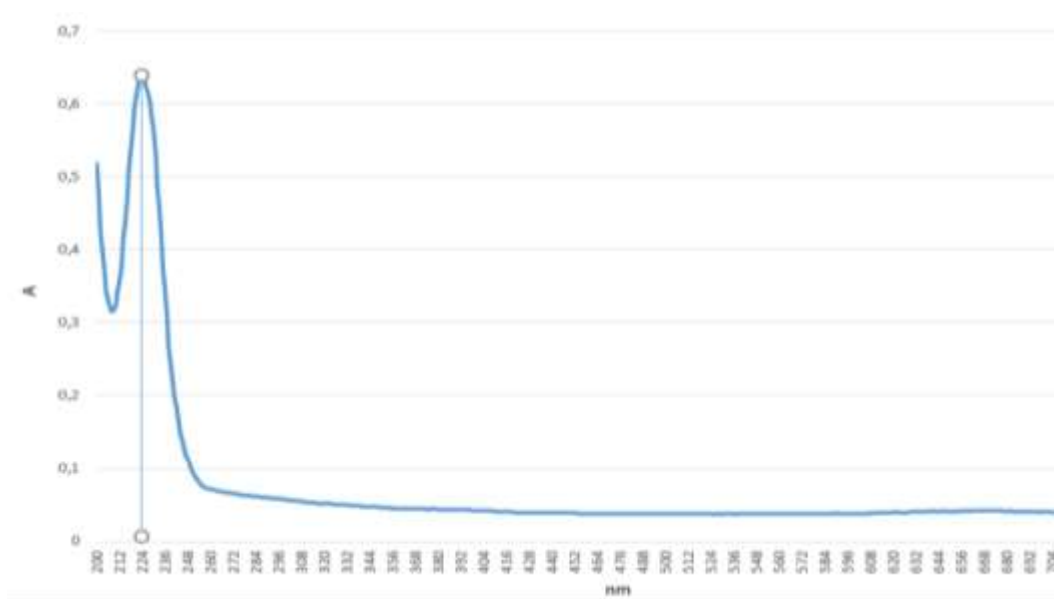


Caracterización UV-VIS

El espectro de absorbancia de las nanopartículas de CuI sintetizadas con 2 mL del extracto de taxo, en función de la longitud de onda de la luz incidente se demuestra en la **Figura 14**, con la presencia de una curva con un pico a los 224 nanómetros (nm).

Figura 14

Espectro UV-Vis y de las NPs de Cul sintetizadas con extracto de taxo



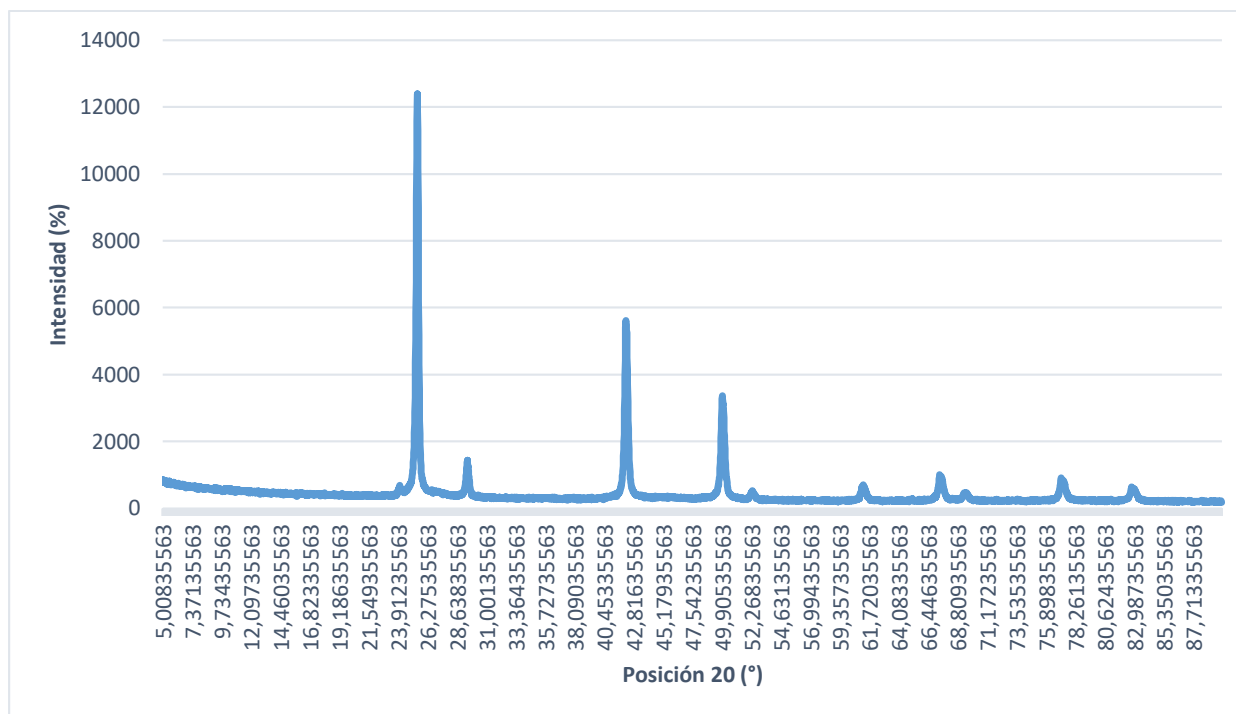
Nota. El gráfico representa el espectro UV-Visible en un rango de 200-704 nm, A: absorbancia

Caracterización DRX, TEM y SEM

En la **Figura 15** se muestra el patrón DRX de las nanopartículas de Cul. Los picos de difracción (25.42° , 29.43° , 42.16° , 49.90° , 52.29° , 61.17° , 67.35° , 69.31° , 74.71° , 77.12° y 82.77°) y sus posiciones corresponden a la fase cúbica pura establecido en el código de referencia (01-082-2111) con un Score de 92% para el Copper Iodide.

Figura 15

Patrón XDR de NPs de Cul sintetizadas con extracto de taxo

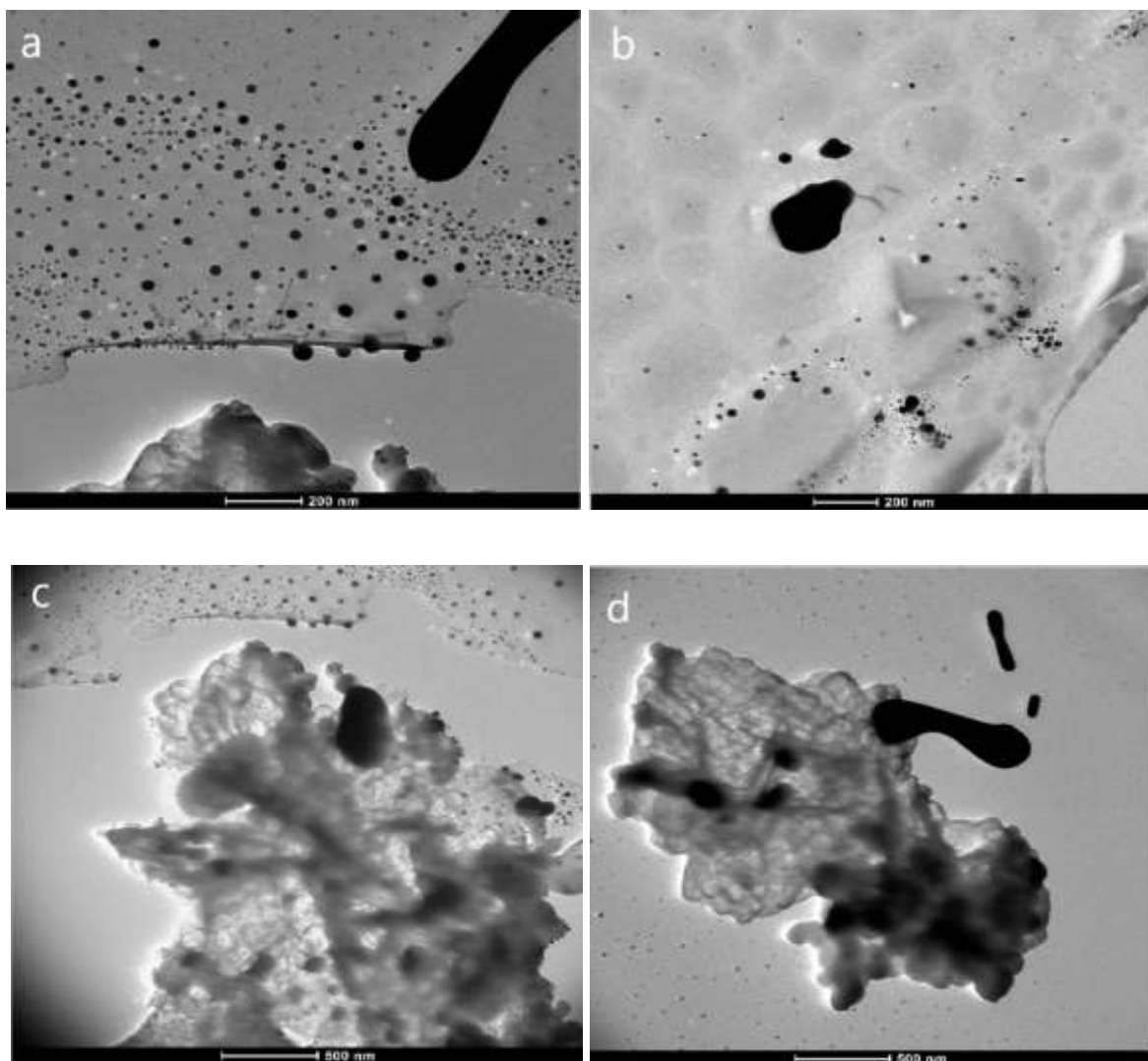


Nota. La gráfica muestra el patrón de difracción de rayos X de la muestra mediante un tipo de escaneado continuo, una longitud PSD (20°C) y a una temperatura de 25°C. Los datos del análisis son un promedio de 6 repeticiones continuas por el equipo EMPYREAN, proporcionados por el área de microscopía permitiendo la elaboración propia del gráfico.

La morfología y el tamaño de las nanopartículas de CuI se observan mediante microscopía electrónica de transmisión. En la **Figura 16**, se observa claramente la formación de NPs de forma esférica en la matriz del extracto de taxo y un tamaño que oscila entre 8 y 62 nm según las mediciones del programa FIJI.

Figura 16

Imágenes TEM de las nanoestructuras de CuI

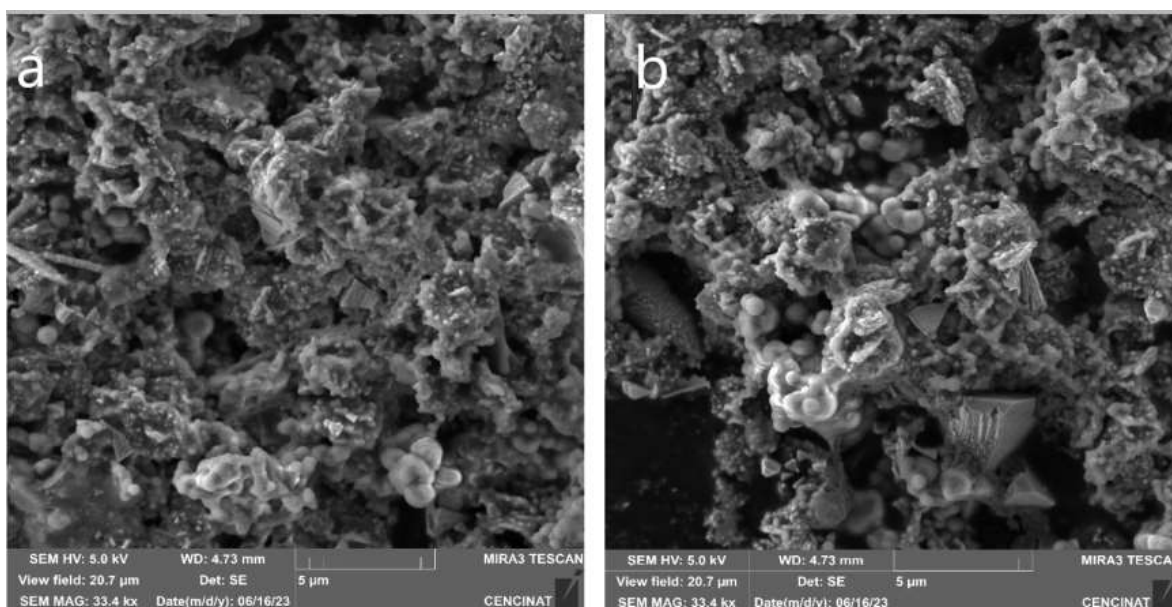


Nota. Las imágenes del TEM muestran las NPs de CuI con forma esférica a diferentes escalas. a y b) 200 nm, c y d) 500 nm.

Mientras que la **Figura 17** muestra la morfología superficial en tres dimensiones de las NPs esféricas de CuI, analizadas mediante microscopio electrónico de barrido (SEM).

Figura 17

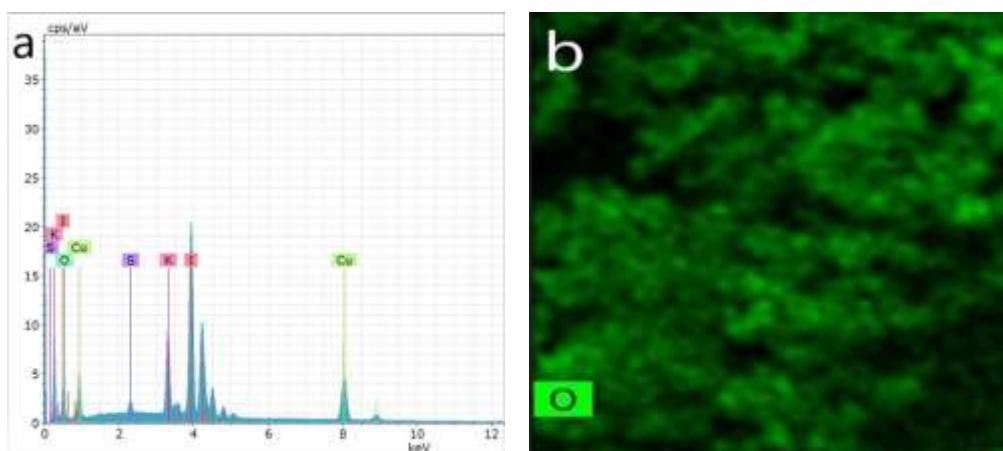
Imágenes SEM de las nanoestructuras de CuI

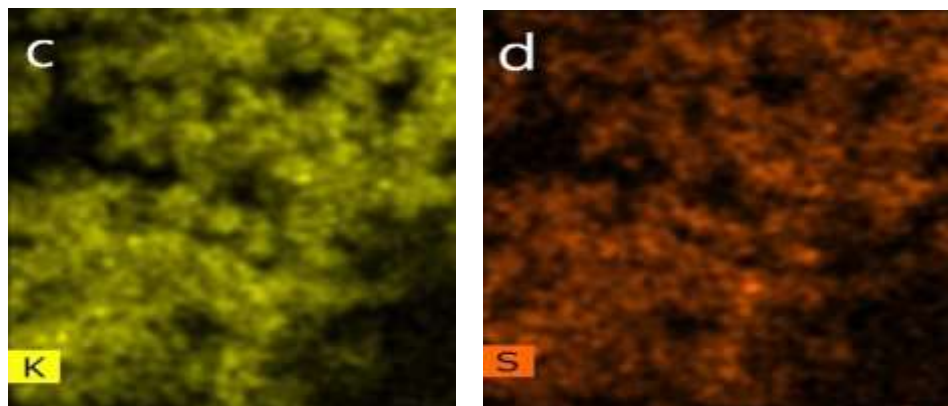


Además, la pureza química de las NPs de CuI sintetizadas con extracto de taxo se analizó mediante estudios SEM/EDS, la **Figura 18** muestra el espectro EDS con la presencia de cobre y yodo. Sin embargo, se evidencia la presencia de otros elementos como; O, K y S.

Figura 18

Espectro SEM/EDS y mapeo elemental de nanopartículas de CuI





Nota. La gráfica evidencia a) la composición de la muestra de las NPs de CuI, b) átomos de oxígeno 8.88%, c) potasio 8.35%, y d) azufre 1.28%. Imágenes proporcionadas por el área de microscopía de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Aislamiento e identificación de microorganismos

Identificación macroscópica y microscópica

El método de muestro por hisopado permitió el aislamiento e identificación de (28) cepas entre bacterias y hongos filamentosos. La **Figura 19** presenta un listado de todos los microorganismos encontrados, a los cuales se les realizó un análisis de frecuencia relativa para determinar las cepas con mayor repetitividad (pintadas de color verde) entre los tres muestreos. Al lado derecho se les colocó una denotación para poder identificarlos a lo largo del estudio, hasta conocer su género y especie, siendo (B) para las bacterias y (H) para los hongos. Finalmente, se les acompaña del número según el orden en el que se encontraron.

Figura 19*Identificación macroscópica de microorganismos aislados*

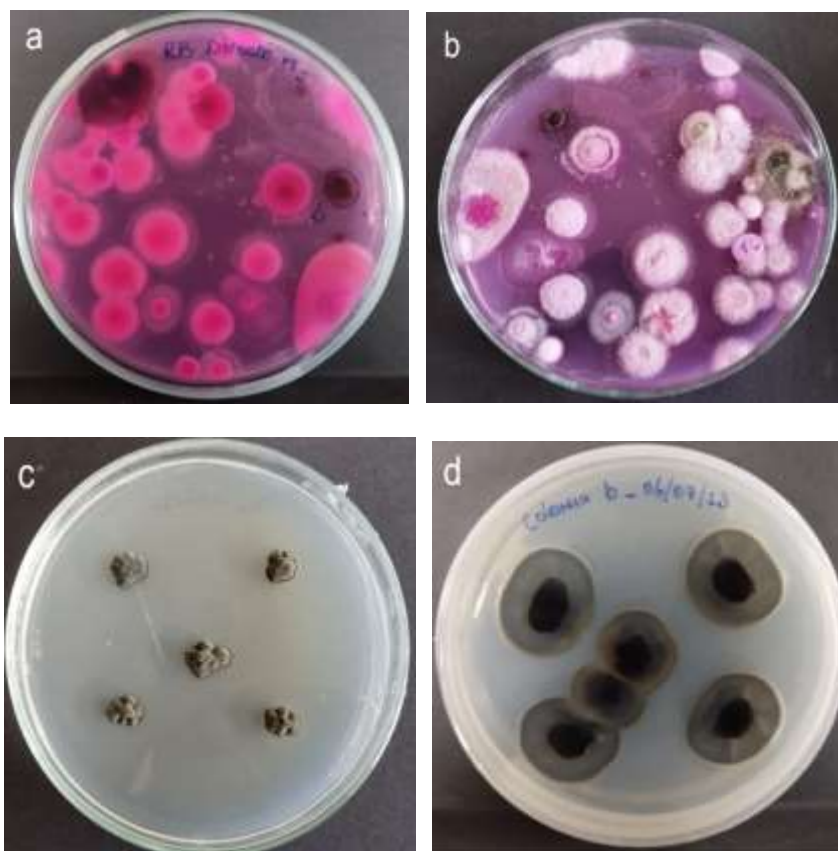
Muestreos	N°	Cepa	Muestreos			Total	Denotacion
			M1	M2	M3		
1	1	A	x	x	x	3	1B
	2	B	x	x	x	3	2B
	3	C	x			1	
	4	D	x	x	x	3	4H
	5	E	x	x	x	3	5H
	6	F	x	x		2	
	7	G	x			1	
	8	H	x			1	
	9	I	x			1	
	10	J	x	x		2	
	11	K	x	x		2	
2	12	a		x		1	
	13	b	x	x	x	3	13H
	14	c		x		1	
	15	d		x		1	
	16	e		x		1	
3	17	1		x		1	
	18	2	x	x	x	3	18H
	19	3		x		1	
	20	4			x	1	
	21	5			x	1	
	22	6			x	1	
	23	7			x	1	
	24	8			x	1	
	25	9			x	1	
	26	10			x	1	
	27	11			x	1	
	28	12	x	x	x	3	28H
Total		28					

Nota. La imagen representa la identificación de cepas por cada muestreo. Las colonias denotadas por letras mayúsculas del abecedario fueron provenientes de cajas con medio PDA (directo o por dilución) del primer muestreo (M1) las denotadas con letras minúsculas (M2) y los números cardinales (M3). Mediante el número de repeticiones se escogieron las colonias más predominantes (pintadas con verde pastel) y su denotación final. Elaboración propia.

Adicionalmente la **Figura 20**, evidencia un ejemplo del proceso de aislamiento e identificación que se realizó con todas las colonias, encontradas por siembra directa o por dilución.

Figura 20

Aislamiento y purificación de la colonia predominante (13H)



Nota. Se observan registros fotográficos del proceso de purificación del hongo denotado como “13H” (a y b) se pueden ver diferentes colonias inoculadas directamente en caja Petri con medio RB; frontal (derecha) y reverso (izquierda), (c y d) aislamiento y purificación en medio PDA.

Identificación molecular

Se logró identificar mediante secuenciación masiva NGS solamente las bacterias, los hongos no se obtuvieron sus secuencias debido a un retraso en los resultados por la empresa

BioSequence, por lo que se continúa el estudio con las denotaciones iniciales para los hongos (4, 5, 13, 18 y 28) H. Las secuencias proporcionadas por la empresa BioSequence y su posterior análisis bioinformático dieron como resultado que las bacterias (1 y 2) B fueron identificadas a nivel de género y especie como *Ralstonia pickettii* (**Tabla 2**) y *Pseudomonas azotoformans* (**Tabla 3**) respectivamente.

Las **Figura 21 y 22** muestran los árboles filogenéticos obtenidos en el programa MEGA para las bacterias 1B y 2B donde se observa los 10 microorganismos con mayor similitud encontrados mediante el BLAST para las bacterias 1B y 2 B respectivamente. Se observan los clados derivados a partir del análisis con la herramienta MUSCLE, donde la bacteria 1B posee la mayor relación con *Ralstonia pickettii* y la bacteria 2B posee la mayor relación con *Pseudomonas azotoformans*, confirmando su identificación molecular. Los números encontrados al lado de cada nodo del clúster se relacionan con los valores de bootstrap realizados con 1000 repeticiones y las ramas corresponden a microorganismos con el 100% de similitud, respectivamente.

Tabla 2

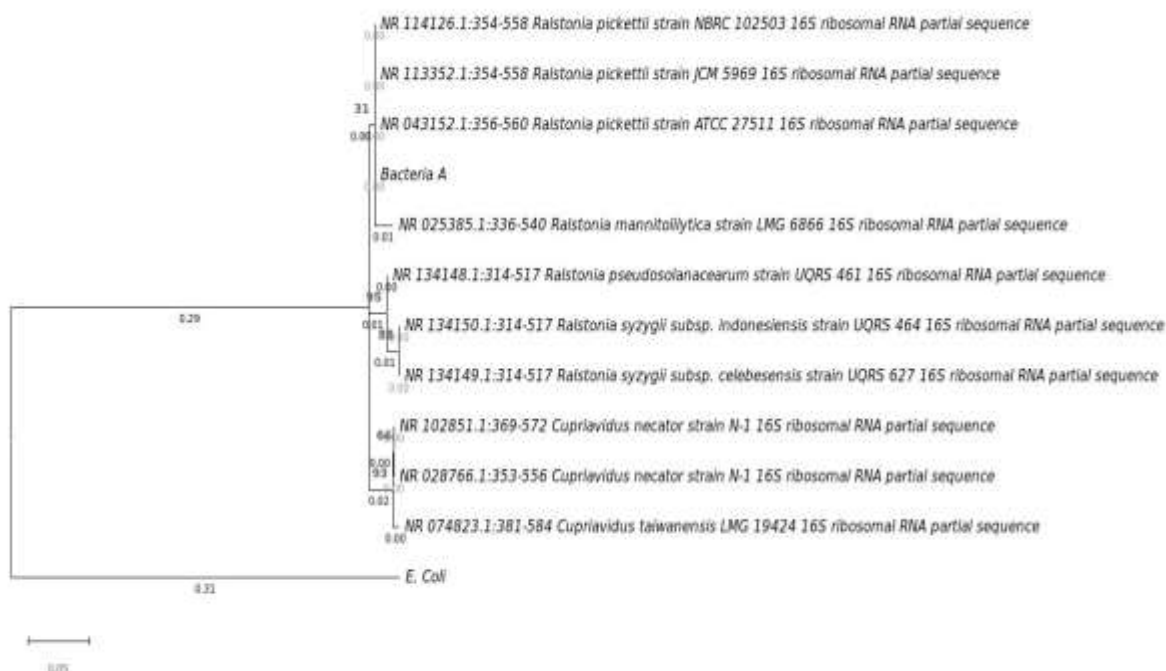
Primeros 10 microorganismos con mayor similitud para la bacteria 1B: Ralstonia pickettii

Organismos más próximos	Cobertura de consulta (%)	Porcentaje de identidad (%)	Número de acceso
<i>Ralstonia pickettii</i> strain NBRC 102503 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	100.0	NR_114126.1
<i>Ralstonia pickettii</i> strain JCM 5969 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	100.0	NR_113352.1
<i>Ralstonia pickettii</i> strain ATCC 27511 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	100.0	NR_043152.1
<i>Ralstonia mannitolilytica</i> strain LGM 6866 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	98.54	NR_025385.1

Organismos más próximos	Cobertura de consulta (%)	Porcentaje de identidad (%)	Número de acceso
<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> strain UQRS 461 34616S ribosomal RN346A, partial sequence	99	98.04	NR_134148.1
<i>Cupriavidus necator</i> strain N-1 16S ribosomal RNA, partial sequence	99	97.55	NR_102851.1
<i>Cupriavidus necator</i> strain N-1 16S ribosomal RNA, partial sequence	99	97.55	NR_028766.1
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG 19424 16S ribosomal RNA, partial sequence	99	97.06	NR_074823.1
<i>Ralstonia syzggii</i> subsp. Indonesiensis strain UQRS 464 16S ribosomal RNA, partial sequence	99	97.06	NR_134150.1
<i>Ralstonia syzggii</i> subsp. celebesensis strain UQRS 627 16S ribosomal RNA, partial sequence	99	97.06	NR_134149.1

Figura 21

Árbol filogenético para la Bacteria 1B: *Ralstonia pickettii*



Nota. El árbol refleja la posición de la Bacteria 1B denominada como (A) frente a otros microorganismos similares en cuanto a la secuencia parcial.

Tabla 3

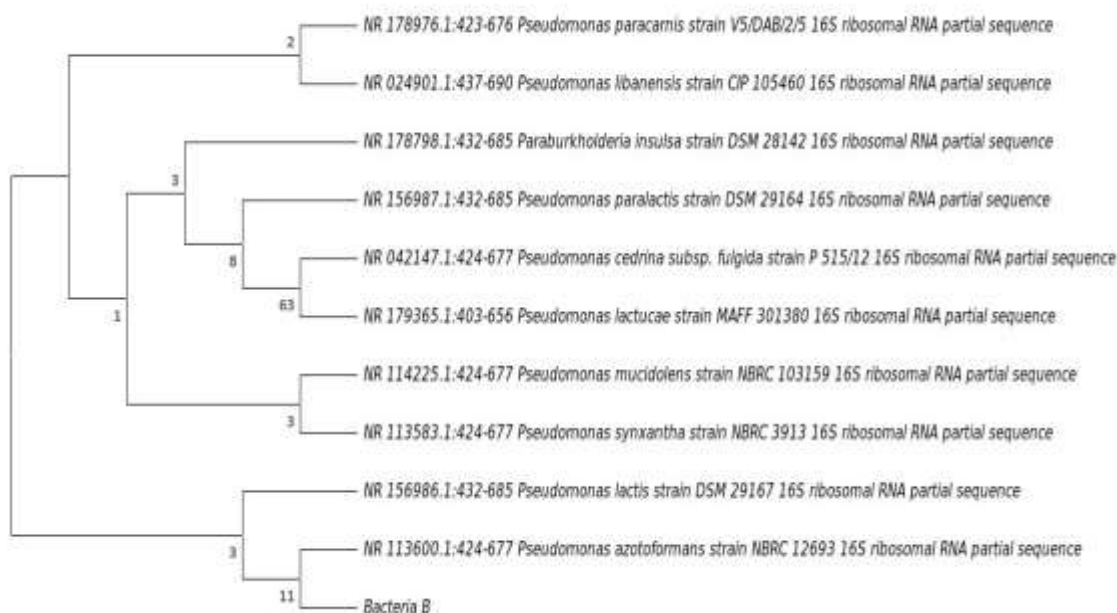
Primeros 10 microorganismos con mayor similitud para 2B: *Pseudomonas azotoformans*

Organismos más próximos	Cobertura de consulta (%)	Porcentaje de identidad (%)	Numero de Acceso
<i>Pseudomonas azotomorfans</i> strain NBRC 12693 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	99.21	NR_113600.1
<i>Pseudomonas paracarnis</i> strain VS/DAB/2/5 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	99.21	NR_1789761
<i>Paraburkholderia insulsa</i> strain DSM 28142 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	99.21	NR_178798.1

Organismos más próximos	Cobertura de consulta (%)	Porcentaje de identidad (%)	Numero de Acceso
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	99.21	NR_156987.1
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	99.21	NR_156986.1
<i>Pseudomonas libanensis</i> strain CIP 10546016S ribosomal RN346A, partial sequence	100	99.21	NR_024901.1
<i>Pseudomonas mucidolens</i> strain NBRC 103159 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	99.21	NR_114225.1
<i>Pseudomonas synxantha</i> strain NBRC 3913 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	99.21	NR_113583.1
<i>Pseudomonas cedrina subsp fulgida</i> strain P 515/1216S ribosomal RNA, partial sequence	100	98.82	NR_042147.1
<i>Pseudomonas lactucae</i> strain MAFF 301380 16S ribosomal RNA, partial sequence	100	98.82	NR_179365.1

Figura 22

Árbol filogenético para la Bacteria 2B: *Pseudomonas azotoformans*



Nota. El árbol refleja la posición de la Bacteria 2B denominada como (B) frente a otros microorganismos similares en cuanto a la secuencia parcial.

Aplicación de nanopartículas

Evaluación de la actividad antimicrobiana

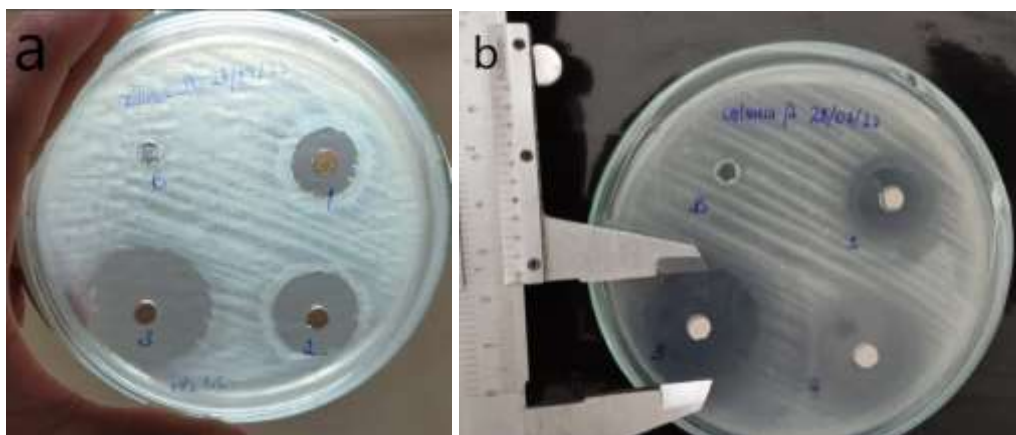
El estudio de la actividad antimicrobiana de las NPs de CuI a diferentes concentraciones (baja, media y alta) contra dos cepas bacteriana Gram negativas *Ralstonia pickettii* y *Pseudomonas azotoformans* mediante el método de difusión en pozo se comprobó mediante la medición de los diámetros de los halos de inhibición.

La **Figura 23** muestra correctamente la formación de los halos de inhibición de la bacteria 1B frente a las tres concentraciones de las NPs. Sin embargo, para la bacteria 2B, presentado en la **Figura 24**, se evidencia el crecimiento solamente cerca del pocillo “blanco” a

partir de los dos inóculos. Sin embargo, frente a las concentraciones no se ve claramente la formación de halos, por lo que no se puede medir los diámetros y se asume una inhibición total.

Figura 23

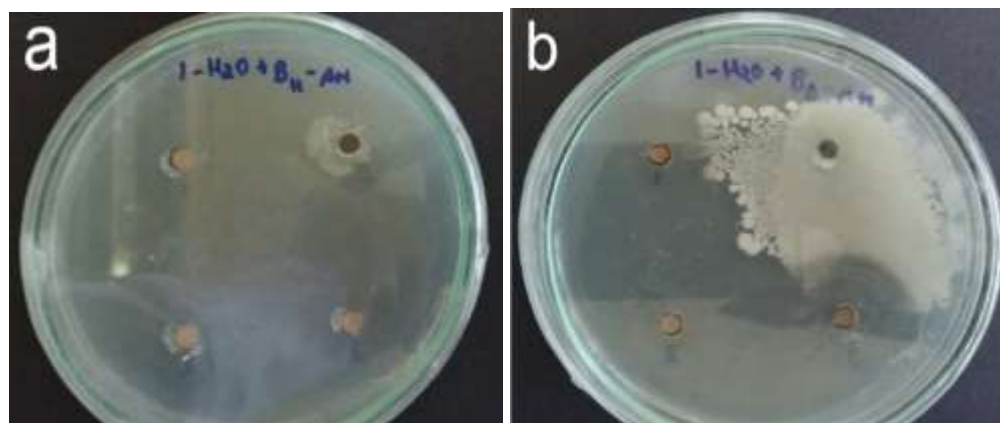
Halos de inhibición en la bacteria Ralstonia pickettii



Nota. Las imágenes representan los halos de inhibición a 24 horas desde la aplicación de las NPs de Cul al reverso de la caja Petri. a) en contra luz y b) medición en mm de los halos de inhibición con el instrumento “Pie de rey”

Figura 24

Halos de inhibición frente a la bacteria Pseudomonas azotoformans

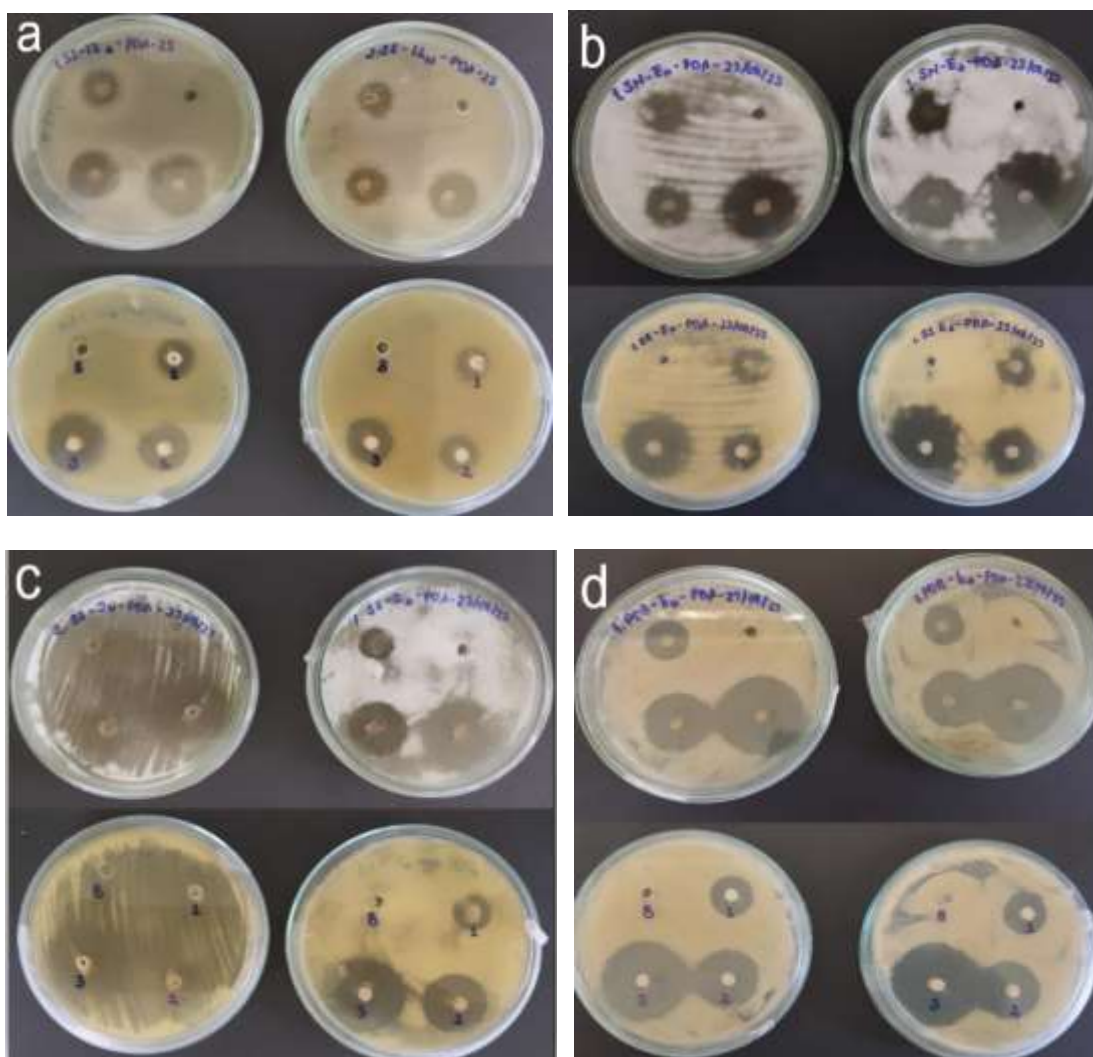


Nota. La imagen representa la inhibición del crecimiento de la bacteria 2B frente a las NPs desde la concentración más baja, ya que existe crecimiento solamente en el primer pocillo control.

En el caso de los hongos, se puede observar en la **Figura 25** el registro fotografico con las mejores imágenes tomadas a 3 días de la aplicación de las NPs en donde se puede ver el crecimiento de los diferentes microorganismos y a su vez, los halos de inhibicion frente a las diferentes concentraciones se diferencian por lo que se puede llevar una correcta medicion con el instrumento pie de rey. Pero, al igual que en las bacterias, se reporta una complicacion en la medicion de los diametros de inhibicion del hongo denotado como 28H (**ver Figura 26**)

Figura 25

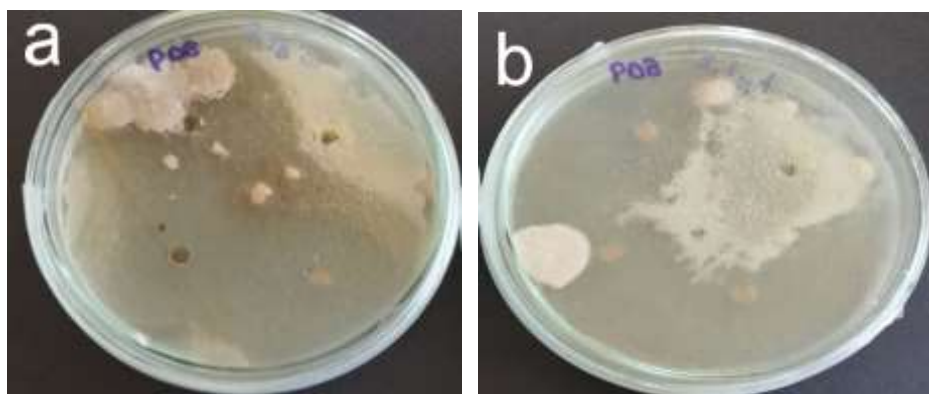
Halos de inhibición en hongos



Nota. Las imágenes representan los halos de inhibición a 72 horas desde la aplicación de las NPs de Cul frente algunos de los hongos en estudio, en cajas con agar PDA. Las fotografías a, b, c y d tomadas de frente y al reverso representan los hongos (4, 5, 13 y 18) H respectivamente.

Figura 26

Halos de inhibición frente al hongo 28H



Nota. La fotografía representa la difícil medición de los diámetros de inhibición del hongo 28H frente a las NPs que puede ser debido a la forma de crecimiento de la cepa. a) método de siembra por hisopo y b) por triángulo.

Cinetica de los halos de inhibición

Bacteria 1B: Ralstonia pickettii

La **Tabla 4** muestra el diámetro promedio y la desviación estándar ajustada por concentración y luego por día, a partir del matriz ejemplo representada en la **Figura 12** con las mediciones durante 6 días por triplicado de la bacteria 1B, además se pintan los valores mayores de la tercera concentración por ser estadísticamente diferente con las otras dos medias (media y baja).

Además, la tabla muestra el método de siembra a partir del inóculo del que proviene, donde; (CN-H) se relaciona con el método de siembra por hisopo proveniente del caldo nutritivo, (CN-T) con el método de siembra por triángulo proveniente del caldo nutritivo, (SB-H) método de siembra por hisopo proveniente de la solución bacteriana y (SB-T) método de siembra por triángulo proveniente solución bacteriana.

Tabla 4

Medias y desviación estándar de los halos de inhibición medidos a bacteria Ralstonia pickettii

Cepa	[NPs CuI]	Método de siembra e inoculación	Diametro promedio (mm)	Desviacion estandar
1B	1	CN-H	15,568	0,45
	2		25,071	0,269
	3		37,812	0,289
	1	CN-T	17,417	0,748
	2		26,589	0,33
	3		34,252	0,162
	1	SB-H	22,656	0,753
	2		32,893	0,156
	3		41,326	4,454
	1	SB-T	13,786	1,926
	2		27,518	2,093
	3		33,812	3,905

Nota. La tabla representa el diametro promedio y sus desviaciones estandar encontradas de las mediciones a los halos de inhibicion por cada concentracion durante seis dias, los datos marcados en color verde pastel reflejan el mayor valor, es decir, de la concentracion mayor.

Elaboracion propia

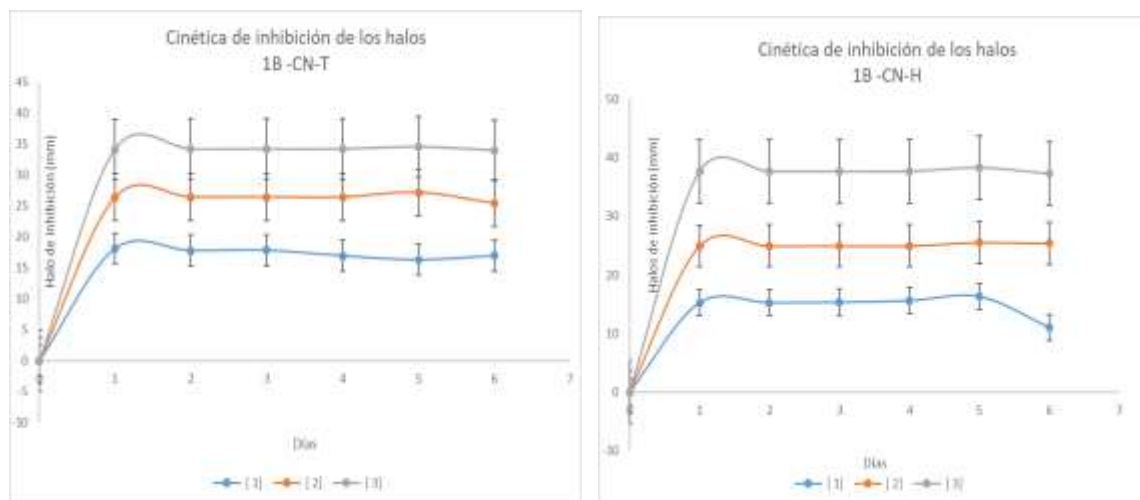
Existen diferencias significativas entre los valores promedio de los diametros de inhibicion para los diferentes tratamientos respecto a cada factor, ya que los valores p-valores son menores al nivel de significancia ($\alpha=0.05$). Por lo tanto, se establece que la relacion entre los factores; “Concentraciones de NPs CuI” y “Cepa bacterianas” son estadisticamente significativo tanto para los ensayos realizados con caldo nutritivo y solucion bacteriana **(Apendice 3)**.

Adicionalmente, la **Figura 27** muestra la cinetica de los diametros de inhibicion de los halos a lo largo de 6 dias, a partir del inoculo con caldo nutritivo por hisopo (CN-H) y por

triangulo (CN-T). Mientras que la **Figura 28** es a partir de la solución bacteriana por hisopo (SB-H) y por triangulo (SB-T).

Figura 27

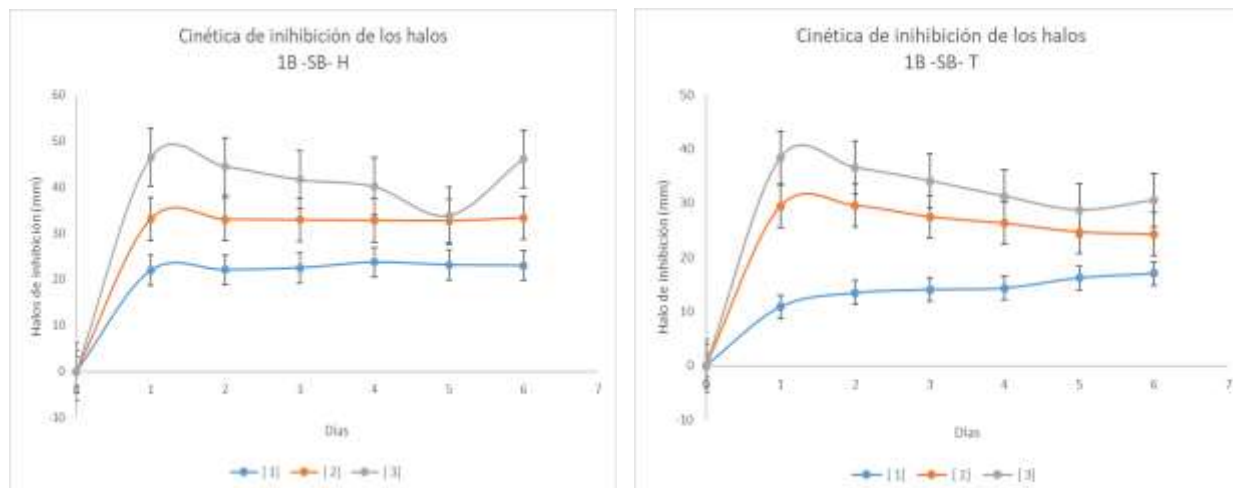
*Diámetro de los halos de inhibición de la bacteria *Ralstonia pickettii* a partir de caldo nutritivo*



Nota. 1B-CN-T= Bacteria 1B metodo de siembra por triangulo a partir de caldo nutritivo. 1B-CN-H= Bacteria 1B metodo de siembra por hisopo a partir de caldo nutritivo.

Figura 28

*Diámetro de los halos de inhibición de la bacteria *Ralstonia pickettii* a partir de solución bacteriana*



Nota. 1B-SB-H= Bacteria 1B metodo de siembra por hisopo a partir de solución bacteriana. 1B-SB-T= Bacteria 1B metodo de siembra por triangulo a partir de solución bacteriana.

Hongo 4H

La **Tabla 5** muestra el diámetro promedio y la desviación estándar ajustada por concentración y luego por día, con las mediciones durante 6 días por triplicado del hongo 4H, además se pintan los valores mayores de la tercera concentración por ser estadísticamente diferente con las otras dos medias (media y baja).

Además, la tabla muestra el método de siembra a partir del inóculo del que proviene, donde; (PDB-H) se relaciona con el método de siembra por hisopo proveniente del caldo PDB, (PDB-T) con el método de siembra por triangulo proveniente del caldo PDB, (SE-H) método de siembra por hisopo proveniente de la solución esporas y (SE-T) método de siembra por triangulo proveniente solución de esporas.

Tabla 5

Medias y desviación estándar de los halos de inhibición medidos del hongo 4H

Cepa	[NPs Cul]	Método de siembra e inoculación	Diametro promedio (mm)	Desviacion estandar
4H	1	PDB-H	10,99	1,168373513
	2		14,29	3,385837661
	3		20,8557143	2,347035719
	1	PDB-T	12,5142857	1,190747664
	2		17,2014286	2,72306751
	3		24,4214286	2,500691238
	1	SE-H	12,8985714	1,885644894
	2		16,5785714	2,066614784
	3		22,5157143	3,232957882
	1	SE-T	12,8285714	2,128057017
	2		21,9057143	2,136236566
	3		34,0283333	1,322095559

Nota. La tabla representa el diametro promedio y sus desviaciones estandar encontradas de las mediciones a los halos de inhibicion por cada concentracion durante seis dias, los datos marcados en color verde pastel reflejan el mayor valor, es decir, de la mayor concentracion.

Elaboracion propia

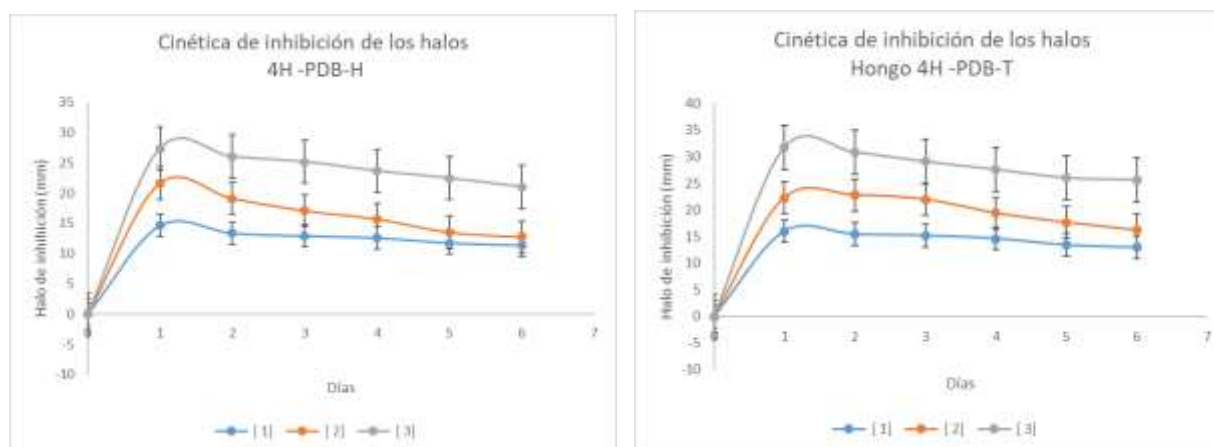
Existen diferencias significativas entre los valores promedio de los diametros de inhibicion para los diferentes tratamientos respecto a cada factor, ya que los valores p-valores son menores al nivel de significancia ($\alpha=0.05$). Por lo tanto, se establece que la relacion entre los factores; “Concentraciones de NPs Cul” y “Cepa bacterianas” son estadisticamente significativo tanto para los ensayos realizados con caldo PDB y solucion de esporas (SE)

(Apendice 4).

Adicionalmente, la **Figura 29** muestra la cinetica de los diametros de inhibicion de los halos a lo largo de 6 dias, a partir del inoculo con caldo PDB por hisopo (PDB-H) y por triangulo (PDB-T). Mientras que la **Figura 30** es a partir de la solucion de esporas por hisopo (SE-H) y por triangulo (SE-T).

Figura 29

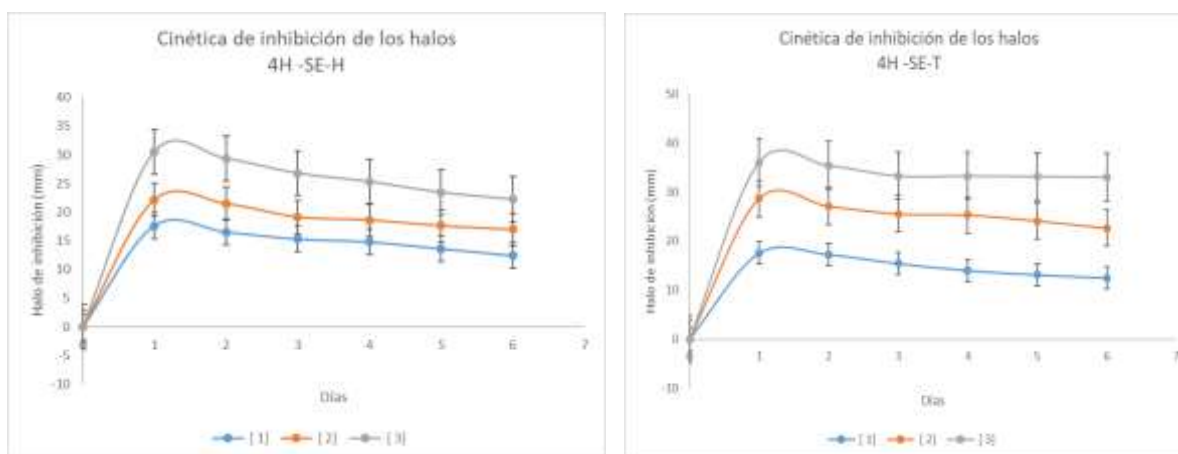
Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 4H a partir de caldo PDB



Nota. 4H-PDB-H= Hongo 4H método de siembra por hisopo a partir de caldo nutrient broth (PDB). 4H-PDB-T = Hongo 4H método de siembra por triangulo a partir de caldo nutrient broth (PDB).

Figura 30

Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 4H a partir de solución de espora



Nota. 4H-SE-H= Hongo 4H método de siembra por hisopo a partir de caldo solución de esporas. 4H-SE-T = Hongo 4H método de siembra por triangulo a partir de caldo solución de esporas.

Hongo 5H

La **Tabla 6** muestra el diámetro promedio y la desviación estándar ajustada por concentración y luego por día, con las mediciones durante 6 días por triplicado del hongo 5H, además se pintan los valores mayores de la tercera concentración por ser estadísticamente diferente con las otras dos medias (media y baja).

Además, la tabla muestra el método de siembra a partir del inóculo del que proviene, donde; (PDB-H) se relaciona con el método de siembra por hisopo proveniente del caldo PDB, (PDB-T) con el método de siembra por triángulo proveniente del caldo PDB, (SE-H) método de siembra por hisopo proveniente de la solución esporas y (SE-T) método de siembra por triángulo proveniente solución de esporas.

Tabla 6

Medias y desviación estándar de los halos de inhibición medidos a la hongo 5H

Cepa	[NPs CuI]	Método de siembra e inoculación	Diametro promedio (mm)	Desviacion estandar
5H	1	PDB-H	10,3528571	4,84373995
	2		14,8757143	6,64903226
	3		21,9228571	11,0433684
	1	PDB-T	9,85857143	6,22150598
	2		12,9285714	7,66870176
	3		19,3542857	12,9790647
	1	SE-H	10,9671429	5,55422992
	2		13,9157143	6,35313702
	3		17,0171429	8,94682886
	1	SE-T	10,4214286	4,20611658
	2		13,5202857	6,11471411
	3		20,43	8,11030394

Nota. La tabla representa el diámetro promedio y sus desviaciones estandar encontradas de las mediciones a los hablos de inhibicion por cada concentracion durante seis dias, los datos marcados en color verde pastel reflejan el mayor valor, es decir, de la mayor concentracion. Elaboracion propia

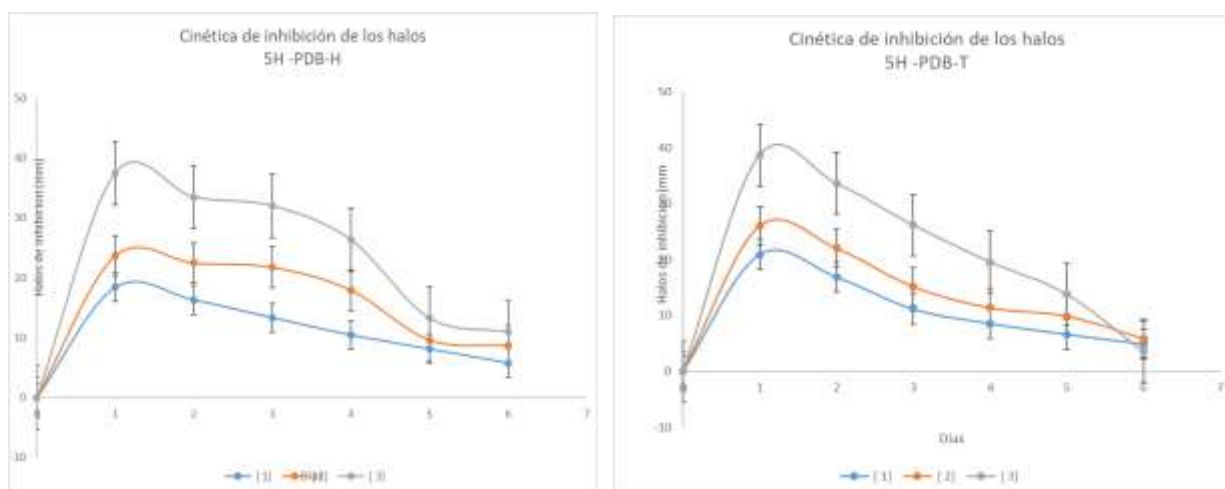
Existen diferencias significativas entre los valores promedio de los diámetros de inhibición para los diferentes tratamientos respecto a cada factor, ya que los valores p-valores

son menores al nivel de significancia ($\alpha=0.05$). Por lo tanto, se establece que la relacion entre los factores; “Concentraciones de NPs CuI” y “Cepa bacterianas” son estadisticamente significativo tanto para los ensayos realizados con caldo PDB y solucion de esporas (**Apendice 5**).

Adicionalmente, la **Figura 31** muestra la cinetica de los diametros de inhibicion de los halos a lo largo de 6 dias, a partir del inoculo con caldo PDB por hisopo (PDB-H) y por triangulo (PDB-T). Mientras que la **Figura 32** es a partir de la solucion de esporas por hisopo (SE-H) y por triangulo (SE-T).

Figura 31

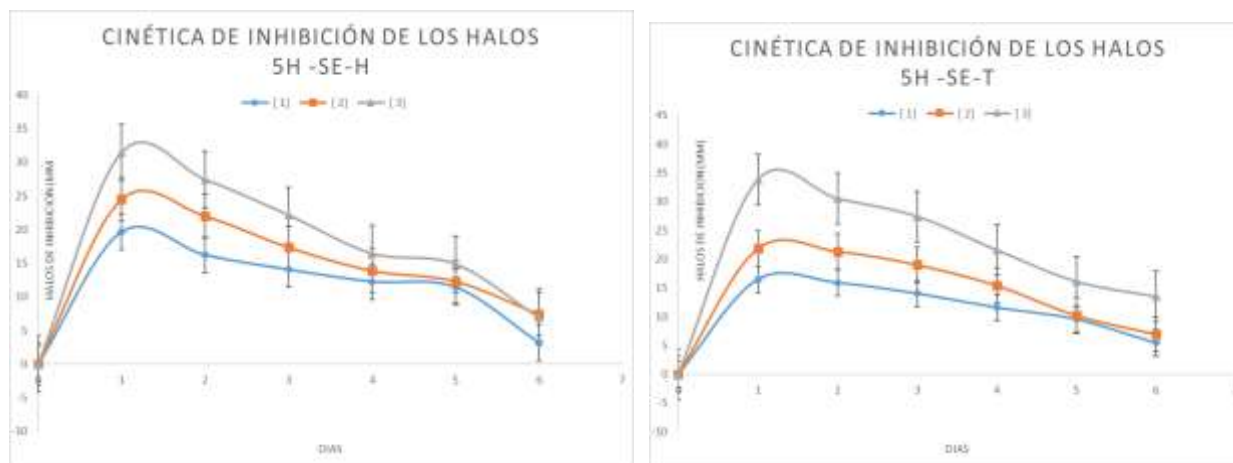
Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 5H a partir de caldo PDB



Nota. 5H-PDB-H= Hongo 5H con método de siembra por hisopo a partir de caldo nutrient broth (PDB). H-PDB-T = Hongo 5H método de siembra por triangulo a partir de caldo nutrient broth (PDB).

Figura 32

Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 5H a partir de solución de espora



Nota. 5H-SE-H= Hongo 5H método de siembra por hisopo a partir de caldo solución de esporas. 5H-SE-T = Hongo 5H método de siembra por triangulo a partir de caldo solución de esporas.

Hongo 13H

La **Tabla 7** muestra el diámetro promedio y la desviación estándar ajustada por concentración y luego por día, con las mediciones durante 6 días por triplicado del hongo 13H, además se pintan los valores mayores de la tercera concentración por ser estadísticamente diferente con las otras dos medias (media y baja).

Además, la tabla muestra el método de siembra a partir del inóculo del que proviene, donde; (PDB-H) se relaciona con el método de siembra por hisopo proveniente del caldo PDB, (PDB-T) con el método de siembra por triangulo proveniente del caldo PDB, (SE-H) método de siembra por hisopo proveniente de la solución esporas y (SE-T) método de siembra por triangulo proveniente solución de esporas.

Tabla 7

Medias y desviaciones estándar de los halos de inhibición medidos del hongo 13H

Cepa	[NPs CuI]	Método de siembra e inoculación	Diametro promedio (mm)	Desviacion estandar
13H	1	PDB-H	13,7557143	1,37671953
			20,345	1,93871199
			27,1	4,25558535
	2	PDB-T	12,2457143	1,25402419
			15,0135714	2,67508396
			21,6057143	3,60827059
	3	SE-H	9,01428571	0,53141007
			17,3535714	3,65248876
			19,7321429	2,06237585
	1	SE-T	11,9164286	1,26722038
			16,8771429	2,31165525
			21,8264286	1,42720852

Nota. La tabla representa el diametro promedio y sus desviaciones estandar encontradas de las mediciones a los halos de inhibicion por cada concentracion durante seis dias, los datos marcados en color verde pastel reflejan el mayor valor, es decir, de la mayor concentracion.

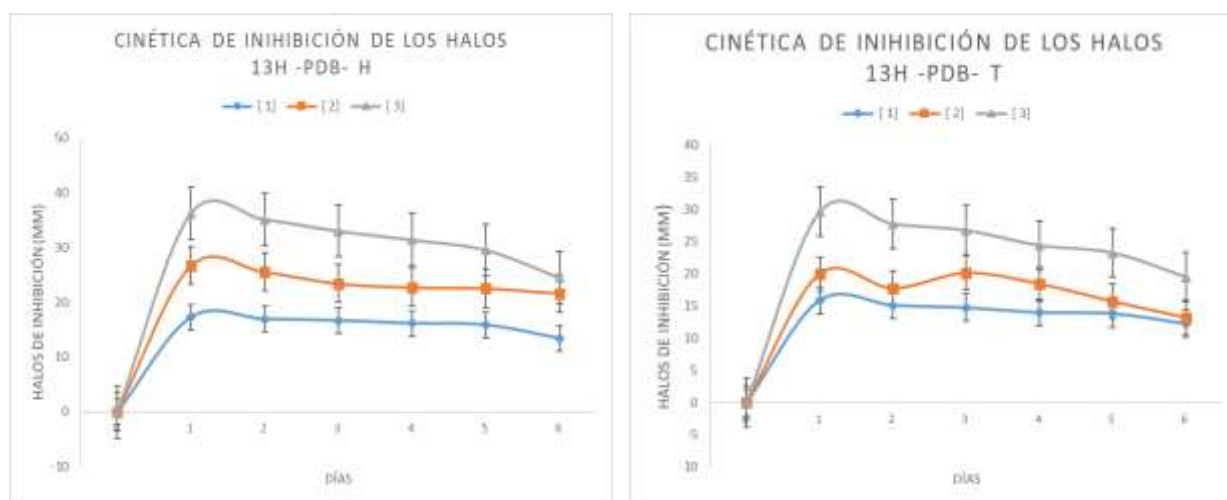
Elaboracion propia

Existen diferencias significativas entre los valores promedio de los diametros de inhibicion para los diferentes tratamientos respecto a cada factor, ya que los valores p-valores son menores al nivel de significancia ($\alpha=0.05$). Por lo tanto, se establece que la relacion entre los factores; “Concentraciones de NPs CuI” y “Cepa bacterianas” son estadisticamente significativo tanto para los ensayos realizados con caldo PDB y solucion de esporas (**Apendice 6**).

Adicionalmente, la **Figura 33** muestra la cinetica de los diametros de inhibicion de los halos a lo largo de 6 dias, a partir del inoculo con caldo PDB por hisopo (PDB-H) y por triangulo (PDB-T). Mientras que la **Figura 34** es a partir de la solucion de esporas por hisopo (SE-H) y por triangulo (SE-T).

Figura 33

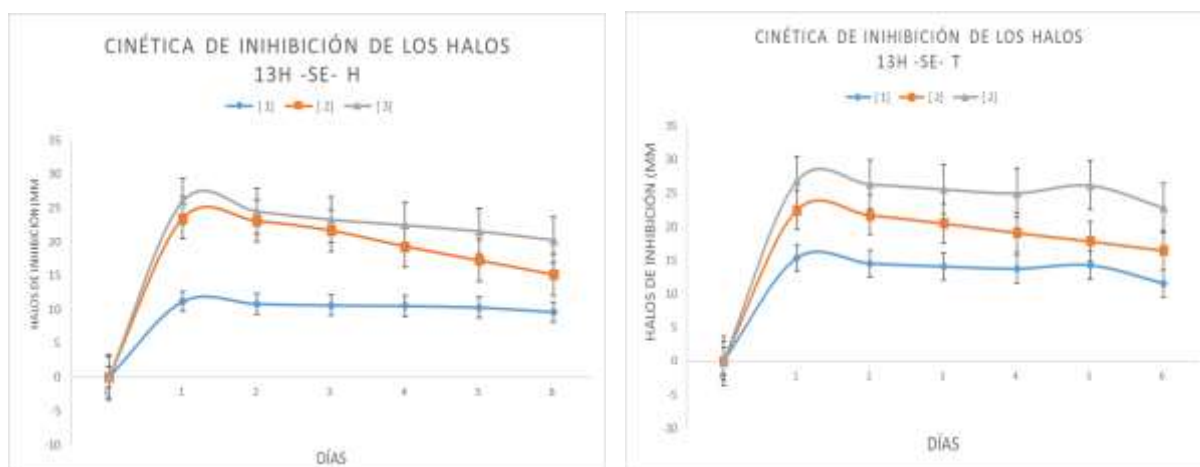
Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 13H a partir de caldo PDB



Nota. 13H-PDB-H= Hongo 13H con método de siembra por hisopo a partir de caldo nutrient broth (PDB). 13H-PDB-T = Hongo 13H método de siembra por triangulo a partir de caldo nutrient broth (PDB).

Figura 34

Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 13H a partir de solución de espora



Nota. 13H-SE-H= Hongo 13H con método de siembra por hisopo a partir de solución de esporas (SE). 13H-SE-T = Hongo 13H método de siembra por triangulo a partir de solución de solución de esporas (SE)

Hongo 18H

La **Tabla 8** muestra el diámetro promedio y la desviación estándar ajustada por concentración y luego por día, con las mediciones durante 6 días por triplicado del hongo 18H, además se pintan los valores mayores de la tercera concentración por ser estadísticamente diferente con las otras dos medias (media y baja).

Además, la tabla muestra el método de siembra a partir del inóculo del que proviene, donde; (PDB-H) se relaciona con el método de siembra por hisopo proveniente del caldo PDB, (PDB-T) con el método de siembra por triangulo proveniente del caldo PDB, (SE-H) método de siembra por hisopo proveniente de la solución esporas y (SE-T) método de siembra por triangulo proveniente solución de esporas.

Tabla 8

Medias y desviación estándar de los halos de inhibición medidos del hongo 18H

Cepa	[NPs Cu]	Método de siembra e inoculación	Diametro promedio (mm)	Desviacion estandar
18H	1	PDB-H	9,76142857	0,86506454
	2		14,1974286	1,25136272
	3		17,845	2,59001046
	1	PDB-T	12,3738571	0,81057274
	2		16,4814286	0,78848378
	3		22,5492857	1,63982545
	1	SE-H	15,16	1,23147608
	2		19,3947619	0,38582907
	3		27,6680952	0,30170933
	1	SE-T	12,0428571	0,30512657
	2		18,3514286	0,91248866
	3		24,452381	0,34574022

Nota. La tabla representa el diámetro promedio y sus desviaciones estandar encontradas de las mediciones a los hablos de inhibicion por cada concentracion durante seis dias, los datos

marcados en color verde pastel reflejan el mayor valor, es decir, de la mayor concentración.

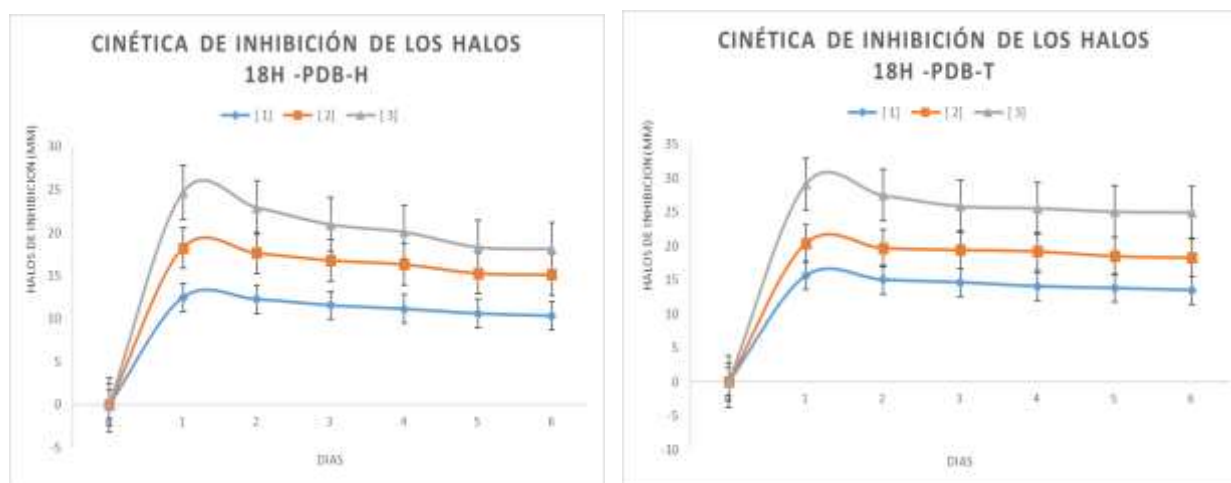
Elaboración propia

Existen diferencias significativas entre los valores promedio de los diámetros de inhibición para los diferentes tratamientos respecto a cada factor, ya que los valores p-valores son menores al nivel de significancia ($\alpha=0.05$). Por lo tanto, se establece que la relación entre los factores; “Concentraciones de NPs CuI” y “Cepa bacterianas” son estadísticamente significativo tanto para los ensayos realizados con caldo PDB y solución de esporas (**Apendice 7**).

Adicionalmente, la **Figura 35** muestra la cinética de los diámetros de inhibición de los halos a lo largo de 6 días, a partir del inóculo con caldo PDB por hisopo (PDB-H) y por triángulo (PDB-T). Mientras que la **Figura 36** es a partir de la solución de esporas por hisopo (SE-H) y por triángulo (SE-T).

Figura 35

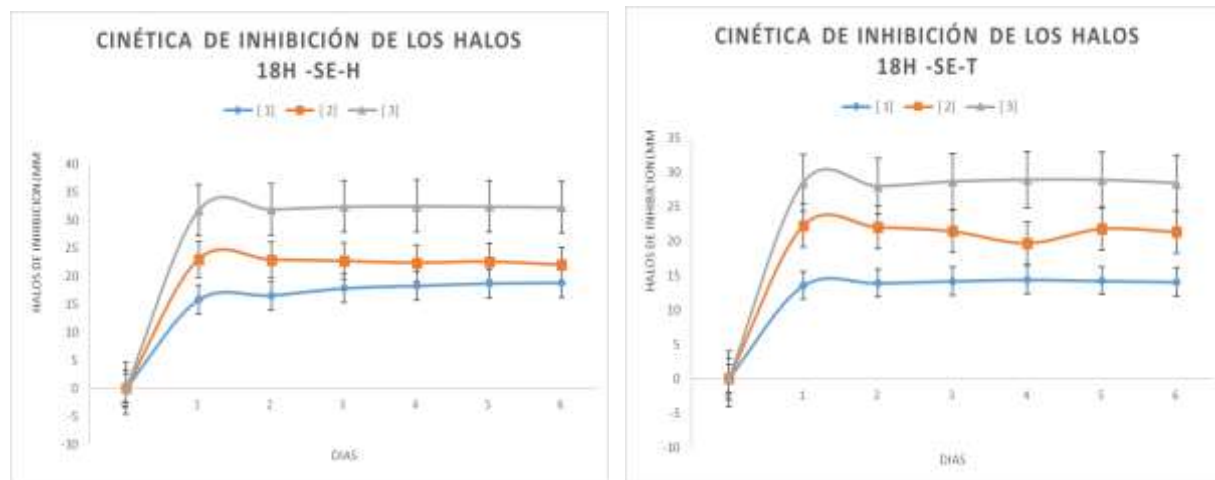
Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 18H a partir de caldo PDB



Nota. 18H-PDB-H= Hongo 18H con método de siembra por hisopo a partir de caldo nutrient broth (PDB). 18H-PDB-T = Hongo 18H método de siembra por triángulo a partir de caldo nutrient broth (PDB).

Figura 36

Diámetro de los halos de inhibición del hongo denotado como 18H a partir de solución de esporas



Nota. 18H-SE-H= Hongo 18H con método de siembra por hisopo a partir de solución de esporas (SE). 18H-SE-T = Hongo 18H método de siembra por triangulo a partir de solución de solución de esporas (SE)

Capítulo V: Discusión

El extracto de taxo utilizado en la síntesis verde de nanopartículas del presente proyecto, juega un papel importante en la estabilidad de las mismas, debido a que los polifenoles actúan como agentes antioxidantes en la reacción. Es decir, estos son los responsables de atrapar los radicales libres mediante la actividad quelante de los metales. Esto se corrobora con lo mencionado por Bisbal Serra et al. (2020) en que los iones de metales de transición como el cobalto, el cobre y el magnesio pueden dar como resultado compuestos estables al ser quelados por acción de polifenoles.

En cuanto a la caracterización de las nanopartículas de yoduro de cobre, el tamaño promedio encontrado por TEM y SEM fue de 35 nm, con una morfología esférica como en los estudios de (Safaei-Ghomi et al., 2013), (Mallick et al., 2019) y (Abass et al., 2020), este último utiliza un protocolo similar, pero a partir del extracto del zumo de granada y adiciona el análisis FTIR el cual ayuda a conocer más detalladamente la influencia del extracto como agente reductor y estabilizador debido a que recubre las nanopartículas evitando que se aglomeren. Si regresamos a nuestros resultados, las imágenes obtenidas por TEM, evidencian que las nanopartículas se encuentran por separado en la matriz del taxo, por lo que serían estables. Además, (Abdel-Mohsen et al., 2013) en su estudio de "Actividad antibacteriana" comenta que las NPs recubiertas, demuestran actividad antibacteriana en comparación con las NPs sin recubrimiento, por lo que la actividad antibacteriana también se confirmaría posteriormente con los resultados en los halos de inhibición.

Por otra parte, la aplicación de las nanopartículas frente a las dos bacterias identificadas como Gram negativas por su coloración rosada provocan un efecto inhibitorio en el crecimiento de las mismas, pero, Martínez Carrasco y Vela Jimenez, (2023) estudiaron la actividad biológica del extracto acuoso de las semillas de taxo, exhibiendo una actividad antibacteriana frente a bacterias gram negativas y positivas. Por lo que, las NPs de yoduro de cobre

sintetizadas con el extracto de taxo, posiblemente podría inhibir el crecimiento de alguna bacteria Gram positiva en estudios posteriores.

Los halos de inhibición obtenidos en la mayoría de las cepas más predominantes de la humedad, muestran que existe una correcta difusión de las nanopartículas por el agar y, por ende, un mecanismo de acción que inhibe el crecimiento de los microorganismos. Pramanik et al. (2012) propone que los mecanismos de acción por el que las nanopartículas actúan, podría ser por la liberación de iones y la producción de ROS. Hecho que concuerda con lo mencionado por (Yang et al., 2009) quienes establecen que se debe a que los iones de las nanopartículas activan el oxígeno y producen iones de oxígeno reactivos y radicales hidroxilo, que pueden obstruir la proliferación bacteriana y finalmente, destruir las membranas bacterianas al inducir estrés oxidativo dentro de las células, por lo cual, el estrés oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS) es un aspecto vital de las acciones de las NPs contra las bacterias (Tornoe et al., 2002).

Capítulo VI: Conclusiones

- Las NPs de CuI poseen actividad antimicrobiana sobre los microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media, tanto para bacterias como para hongos.
- Se sintetizó nanopartículas de yoduro de cobre mediante química verde, utilizando sulfato de cobre, yoduro de potasio, extracto de taxo como reductor y estabilizador, confirmando su presencia por la formación de precipitado color café blanquecino.
- La caracterización de las nanopartículas sintetizadas se realizaron mediante las técnicas de UV-vis y DLS, obteniendo una absorbancia de 224 nm y un tamaño hidrodinámico de 35 nm respectivamente.
- La caracterización de nanopartículas mediante técnica TEM permitió conocer su forma esférica y un tamaño que oscila entre 8 y 65 nm.
- Mediante la técnica SEM/EDS se obtuvo la composición elemental de las nanopartículas obtenido como resultado la presencia de oxígeno, azufre, potasio cobre y yodo en un porcentaje de 8.88, 1.28, 8.35, 19.36 y 62.11 % respectivamente.
- Se confirmó la composición estructural de nanopartículas de fase cubica con los picos obtenidos (25.42°, 29.43°, 42.16°, 49.90°, 52.29°, 61.17°, 67.35°, 69.31°, 74.71°, 77.12° y 82.77°) mediante XDR, los cuales coinciden con la base de datos obtenida en el código de referencia (01-082-2111) con un Score de 92% para el Copper Iodide.
- Se realizaron tres muestreos a partir del hormigón de resistencia media ($f'c = 240$ kg/cm²), de los cuales se aislaron 28 colonias diferentes y mediante análisis de densidad relativa y de frecuencia, se escogieron 7 microorganismos más predominantes, 2 bacterias y 5 hongos.
- Se logró identificar mediante técnicas independientes como extracción de ADN y secuenciación NGS a nivel de género y especie, las bacterias *Ralstonia pickettii* y *Pseudomonas azotoformans*.

- La identificación molecular de los hongos no se pudo llevar a cabo debido al retraso en la obtención de resultados de secuenciación por parte de la empresa Biosequence.
- La tabla del test ANOVA refleja que el valor de “F” es menor que el “valor crítico para F”, es decir, que todas las medias en las tres concentraciones son iguales.
- El halo de inhibición es directamente proporcional a la concentración de nanopartículas aplicadas a los microorganismos, es decir, la concentración mayor evidencio la mayor inhibición.
- Los diámetros de los halos de inhibición, frente a las diferentes concentraciones de las nanopartículas, disminuye a lo largo del tiempo, por lo que se puede deber a la inestabilidad de las nanopartículas.

Capítulo VII: Recomendaciones

- Para una mayor y mejor caracterización de nanopartículas, se podría añadir el análisis FTIR para determinar qué biomolécula dentro de las que componen el extracto de taxo, es o son las que ayudan a evitar la aglomeración de nanopartículas y a su vez contribuir con su estabilidad.
- Los estudios que implican la manipulación de microorganismos se debe llevar a cabo con el debido cuidado, ya que, en primer lugar, no se sabe con claridad con qué microorganismo se trabaja y segundo, puede existir la contaminación de los ensayos por lo que implica el retraso en los estudios.
- Los métodos moleculares para la identificación de microorganismos, suelen llevar tiempo, por lo que se recomienda establecer fechas para cumplir a cabalidad los objetivos.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Abass, N. K., Alaubydi, M. A., y Ulwali, R. A. (2020). Preparation, characterization of inorganic copper iodide nanoparticales using pomegranate juice extract and applications against staphylococcus aureus. *Plant Archives*, 20, 2333-2340.
- Abdel-Mohsen, A. M., Hrdina, R., Burgert, L., Abdel-Rahman, R. M., Hasová, M., Smejkalová, D., . . . Aly, A. S. (2013). Antibacterial activity and cell viability of hyaluronan fiber with silver nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1177-1187.
- Adams , R. I., Bhangar, S., Dannemiller, K. C., Eisen, J. A., Fierer, N., Gilbert , J. A., . . . Bibby, K. (2016). Ten questions concerning the microbiomes of buildings. *Building and Environment*, 109, 224-234.
- Aguilera Páramo , L. A. (2021). Identificación molecular de microorganismos aislados en planteles mineros artesanales de Nicaragua. *I+ D TECNOLÓGICO vol*, 17(1), 54-64.
- Alaniz Hernández, M. A. (2023). Nanopartículas de Cobre: Técnicas de síntesis y desarrollo de películas conductoras. *Instituto de Ingeniería y Tecnología*.
- Ali, H. E., y Khairy, Y. (2021). Síntesis, caracterización, relaciones de índice de refracción-banda prohibida y parámetros de no linealidad óptica de nanocompuestos de Cu/PVOH. *Óptica y tecnología láser*, 106736.
- Allahverdiyev, A. M., Kon, K. V., Abamor, E. S., Bagirova, M., y Rafailovich, M. (2011). Coping with antibiotic resistance: Combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert review of anti-infective therapy*, 9(11), 1035-1052.
- Allsopp, D., Seal, K. J., y Gaylarde, C. C. (2004). *Introduction to Biodeterioration*. Cambridge University Press.

- Álvarez, A. (2022). *Aislamiento de microorganismos resistentes a los metales para producción de nanopartículas, provenientes de zonas contaminadas de Guanajuato, México*. Universidad de Guanajuato. Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado.
- Andersen, B., Frisvad, J. C., Sondergaard, I., Rasmussen, I. S., y Larsen, L. S. (2011). Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Applied and environmental microbiology*, 77(12), 4180-4188.
- Aragon Mamani, S. (2020). *Síntesis verde y caracterización de nanopartículas de plata en matriz de arcilla Chak'oy su actividad antimicrobiana en E. Coli ATCC 51813*. UNSAAC.
- Awed, A. S., El-Sayyad, G. S., El-ghandour, A., Hameed, M. F., Maksoud, A., El-Batal, A. I., y Obayya, S. S. (2021). Unveiling antimicrobial activity of metal iodide (CuI, AgI, and PbI₂) nanoparticles: towards biomedical surfaces applications. *Journal of Cluster Science*, 32(1), 1-16.
- Bach, E. E., y Rangel, Á. R. (2005). Biodeterioração de tintas à base de água por fungos. *Exacta*, 3, 79-84.
- Balouiri, M., Sadiki, M., y Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Barbería Roque, L. (2022). *Desarrollo de aditivos antimicrobianos basados en nanopartículas metálicas obtenidas por síntesis verde para su aplicación en recubrimientos*. Universidad Nacional de La Plata.
- Bauz Lara, M. A. (2023). *Síntesis de nanopartículas, utilizando extractos polifenólicos de 5 frutas de Ecuador: Taxo (Passiflora tarminiana V.E.Barney), Naranjilla (Solanum quitoense Lam.) , Maracuyá (Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.) Frutilla (Fragaria*

- chiloensis* L.), *Uvilla*. Quito: Universidad de la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE.
<http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/36121>
- Bermúdez-Medina, J., y Villamil-Rojas, O. A. (2021). Influencia de la nanotecnología en los materiales de construcción para obras civiles.
- Bisbal Serra, J. J., Lloret, J., Lozano Martinez, G., y Fagoaga, C. (2020). Especies vegetales como antioxidantes de alimentos. *Nereis. Revista Interdisciplinaria Iberoamericana de Métodos, Modelación y Simulación.*, 12, 71-90.
https://doi.org/https://doi.org/10.46583/nereis_2020.12.577
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608.
- Brabazon , D., y Raffer, A. (2015). Advanced characterization techniques for nanostructures. *Emerging nanotechnologies for manufacturing (Second Edition)*, 53-85.
- Burgess, J. G., Jordan, E. M., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., y Boyd, K. G. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Progress in Industrial Microbiology Vol. 35*, 27-32.
- Byranvand, M. M., y Kharat, A. N. (2014). Triangular-like cuprous iodide nanostructures: green and rapid synthesis using sugar beet juice. *Rom. J. Biochem*, 51(2), 101-107.
- Caneva, G., y Ceschin, S. (2008). Ecology of biodeterioration. *Plant Biology for Cultural Heritage: Biodeterioration and Conservation.*, 35-58.
- Carballo , J. (2021). *Identificación de genes vinculados al modo reproductivo por medio de la secuenciación genómica de distintos genotipos de Eragrostis curvula.*
<https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/5825>

- Chavan, P. V., Charate, S. P., Desai, U., Rode, C., y Wadgaonkar, P. P. (2019). Bentonite-clay supported cuprous iodide nanoparticles (BENT-CuI NPs): a new heterogeneous catalyst in the diversity-oriented synthesis of 1, 2, 3-triazoles in aqueous medium. *ChemimstrySelect*, vol 4, no 24, 7144-7150.
- Correa, M. V., Rastelli, S. E., López, A., Rosato, V. G., y Gómez de Saravia, G. F. (2020). Tratamientos superficiales con potencial aplicación en construcciones de hormigón de importancia patrimonial. *Ciencia y tecnología de los materiales*, 37-43.
- De Greef, C., Cilla, G., y Rolón, G. (2020). *BIODETERIORO POR ABEJAS SILVESTRES EN CONSTRUCCIONES CON TIERRA DE LA REGIÓN LITORALEÑA ARGENTINA*. Tucumán, Argentina.
- Devatha, C. P., y Thalla, A. K. (2018). Síntesis verde de nanomateriales. *ELSIEVER*, 169-184.
- Díaz Barajas, A. L., Pérez Castaneda, C., Álvarez Vargas, A., y Serafin Muñoz, A. H. (2022). Aislamiento de microorganismos resistentes a los metales para. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 16, 1-14.
- El-Batal, A., Mosallam, F. M., y El-Sayyad, G. S. (2018). Synthesis of metallic silver nanoparticles by fluconazole drug and gamma rays to inhibit the growth of multidrug-resistant microbes. *Journal of Cluster Science*, 29(6), 1003-1015.
- Eras Díaz, D. S. (2019). *Comparación de dos métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Tzinso (Tagetes Minuta) sobre cepas de Porphyromona Gingivalis. _Estudio in vitro*. Quito: Repositorio Digital UCE.
- Ezealigo, B., Nwanya, A. C., Simo, A., Osuji, R. U., Bucher, R., Maaza, M., y Ezema, F. I. (2019). Optical and electrochemical capacitive properties of copper (I) iodide thin film deposited by SILAR method. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 5380-5391.

Forero Osorio, C., y Culmo Rodriguez, C. C. (27 de Enero de 2021). *Guía metodológica para el reconocimiento in situ de patologías del concreto*. Repositorio unimilitar:

<http://hdl.handle.net/10654/38026>.

Galindo-Alcázar, O., Medina-Jaritz, N. B., Garduño-Solórzano, G., y Olvera-Ramírez, R. (2018). Cyanobacteria and microalgae from surface biofilm from Malinalco, Mexico, an archaeological site. *Polibotánica*. *Polibotánica*, 131-146.

Gámez Espinosa, E. J. (25 de Abril de 2022). *Estudio de la microbiota presente en materiales estructurales: relación con su deterioro y control mediante recubrimientos de base sol-gel con nanopartículas obtenidas por síntesis verde*. La Plata: REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNLP.

Gámez Espinoza , E. J. (2022). *Estudio de la microbiota presente en materiales estructurales: relación con su deterioro y control mediante recubrimientos de base sol-gel con nanopartículas obtenidas por síntesis verde*. Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata.

Ganguli, P., y Chaudhuri, S. (2021). Nanomaterials in antimicrobial paints and coatings to prevent biodegradation of man-made surfaces: A review. *Materials Today: Proceedings*, 45, 3769-3777.

Gao, Y., He, B., Xiao, M., Fang, Z., y Dai, K. (2018). Study of properties and mechanisms of luminescent cement-based paving materials with superhydrophobic function. *Construcción y materiales de construcción (165)*, 548-559.

Gaylarde, C., Ribas Silva, M., y Warscheid, T. H. (2003). Microbial impact on building materials: An overview. *Materials and structures. vol (36)*, 342-352.

- Gómez-Cornelio, S., Mendoza-Vega, J., Gaylarde, C. C., Reyes-Estebanez, M., Morón-Ríos, A., Rosa-García, S., y Ortega-Morales, B. O. (2012). Succession of fungi colonizing porous and compact limestone exposed to subtropical environments. *Fungal Biology*, 116(10), 1064-1072.
- Gómez-Garzón, M. (2018). Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía* 27(2).
- Gorbushina, A. A. (2007). Life on the rocks. *Environ Microbiology*. 9, 1631-1631.
- He, S., Huang, Y., Chen, G., Feng, M., Dai, H., Yuan, B., y Chen, X. (2019). Study of properties and mechanisms of luminescent cement-based paving materials with superhydrophobic function. *Journal of Hazardous Materials* (362), 294-302.
- Huaman Alvarado, E. A., y Mandujano Galarza, O. (2021). *Evaluación del crecimiento de bacterias E. Coli sobre nanopartículas de SiO₂ con concentración de carga orgánica y nanopartículas*. UNCP.
- Hueck, H. J. (1965). The biodeterioration of materials as part of hylobiology. *Material und Organismen*, 1(1), 5-34.
- Ibarrondo Armendia , I. (2020). *Técnicas espectroscópicas portátiles y de alta resolución para estudiar el papel de las condiciones bioambientales en la degradación de nuevos materiales pétreos de construcción*. Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Iravani , S. (2011). Green Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Green Chemistry* 13 (10), 2638-2650.
- Jaimes, C., Santiago, E., Sagredo, V., y Márquez, G. (2019). Synthesis and characterization of cobalt ferrite nanoparticles. *Science and Engineering*, 40(2), 165-169.

- Jiménez Carrasco, A. B. (2023). *Síntesis verde de nanopartículas de Cobre empleando fitoextractos de Ocimum sanctum (albahaca morada) y Jacaranda mimosaeifolia (jacaranda)*. UAEM.
- Kohli, S., Nisha, Rathee, G., Hooda, S., y Chandra, R. (2023). Exploring the untapped catalytic application of a ZnO/CuI/PPy nanocomposite for the green synthesis of biologically active 2, 4, 5-trisubstituted imidazole scaffolds. *Nanoscale Advances*, 5(8), 2352-2360.
- Koneman, E. W., y Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color*. .
- Kumar, P., Burman, U., y Kaul, R. K. (2018). Ecological risks of nanoparticles: effect on soil microorganisms. *Nanomaterials in plants, algae, and microorganisms*, 429-452.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kyrsting, A., Bendix, P. M., Stamou, D. G., y Oddershede, L. B. (2011). Heat profiling of three-dimensionally optically trapped gold nanoparticles using vesicle cargo release. *Nano letters*, 11(2), 888-892.
- Lee, H. J., Lee, G., Jang, N. R., Yun, J. H., Song, J. Y., y Kim, B. S. (2011). Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract. *Nanotechnology*, 1(1), 371-374.
- Licor Cebey, A. (2016). *EVALUACIÓN DE LA CARBONATACIÓN EN HORMIGONES ELABORADOS CON CEMENTO DE BAJO CARBONO LC3. 93*. UCLV.
- Liu, X., Mengb, H., Wangc, Y., Katayama, Y., y Gu, J. D. (2018). Water is a critical factor in evaluating and assessing microbial colonization and destruction of Angkor sandstone monuments. *Elsevier*, 9-16.

- LLontop Delgado, M. R., y Minaya Delgado, J. E. (2022). *Actividad microbiológica in vitro del extracto etanólico de hojas de Fragaria x ananassa Duch." fresa" frente a Staphylococcus aureus ATCC 25923 y Candida albicans ATCC 10231*. Lima: Repositorio UMA.
- Mallick, S., Mukhi, P., Kumari, P., Mahato, K. R., Verma, S. K., y Das, D. (2019). Synthesis, characterization and catalytic application of starch supported cuprous iodide nanoparticles. *Catalysis Letters*, 149, 3501-3507.
- Mamonova, I. A., Babushkina, I. V., Gladkova, E. V., Matasov, M. D., y Puchinýan, D. M. (2015). Biological activity of metal nanoparticles and their oxides and their effect on bacterial cells. *Nanotechnologies in Russia*, 10(1-2), 128-134.
- Markin, A. V., y Markina, N. E. (2019). Experimenting with plasmonic copper nanoparticles to demonstrate color changes and reactivity at the nanoscale. *ournal of Chemical Education*, 96(7), 1438-1442.
- Martínez Carrasco, J. E., y Vela Jimenez, J. B. (20 de Julio de 2023). *Actividad biologica de extractos acuosos obtenidos a partir de semillas de achotillo y taxo*. Universidad Nacional de Chimborazo. <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/11296>
- Medina Tierras, C. (2022). *Actividad repelente e insecticida de aceites esenciales de plantas medicinales*. Ambato: Repositorio Universidad Técnica de Ambato.
- Moraes, L. C., Figueiredo, R. C., Espinós, J. P., Vattier, F., Franconetti, A., Jaime, C., . . . Conejero, S. (2020). Platinum nanoparticles stabilized by N-heterocyclic thiones. Synthesis and catalytic activity in mono- and dihydroboration of alkynes. *Nanoscale*, 12(12), 6821-6831.

- Moritz, M., y Geszke-Moritz, M. (2013). The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 228,, 596-613.
- Murgueitio, E., Debut, A., Landivar, J., y Cumbal , L. (2016). Synthesis of iron nanoparticles through extracts of native fruits of Ecuador, as capuli (*Prunus serotina*) and mortiño (*Vaccinium floribundum*). *Biology and Medicine*, 8(3), 1.
- Neira Garcia , I. (2015). *Síntesis verde de nanoparticulas para la eliminación de colorantes en medios acuosos*. UDC.
- Olmedo Fonseca , P. C. (2019). *Evaluación del potencial antifúngico de los extractos crudos de biosurfactante producidos por Bacillus spp aislados de diferentes fuentes ambientales del Ecuador, a nivel de laboratorio*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Ingeniería en Biotecnología.
- Ongerth, J. E., Johnson, R. L., Macdonald, S. C., Frost, F., y Stibbs, H. H. (1989). Back-country water treatment to prevent giardiasis. *American Journal of Public Health*, 79(12), 1633-1637.
- Ore Payano, E. J. (2022). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando extracto de huamanpinta (chuquiraga spinosa)*.
- Ortega, F., García, M. A., y Arce, V. B. (2023). Películas nanocompuestas a base de almidón: efecto del tipo de síntesis de nanopartículas de plata en sus propiedades relevantes. *Investigación joven Vol. (10)*, 27-28.
- Parjo, U. K., Sunar, N. M., Leman, A. M., Er , C. M., y Gani, P. (2015). Effect of fungal growth on the surface of painted plasterboards. *Advances in Environmental Biology*, 9(20 S1), 15-19.

- Peñarrieta, M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Villa, J. L., y Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista boliviana de química* 31(2), 68-81.
- Picos Pérez, M. d. (2016). *DURABILIDAD EN EL HORMIGÓN ARMADO*. 116.
- Pinna, D. (2021). Microbial Growth and its Effects on Inorganic Heritage Materials. En E. Joseph, *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage* (pp. 3-35). Neuchatel: Springer.
- Pramanik, A., Laha, D., Bhattacharya, D., Panchanan, P., y Karmakar, P. (2012). A novel study of antibacterial activity of copper iodide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 96(1), 50-55.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.03.021>
- Rajput, V. D., Minkina, T. M., Behal, A., Sushkova, S. N., Mandzhieva, S., Singh, R., . . . Movsesyan, H. S. (2018). Effects of zinc-oxide nanoparticles on soil, plants, animals and soil organisms:.. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 9,, 76-84.
- Ramirez Lagunilla, L. R. (2016). Base de datos de hormigones VC. *Análisis de la Eco-Eficiencia*, 4(1), 64-75.
- Ramirez, L. S., y Marin Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263-268.
- Ramos Cortez, E. (2018). Actividad antimicrobiana in vitro e in vivo de nanopartículas de Ag, CuO y ZnO contra bacterias fitopatógenas. *Eprints*.
- Ren, G., Hu, D., Cheng, E. W., Vargas-Reuss, M. A., Reip, P., y Allaker, R. P. (2009). Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International journal of Antimicrobial Agents*, 33(6), 587-590.

- Rendón Díaz Mirón, L. E., y Rendón Lara, M. (2017). The Effect of Microorganisms on Concrete Weathering. *Concrete Durability: Cementitious Materials and Reinforced Concrete Properties, Behavior and Corrosion Resistance*, 1-10.
- Rojano, B. A., Zapata Acosta, K., y Cortes Correa, F. B. (2012). Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey (curuba). *Revista cubana de Plantas Medicinales*, 17(4), 408-419.
- Romani, M., Warscheid, T., Nicole, L., Marcon, L., Martino, P. D., Suzuki, M. T., . . . Lami, R. (2022). Current and future chemical treatments to fight biodeterioration of outdoor building materials and associated biofilms: Moving away from ecotoxic and towards efficient, sustainable solutions. *Science of the Total Environment*, 802, 149846.
- Rose, A. H. (1981). Economic microbiology. En A. H. Rose, *Microbial Biodeterioration vol 6* (pp. 0141-2620). Academic Press, Michigan University.
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Milena Gómez, A., Perdomo, S., y García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2), 49-63.
- Safaei-Ghomi, J., Ziarati, A., y Tamimi, M. (2013). A novel method for the one-pot five-component synthesis of highly functionalized pyranopyrazoles catalyzed by CuI nanoparticles. *Acta Chimica Slovenica.*, 60(2), 403-410.
- Saleh, H., y Koller, M. (2018). Principios de la química verde. En H. Saleh, y M. Koller, *Química verde*.
- Santos-Espinoza , A., Gutiérrez-Miceli, F., Ruiz-Valdiviezo, V., y Montes-Molina, J. (2020). El papel de los compuestos polifenólicos en la síntesis verde de nanopartículas metálicas. *BioTecnología*, 24(2), 46-46.

- Seabra, A., y Duran, N. (2015). Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. *Metals*, *5*(2), 934-975.
- Serra, A., Filippo, E., Re, M., Palmisano, M., Vittori-Antisari, M., Buccolieri, A., y Manno, D. (2009). Non-functionalized silver nanoparticles for a localized surface plasmon resonance-based glucose sensor. *Nanotechnology*, *20*(16), 165501.
- Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K., y Poinern, G. (2015). Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials*, *8*(11), 7278-7308.
- Shankar, S., y Rhim, J. W. (2014). Effect of copper salts and reducing agents on the characteristics and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters Vol* (132), 307-311.
- Shirakawa, M. A., Gaylarde, C. C., Gaylarde, P. M., John, V., y Gambale, W. (2002). Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. *FEMS microbiology ecology*, *39*(2), 165-173.
- Shiva Ramayoni, C. M., y Calvo Torras, M. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento*. Universidad autónoma de Barcelona.
- Tavakoli, F., Salavati-Niasari, M., y Mohandesb, F. (2013). Greensynthesis of flower-like CuI microstructures composed of trigonal nano structures using pomegranate juice. *Materials letters*, *100*, 133-136.
- Ticllacuri Perales, V. J., y Travezaño Neyra, E. M. (2019). *Caracterización de nanopartículas de plata obtenidas mediante síntesis biogénica usando extracto de Coffea arabica procedente de Satipo - Junín para uso antimicrobiano*. UNCP.

- Tornøe, C. W., Christensen, C., y Mendal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase:[1, 2, 3]-triazoles by regiospecific copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of organic chemistry*, 67(9), 3057-3064.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jo011148j>
- Trepiana Fica, D. A. (2015). Síntesis de suspensiones de nanopartículas de cobre y quitosano, y evaluación de sus propiedades antimicrobianas frente a *Streptococcus mutans*.
- Troyano-Moreno, M. (2019). *Introducción a las estructuras de hormigón*. UMA.
- Vega, L. (2009). Análisis del perfil de expresión génica en respuesta a la quimioterapia y su relación con el estrés oxidativo en el cáncer de mama. *Dialnet*.
- Verdier, T., Coutand, M., Bertron, A., y Roques, C. (2014). A review of indoor microbial growth across building materials and sampling and analysis methods. *Building and environment*, 80, 136-149.
- Vergara de Arco, I., Torre, R., Cano Acevedo, D., Olier Castillo, B., y Morales Perrián, T. E. (2019). *Tinciones*.
- Villarreal Guerrero, M. K. (2021). *Mitigación y protección de la corrosión en estructuras de concreto reforzado: métodos, aplicaciones y factores de impacto*. UNIPAMPLONA.
- Wang, X., Stewart, M. G., y Nguyen, M. (2012). Impact of climate change on corrosion and damage to concrete infrastructure in Australia. *Climatic change*, 110(3-4), 941-957.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., y Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. CRC press. New York: Taylor & Francis.
- Xu, H., Qu, F., Xu, H., Lai, W., Wang, Y. A., Aguilar, Z. P., y Wei, H. (2012). Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157: H7. *Biometals*, 25, 45-53.

Yang, W., Shen, C., Ji, Q., An, H., Wang, J., Liu, Q., y Zhang, Z. (2009). Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA.

Nanotechnology, 20(8), 085102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/8/085102>

Zhang, W., Cui, H., y Wong, L.-J. (2014). Application of next generation sequencing to molecular diagnosis of inherited diseases. *Chemical Diagnostics: from Bench to Bedside*, 19-45.

Apéndices