



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS “ESPE”
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

«Comprobación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de óxido de cobre sobre microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media.»

Autor: Joel Andrés Padilla Quishpe

Tutor: Ing. Andrés Izquierdo M.Sc.

30 de Agosto de 2023



INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

AGRADECIMIENTOS

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Deterioro de materiales de construcción

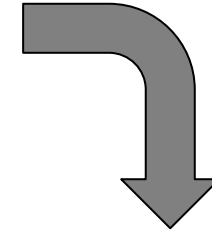
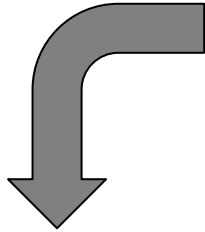


Materiales susceptibles a colonización de microorganismos

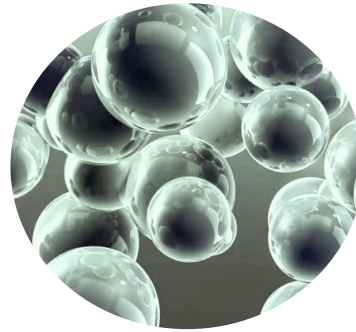
Factores ambientales contribuyen con el biodeterioro

Métodos tradicionales con rápida recolonización

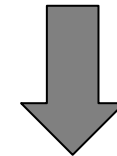
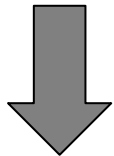
Biocidas perjudiciales para el medio ambiente y salud humana



Microorganismos resistentes a agentes antiincrustantes



Nuevas técnicas que eviten el biodeterioro



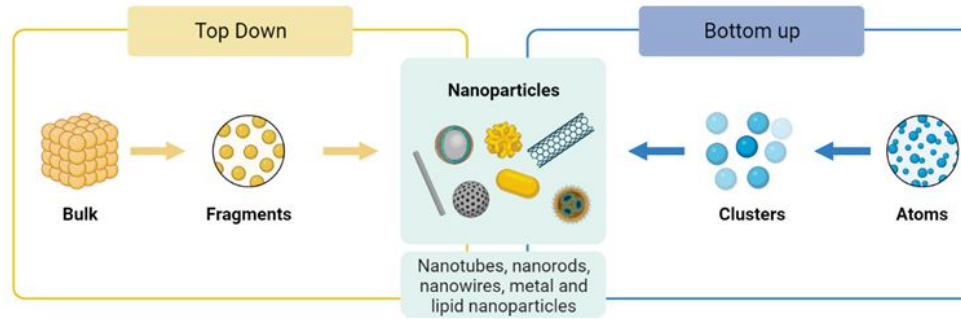
Síntesis tradicional de nanopartículas requiere químicos tóxicos



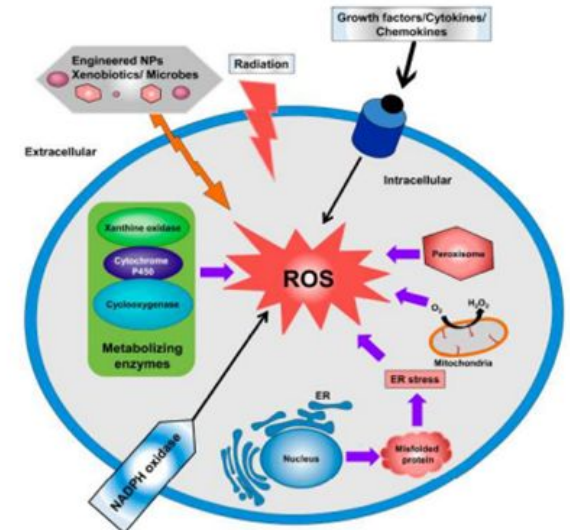
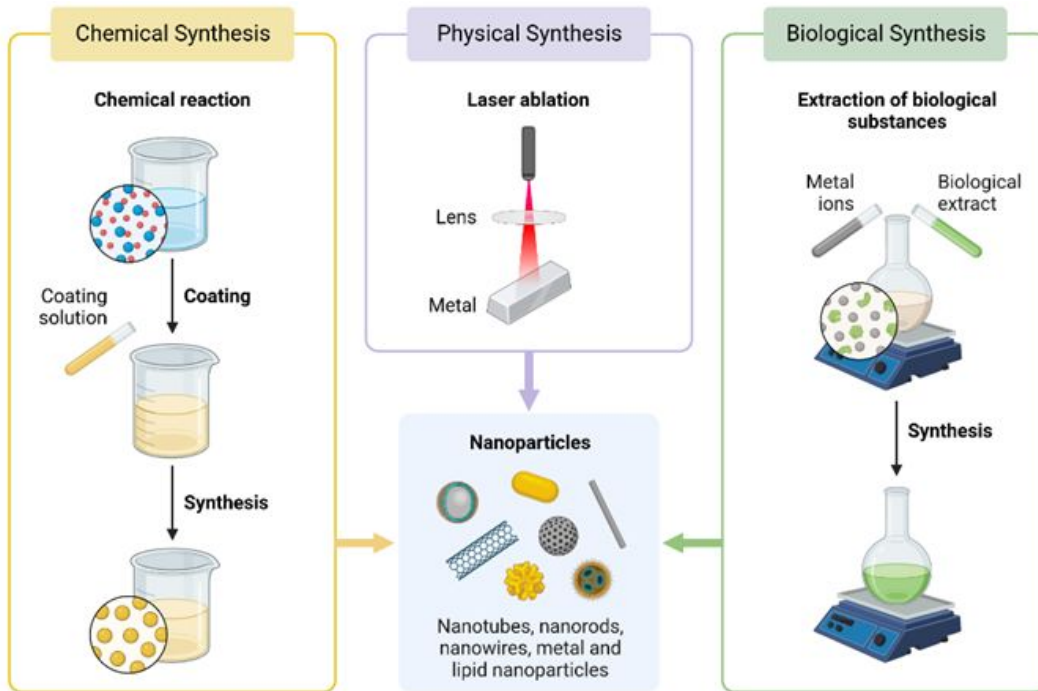
Nanopartículas de óxido de cobre obtenidas por síntesis verde

INTRODUCCIÓN

Enfoques Top Down y Bottom up para la obtención de nanopartículas.



Principales metodologías para la síntesis de nanopartículas



Mecanismo de acción de las NPs de óxido de cobre para inducir las especies reactivas de oxígeno



OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

Objetivo General

Microorganismos asociados de un hormigón de resistencia media de cobre sobre

Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de óxido de cobre mediante química verde, para su posterior uso en la fabricación de hormigón de resistencia media ($f'_{c} \neq$ antimicrobiano).
- Realizar el ensayo de difusión en pozo, para la comprobación de su actividad antimicrobiana.

Hipótesis: partículas de óxido de cobre tienen un efecto antimicrobiano sobre microorganismos asociados de un hormigón de resistencia media.



MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del extracto

Síntesis verde de NPs de óxido de cobre

Caracterización de las NPs de óxido de cobre

Cálculo de la concentración de las NPs de Cu_2O

Aislamiento e identificación de microorganismos

Actividad antimicrobiana de las NPs de Cu_2O



UNIVERSIDADE
FEDERAL
DE PERNAMBUCO



ESPE
UNIVERSIDADE DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACION PARA LA EXCELENCIA

PREPARACIÓN DE EXTRACTO

Adecuación



Limpieza de impurezas



Lavado



Secado



Temperatura Ambiente

Extracción



1 minuto



Taxo triturado +
etanol 20%
1:2



120 rpm
4 horas



Filtrado



6000 rpm
15 minutos

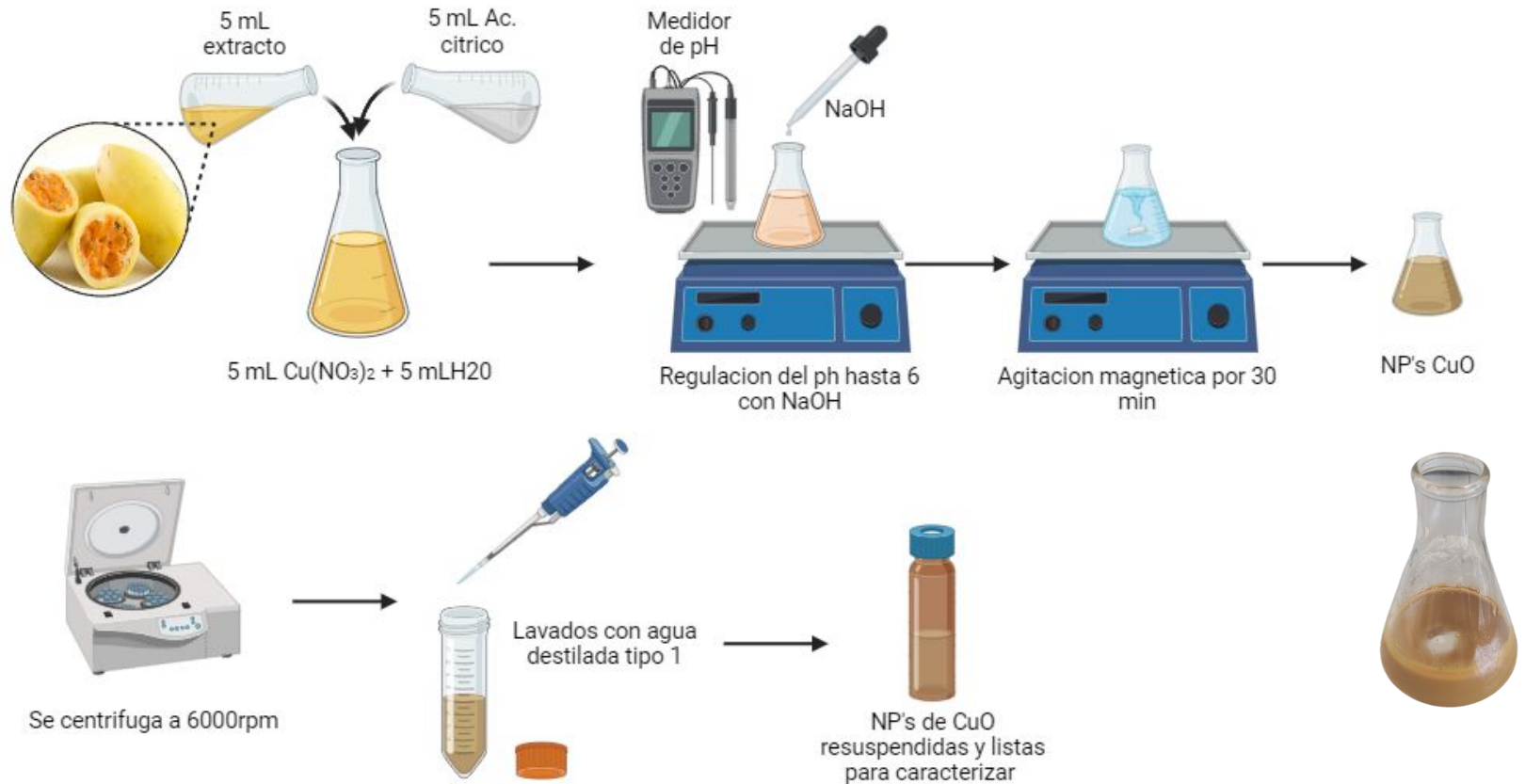


Created in BioRender.com



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA

SÍNTESIS VERDE DE NPs DE Cu_2O



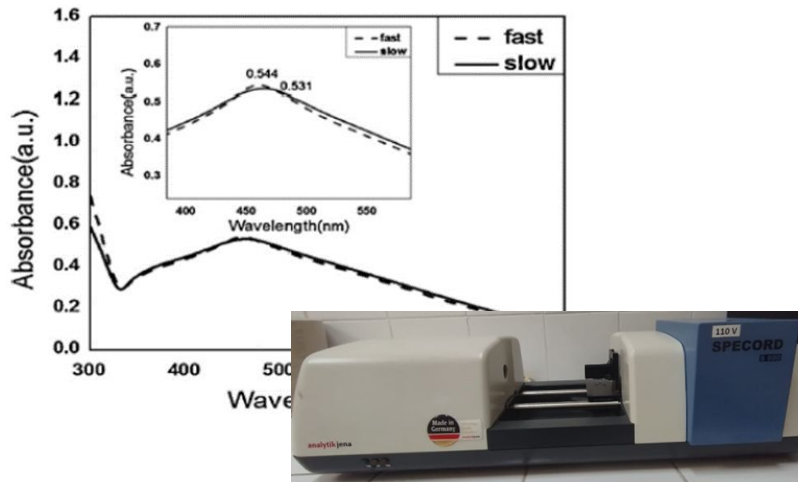
Created in BioRender.com 



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA

CARACTERIZACIÓN DE NPs DE Cu₂O

Espectro UV-Visible



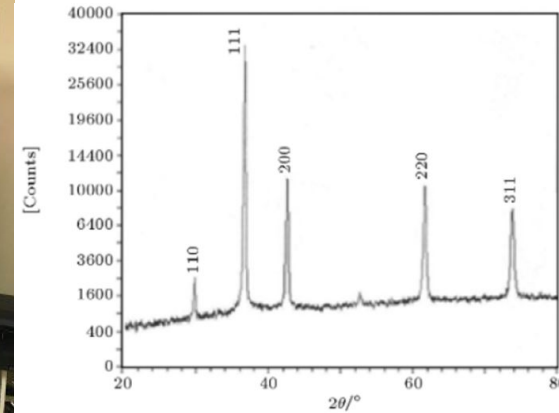
Dispersión de luz dinámica (DLS)



Tiempo (horas) **Diámetro hidrodinámico (nm)**

Estabilidad:
0, 2, 4, 8, 16 y 32

Difracción de Rayos X (XRD)



Estructura cristalina

Ecuación de Scherrer

$$d = k\lambda / \beta \cos\theta$$

d: tamaño de la nanopartícula,

k = 0.9

$\lambda = 1.5106$

β : ancho completo del pico

θ : corresponde al ángulo de Bragg- Brentano.



ESPE
ESCUOLA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA

CARACTERIZACIÓN DE NPs DE Cu_2O

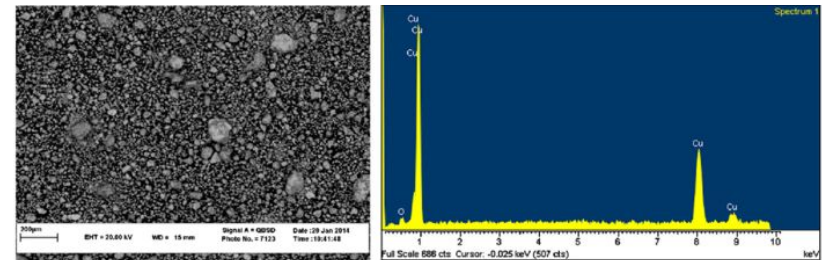
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)



Microscopía electrónica de barrido (SEM)



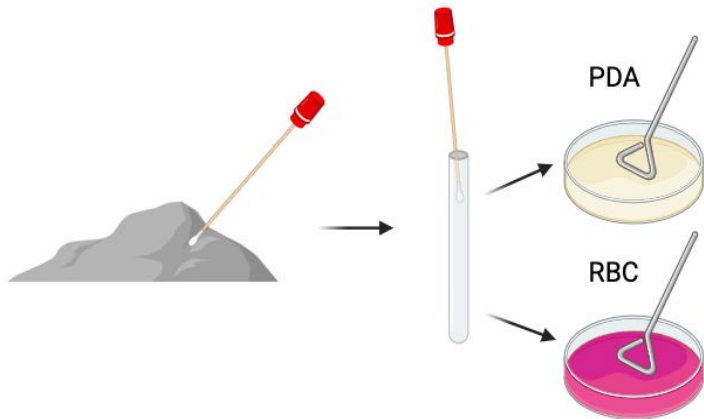
Espectrómetro de absorción atómica en flama



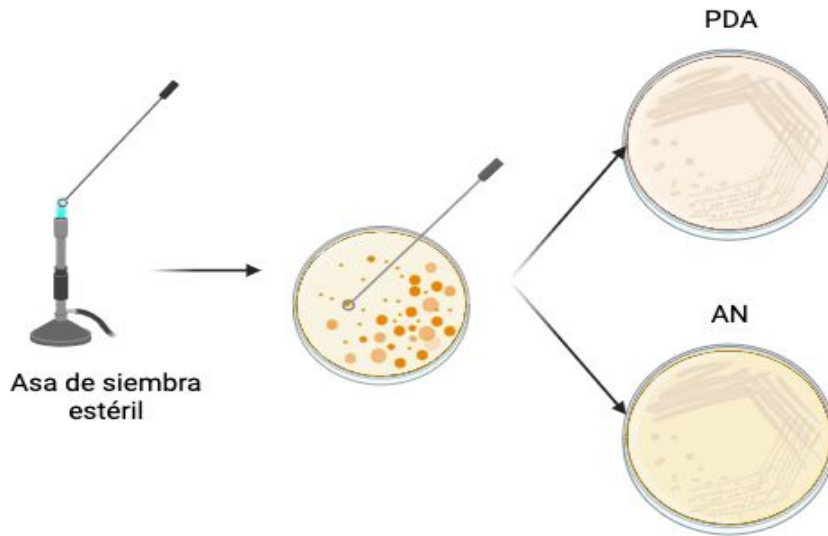
Espectrómetro de energía positiva (EDS): Composición elemental

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

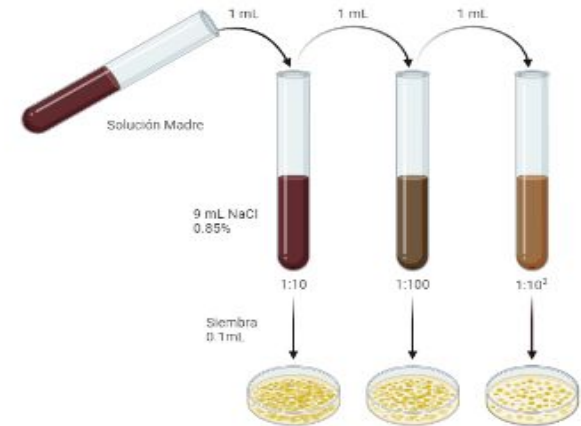
Muestreo para aislamiento



Aislamiento de microorganismos



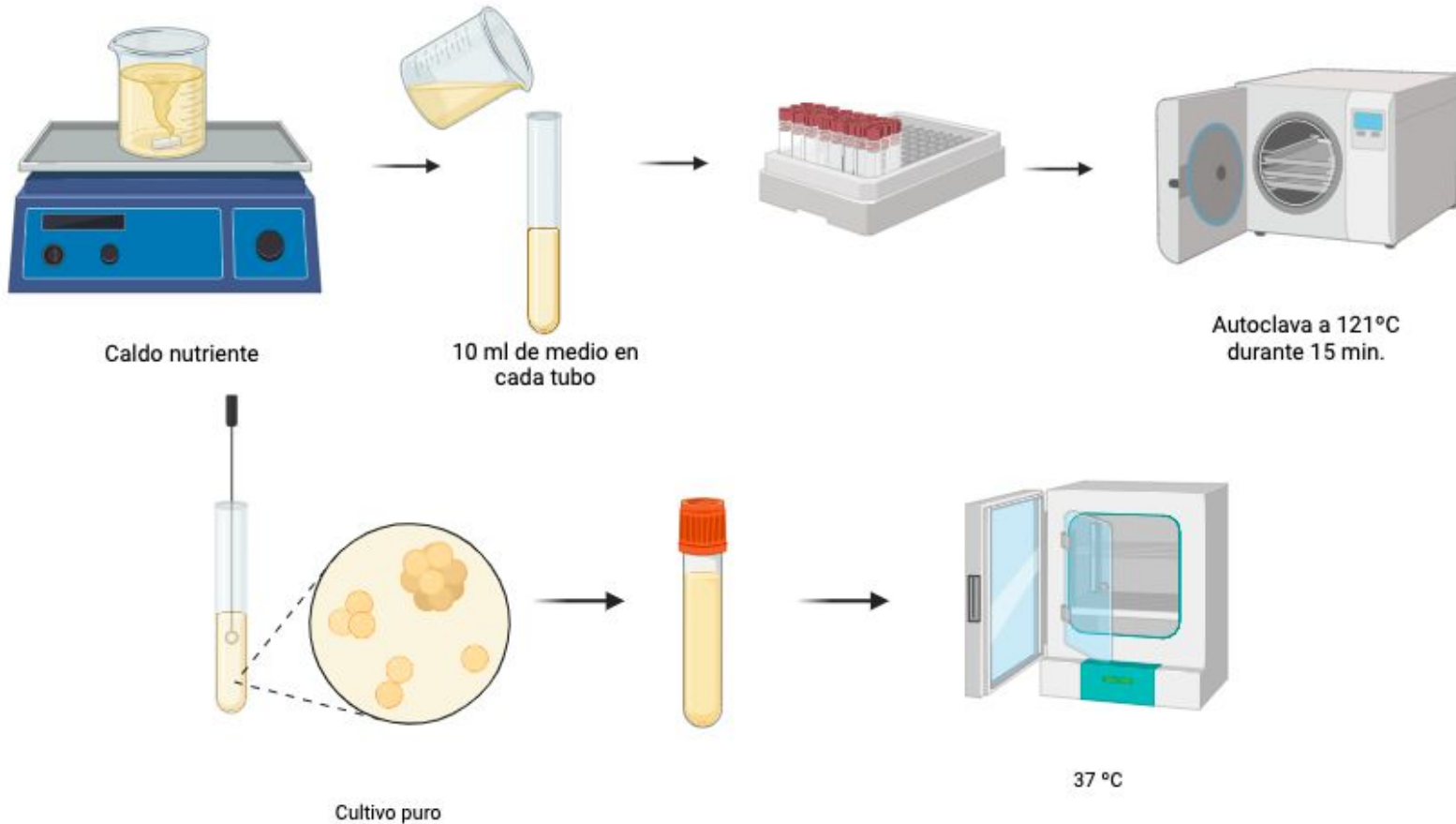
Siembra de microorganismos



37°C, 24h

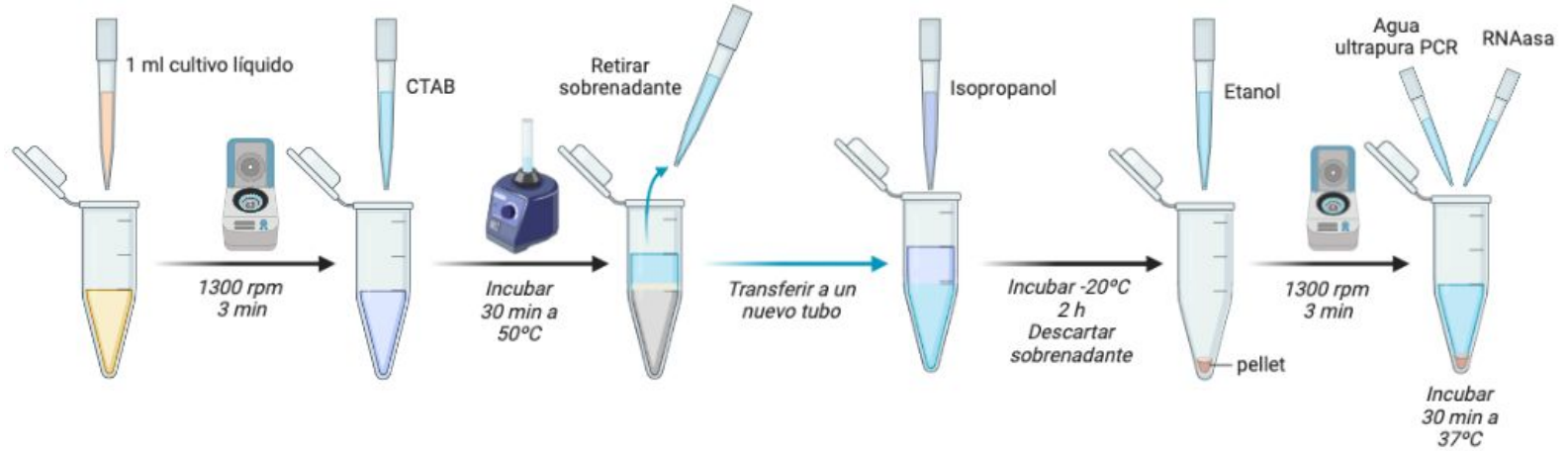
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Caldos microbianos

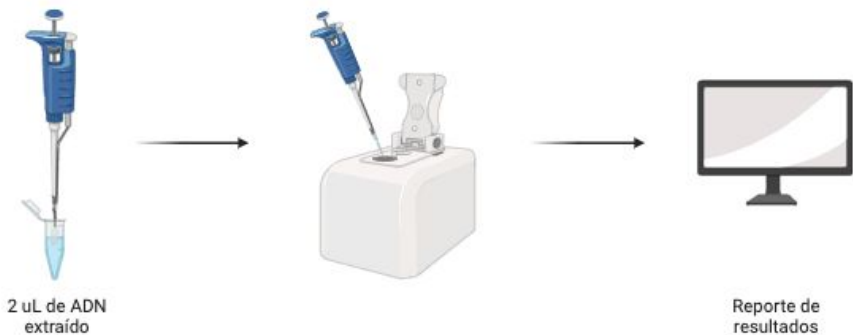


AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Extracción de ADN



Cuantificación de ADN



Secuenciación de ADN



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Secuenciación de ADN



Secuenciación NGS Metagenómica de Amplicón



Amplificó la región v3-v4 del gen ribosomal 16S

- 341F (5'CCTACGGGNGGCWGCAG3')
- 805R (5'GACTACHVGGGTATCTAATCC3')

Amplifico Región ITS: ITS1 - ITS4

Análisis bioinformático



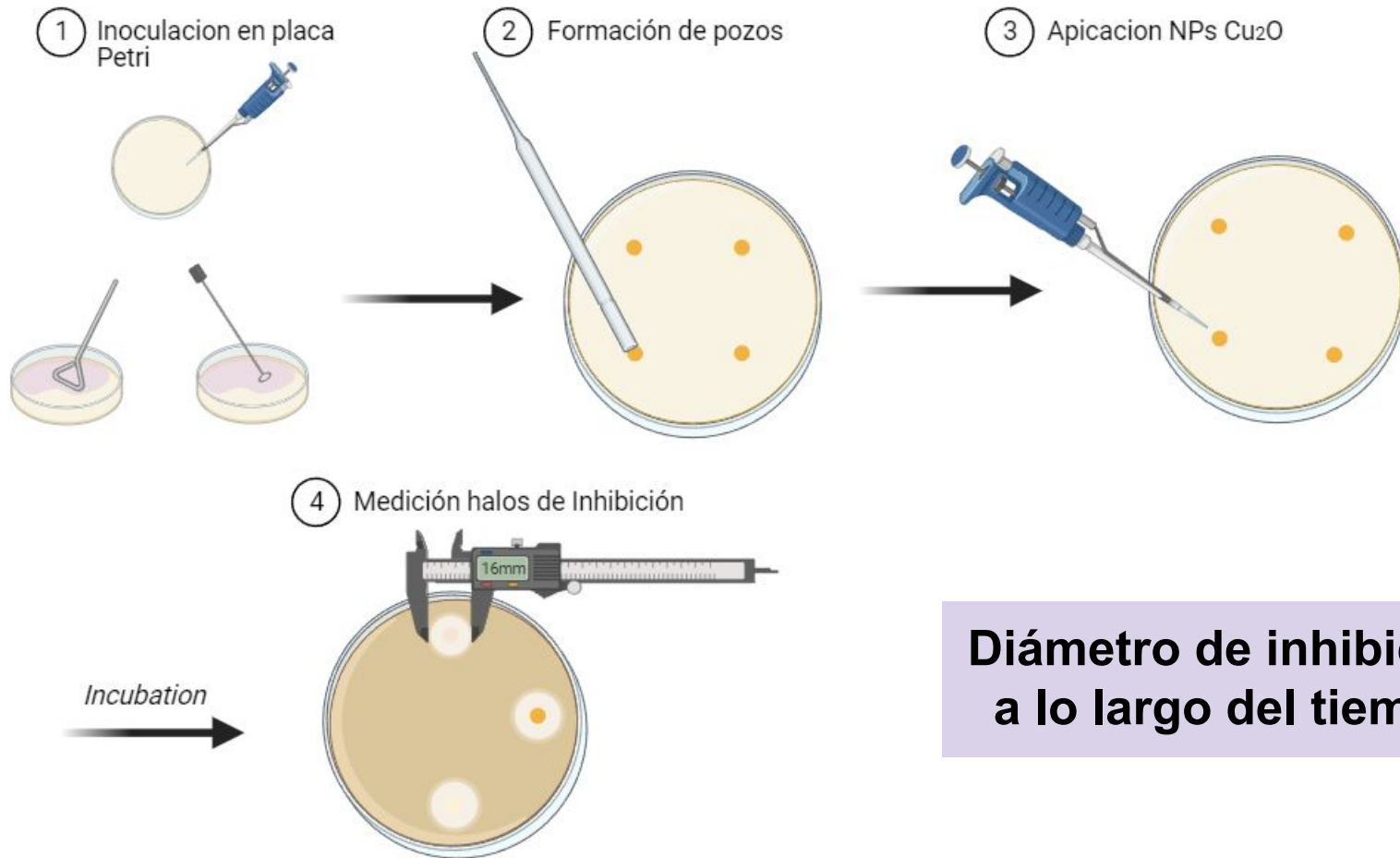
Control de calidad



similitud y homología

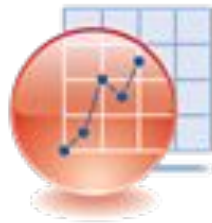


ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS NPs DE Cu_2O



Created in **BioRender.com** **bio**

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

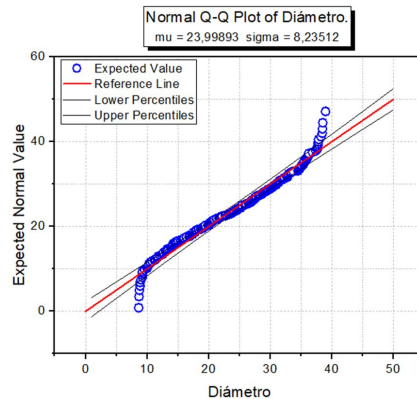


ORIGINPRO® 2023

The Ultimate Software for Graphing & Analysis

Análisis de supuestos:

- Normalidad
- Homocedasticidad



Ensayo por triplicado

Anova de dos vías

Test de Bonferroni, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las NPs de óxido de cobre

Aislamiento e identificación de microorganismos

Selección de microorganismos más predominantes

Análisis filogenético

Actividad antimicrobiana de las NPs de Cu_2O

Cinética de inhibición



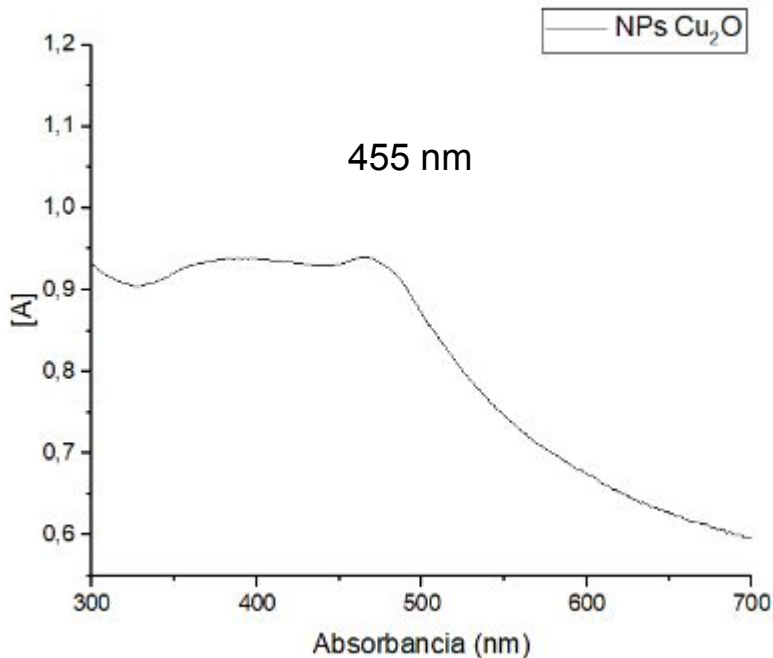
CARACTERIZACIÓN DE NPs DE Cu_2O

Síntesis de NPs de Cu_2O



Análisis del espectro UV-Vis

Espectro UV-Vis de las NPs de Cu_2O



$\text{pH} \leq 6$ formación NPs Cu_2O cúbicas

400 - 500 nm

Análisis del tamaño hidrodinámico (DLS)

Estabilidad y tamaño hidrodinámico de las NPs de Cu_2O

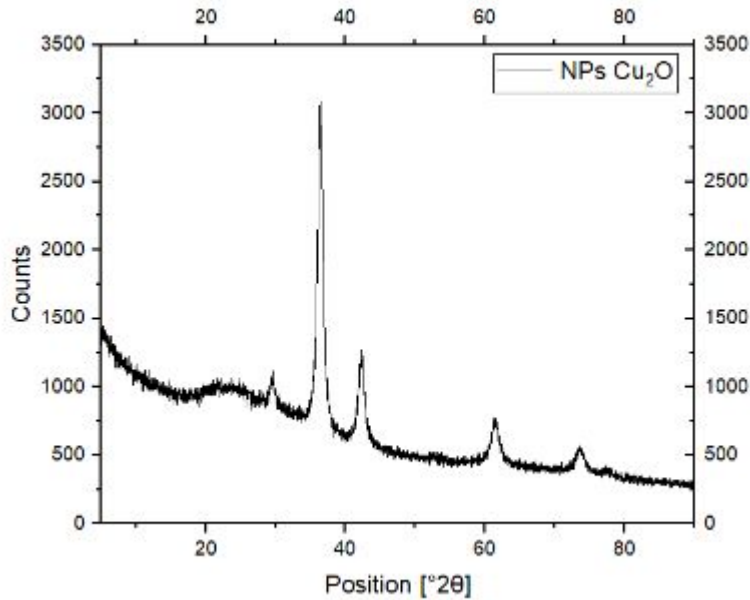
Tiempo (horas)	Diámetro hidrodinámico (nm)
0	9.8±(0.58)
2	10.2±(0.35)
4	15.8±(0.24)
8	13.1±(0.94)
16	16.7±(0.61)
32	17.2±(0.54)



CARACTERIZACIÓN DE NPs DE Cu₂O

Análisis de la estructura cristalina

Patrón de difracción de rayos X (XRD) para las NPs de Cu₂O



Picos indexados de NPs de Cu₂O - Fase cúbica

Lista de picos y posiciones [2θ] para las NPs Cu₂O

Pos [2θ]	Height [cts]	FWHM left [°2θ]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]
29.5440	122.46	0.8713	3.02109	7.66
36.3629	1598.17	0.9007	2.46869	100.00
42.3142	442.56	1.0574	2.13423	27.69
61.4016	278.54	1.0056	1.50875	17.43
73.6604	100.87	1.4140	1.28502	6.31

Lista de patrones elegidos

$$d = k\lambda / \beta \cos\theta$$

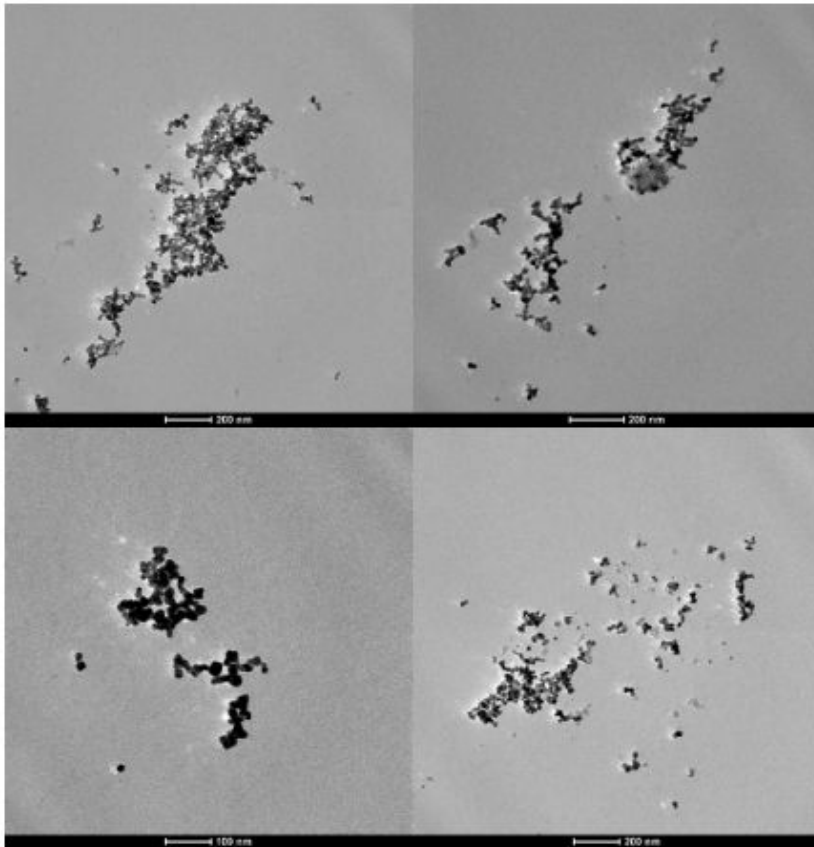
9,1 nm

Ref. Code	Score	Compound Name	Displacement [°2Th.]	Scale Factor	Chemical Formula	RIR	Crystal System	Cell Parameters
01-0	83	Copper	0.000	0.918	Cu ₂ O	8.280	Cubic	a 4.271 - b
80-7		Oxide						4.271 - c
711								7.271

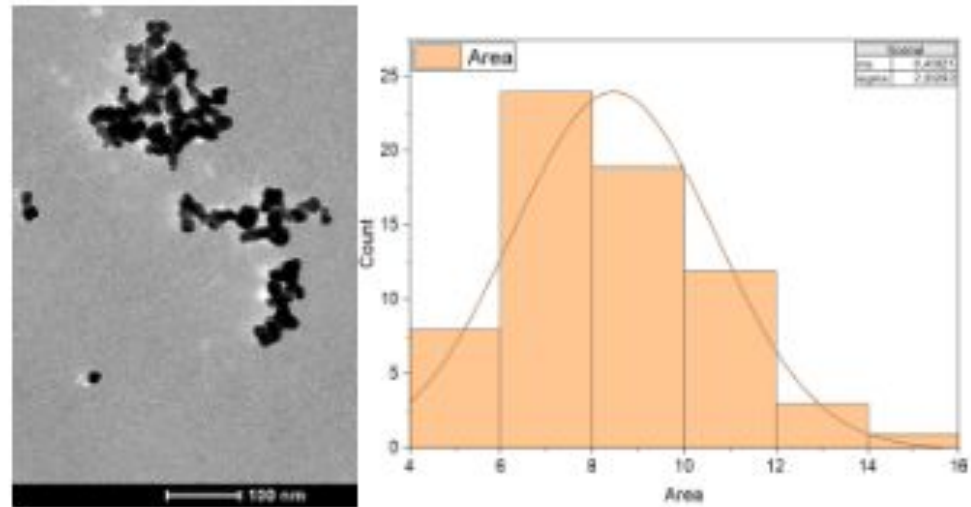
CARACTERIZACIÓN DE NPs DE Cu_2O

Análisis de la morfología de las NPs de Cu_2O

Micrografía electrónica de transmisión de las NPs de Cu_2O



Análisis del tamaño de las NPs de Cu_2O mediante ImageJ-FIJI



Tamaño de 8.45 nm

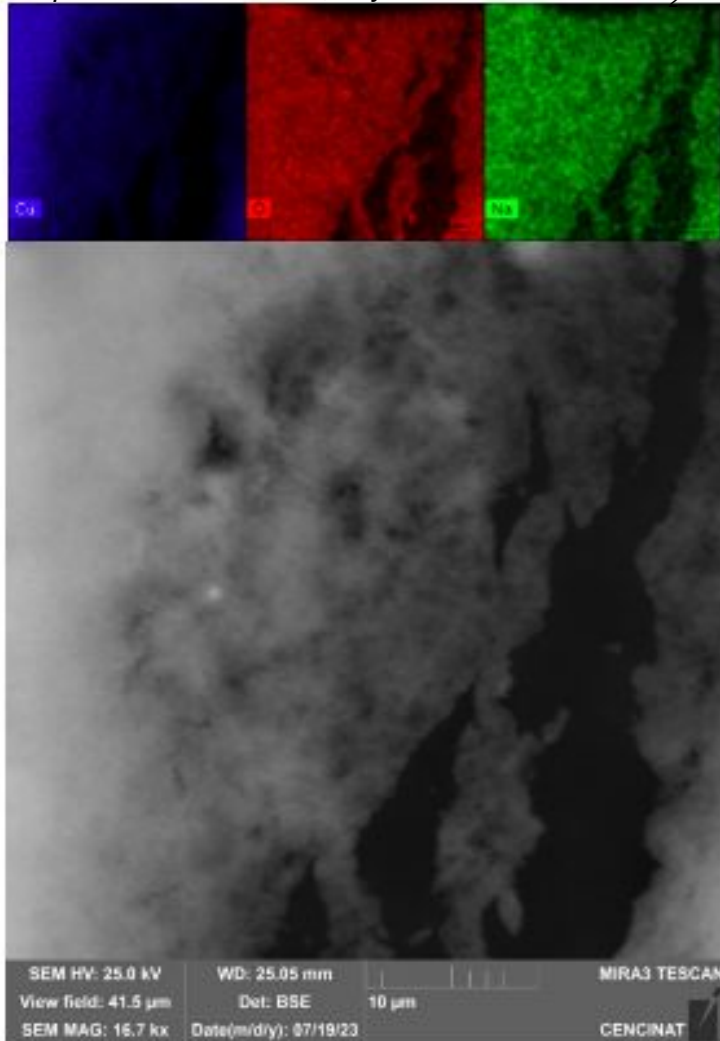


ESPE
ESCUOLA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA

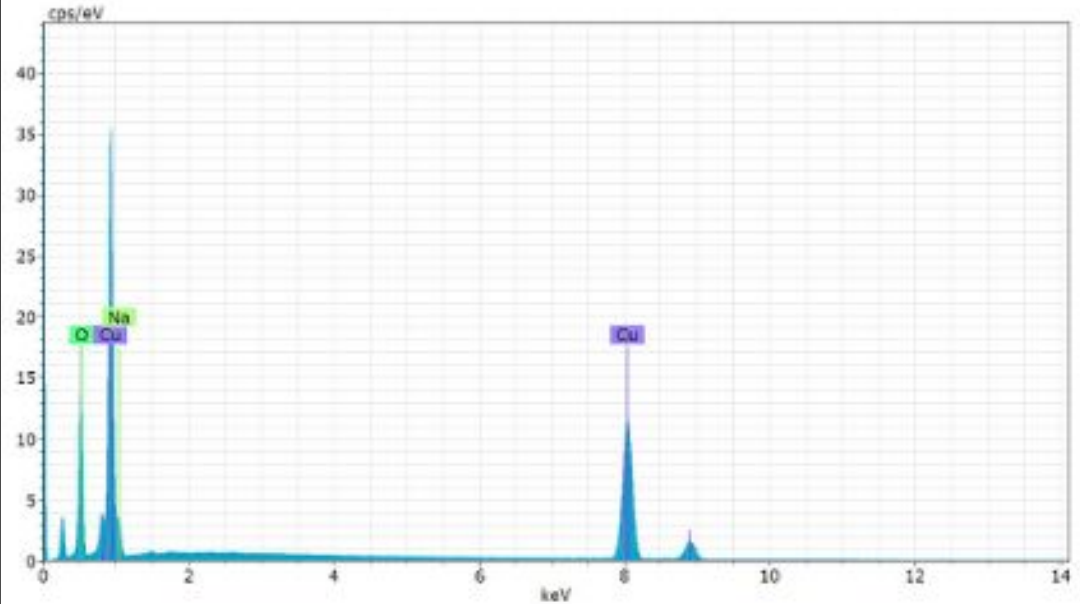
CARACTERIZACIÓN DE NPs DE Cu_2O

Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Mapeo elemental de Cu, O y Na de las NPs de Cu_2O



Análisis elemental de las NPs de Cu_2O determinado por EDS

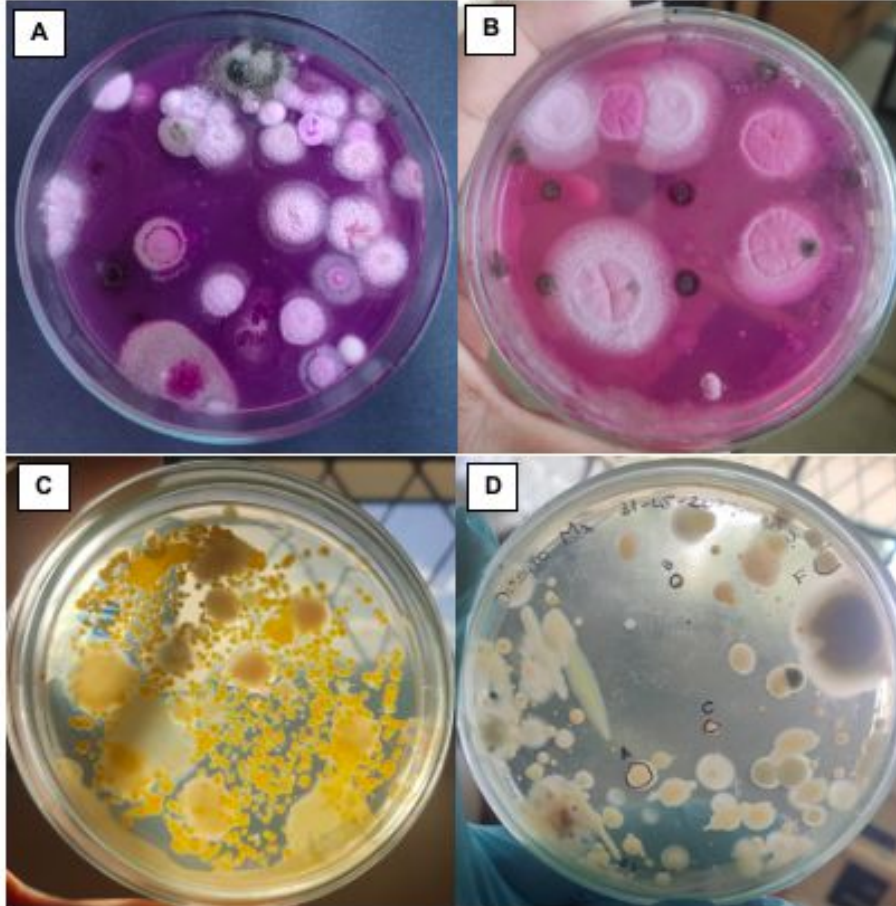


Elemento	Masa normalizada
Cu	62.03%
O	32.23%
Na	5.71%

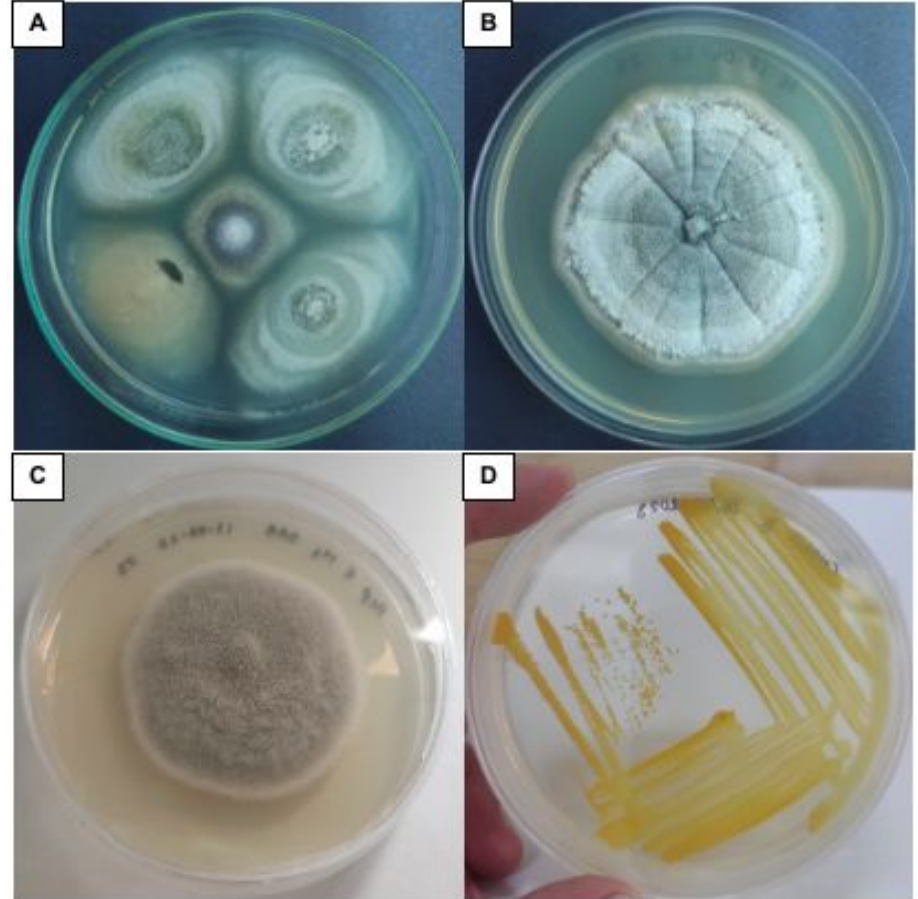


AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Muestras directas y por diluciones.

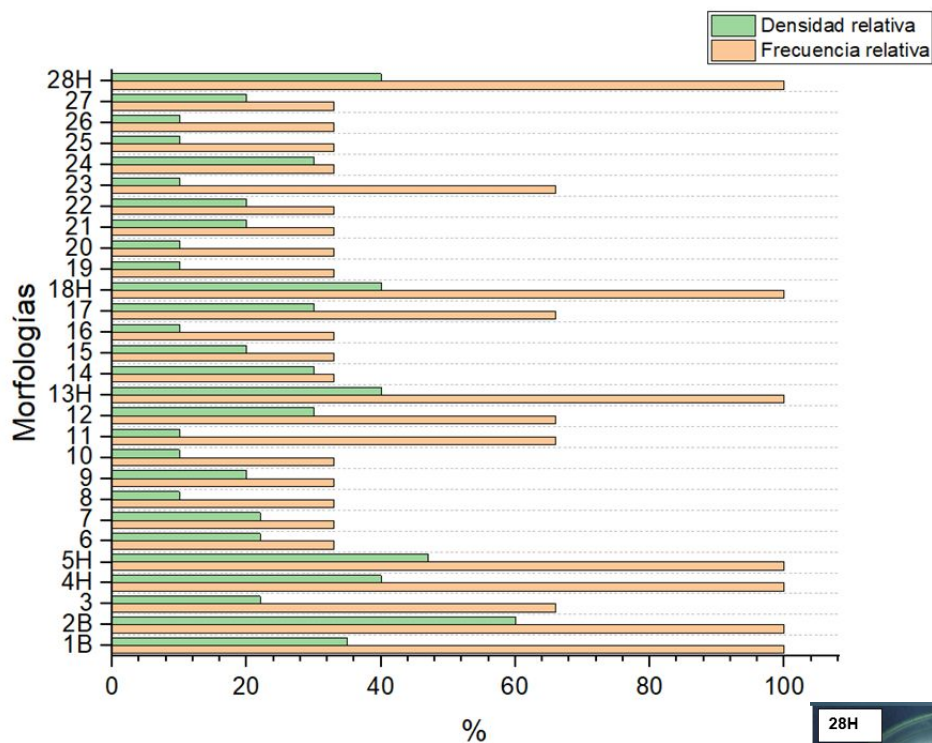


Aislamientos y purificaciones de microorganismos

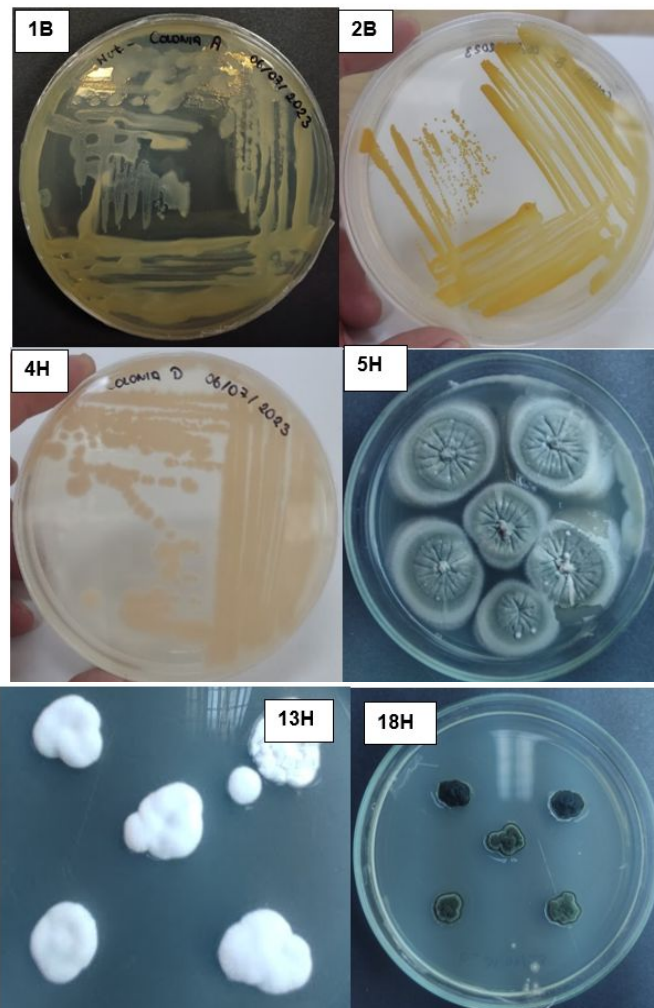


SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS MÁS PREDOMINANTES

Frecuencia relativa y densidad relativa de los microorganismos aislados



Morfología de los microorganismos más predominantes

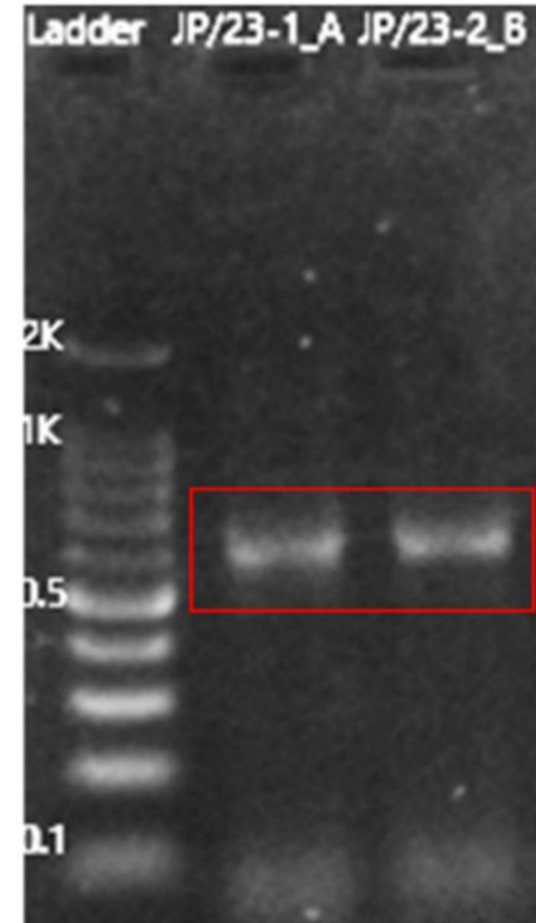


IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Cuantificación de DNA

Morfología	Concentración [ng/ μ L]	260/280	260/230
1B	155.2	1.98	1.63
2B	295.0	1.97	1.83
4H	226.9	1.94	1.61
5H	72.6	1.93	0.74
13H	37.9	1.97	2.10
18H	76.6	2.06	1.62
28H	41.1	2.09	2.10

Visualización de Índice PCR previa secuenciación.



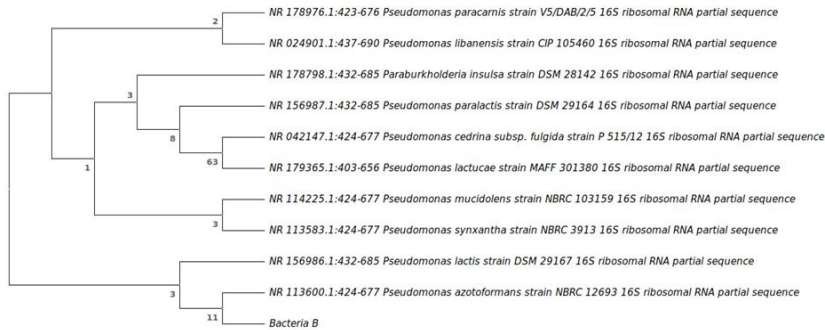
ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Microorganismos próximos a 1B



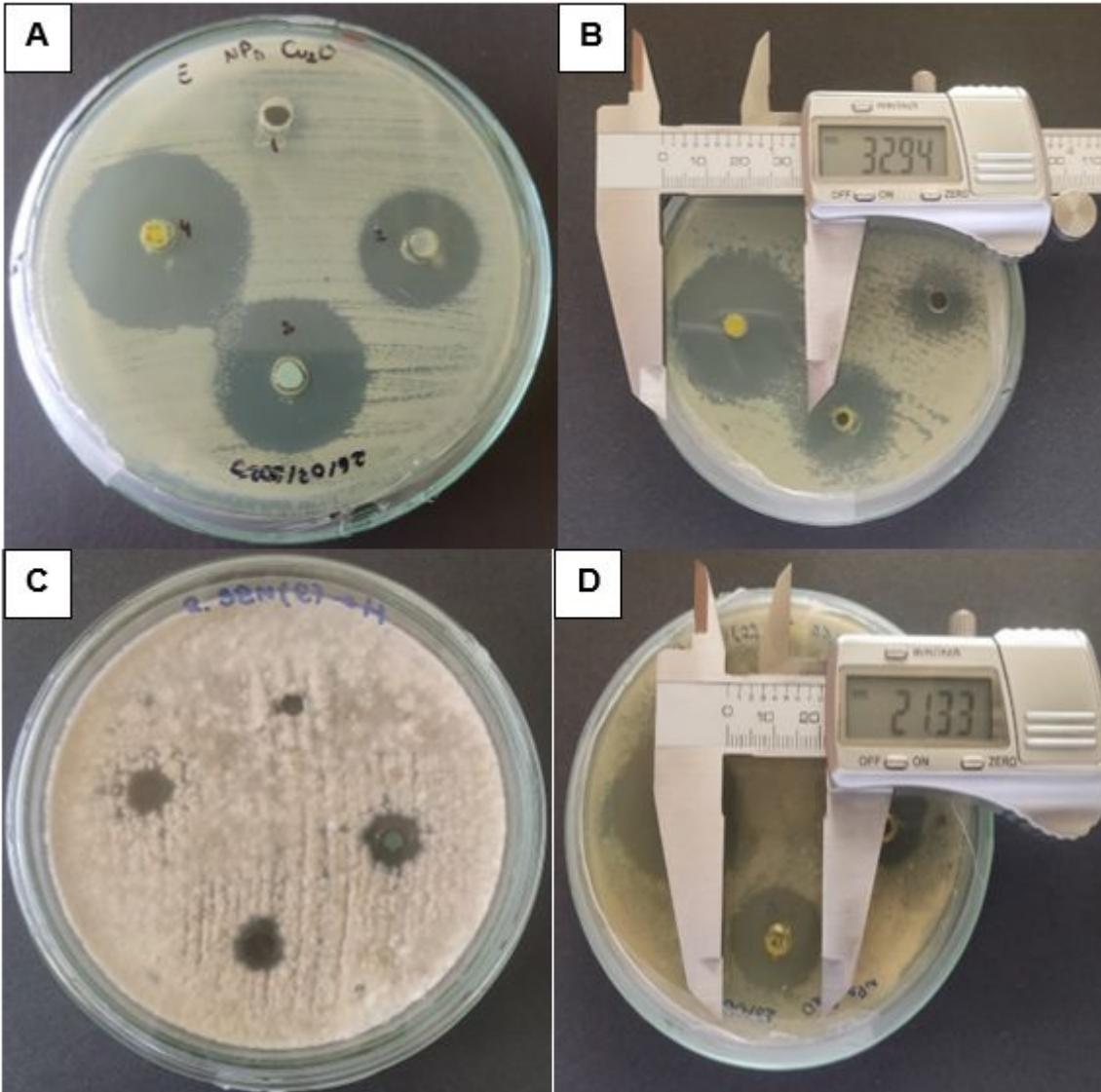
Descripción	Cobertura de consulta	Porcentaje de identidad	Número de acceso
<i>Ralstonia pickettii</i> (NRBC 102503)	100%	100%	NR_114126.1
<i>Ralstonia pickettii</i> (JCM 5969)	100%	100%	NR_113352.1
<i>Ralstonia pickettii</i> (ATCC 27511)	100%	100%	NR_043152.1
<i>Ralstonia mannitolilytica</i> (LGM 6866)	100%	98.54%	NR_025385.1
<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> (UQRS 461)	99%	98.04%	NR_134148.1
<i>Cupriavidus necator</i> (N-1 16S)	99%	97.55%	NR_102851.1
<i>Cupriavidus necator</i> (N-1)	99%	97.55%	NR_028766.1
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> (LGM 19424)	99%	97.06%	NR_074823.1
<i>Ralstonia pickettii</i> (NRBC 102503)	99%	97.06%	NR_134150.1
<i>Ralstonia pickettii</i> (NRBC 102503)	99%	97.06%	NR_134149.1

Microorganismos próximos a 2B



Descripción	Cobertura de consulta	Porcentaje de identidad	Número de acceso
<i>Pseudomonas azototomifans</i> (NRBC 12693)	100%	100%	NR_113600.1
<i>Pseudomonas libanensis</i> (CIP 105460)	100%	100%	NR_024901.1
<i>Pseudomonas paralactis</i> (DMS 29164)	100%	100%	NR_156987.1
<i>Pseudomonas lactis</i> (DMS 29167)	100%	100%	NR_156986.1
<i>Pseudomonas mucidolens</i> (NBRC 103159)	100%	100%	NR_114225.1
<i>Pseudomonas paracarnis</i> (VS/DAB/2/5)	100%	100%	NR_178976.1
<i>Pseudomonas synxantha</i> (NRBC 3913)	100%	99.21%	NR_113583.1
<i>Pseudomonas cedrina</i> (P 515/12)	100%	98.82%	NR_042147.1
<i>Pseudomonas lactucae</i> (MAFF 301380)	100%	98.82%	NR_179365.1
<i>Parabrachyella insulsa</i> (DMS 28142)	100%	100%	NR_178998.1

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS NPs DE Cu_2O

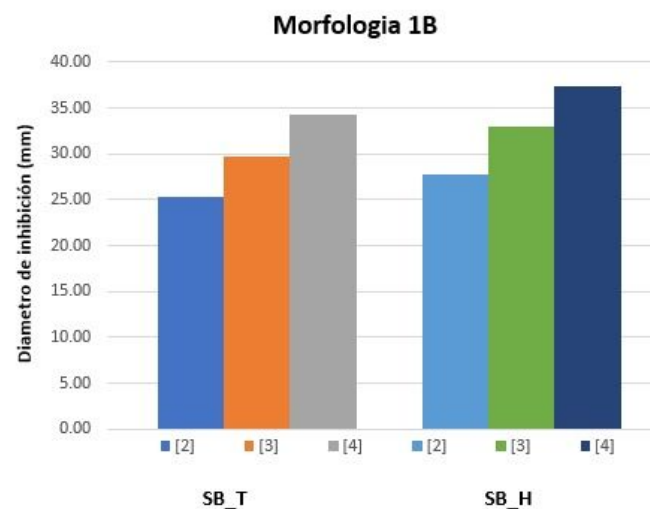
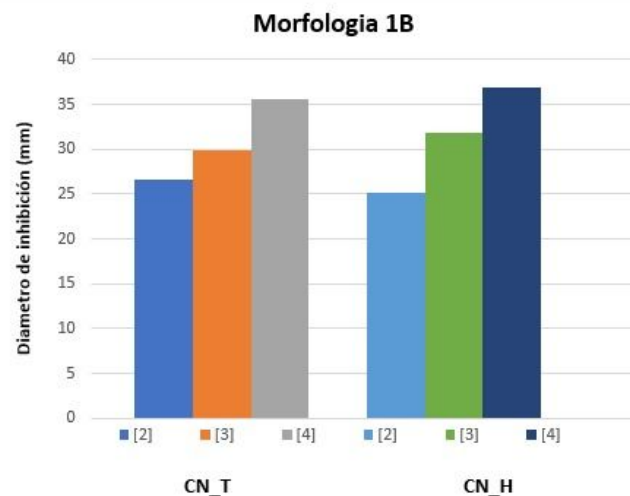


A) halos de inhibición morfología 4H,
B), medición del diámetro de halos de inhibición con calibrador digital,
C) halos de inhibición morfología 5H y
D) medición del diámetro de halos de inhibición con calibrador digital morfología 13H.



Morfología	Concentración NPs	Método de Siembra	Diámetro del halo de inhibición (mm)	±SD
1B	[2]	CN_T	26,63	0,44
	[3]		29,87	1,50
	[4]		35,52*	2,09
	[2]	CN_H	25,08	1,37
	[3]		31,77	0,50
	[4]		36,81*	0,95
	[2]	SB_T	25,24	0,92
	[3]		29,74	1,77
	[4]		34,31*	1,32
[2]	SB_H	27,78	1,36	
[3]		32,89	0,87	
[4]		37,36*	1,22	
4H	[2]	PDB_T	19,03	1,54
	[3]		26,36	1,06
	[4]		35,43*	0,85
	[2]	PDB_H	18,08	2,97
	[3]		26,09	2,39
	[4]		32,33*	1,07
	[2]	SE_T	14,48	0,84
	[3]		18,98	1,68
	[4]		27,35*	4,69
[2]	SE_H	13,38	1,37	
[3]		20,45	3,57	
[4]		30,73*	4,81	

* El valor es significativamente diferente a los demás valores promedio del diámetro del halo de inhibición por la acción de NPs de Cu₂O



Morfología	Concentración NPs	Método de Siembra	Diámetro del halo de inhibición (mm)	±SD
5H	[2]	PDB_T	18,68	1,81
	[3]		24,43	4,19
	[4]		34,18*	1,69
	[2]	PDB_H	19,22	0,90
	[3]		31,99	4,92
	[4]		35,99*	3,00
	[2]	SE_T	17,18	2,32
	[3]		22,23	3,29
	[4]		28,06*	2,65
	[2]	SE_H	16,97	0,91
	[3]		22,23	1,14
	[4]		29,18*	0,50
13H	[2]	PDB_T	17,29	0,58
	[3]		26,31	7,97
	[4]		31,80*	5,26
	[2]	PDB_H	16,84	1,09
	[3]		22,82	1,08
	[4]		32,93*	4,63
	[2]	SE_T	15,76	2,50
	[3]		20,07	0,76
	[4]		25,59*	1,99
	[2]	SE_H	18,83	1,37
	[3]		23,05	1,20
	[4]		27,23*	1,75

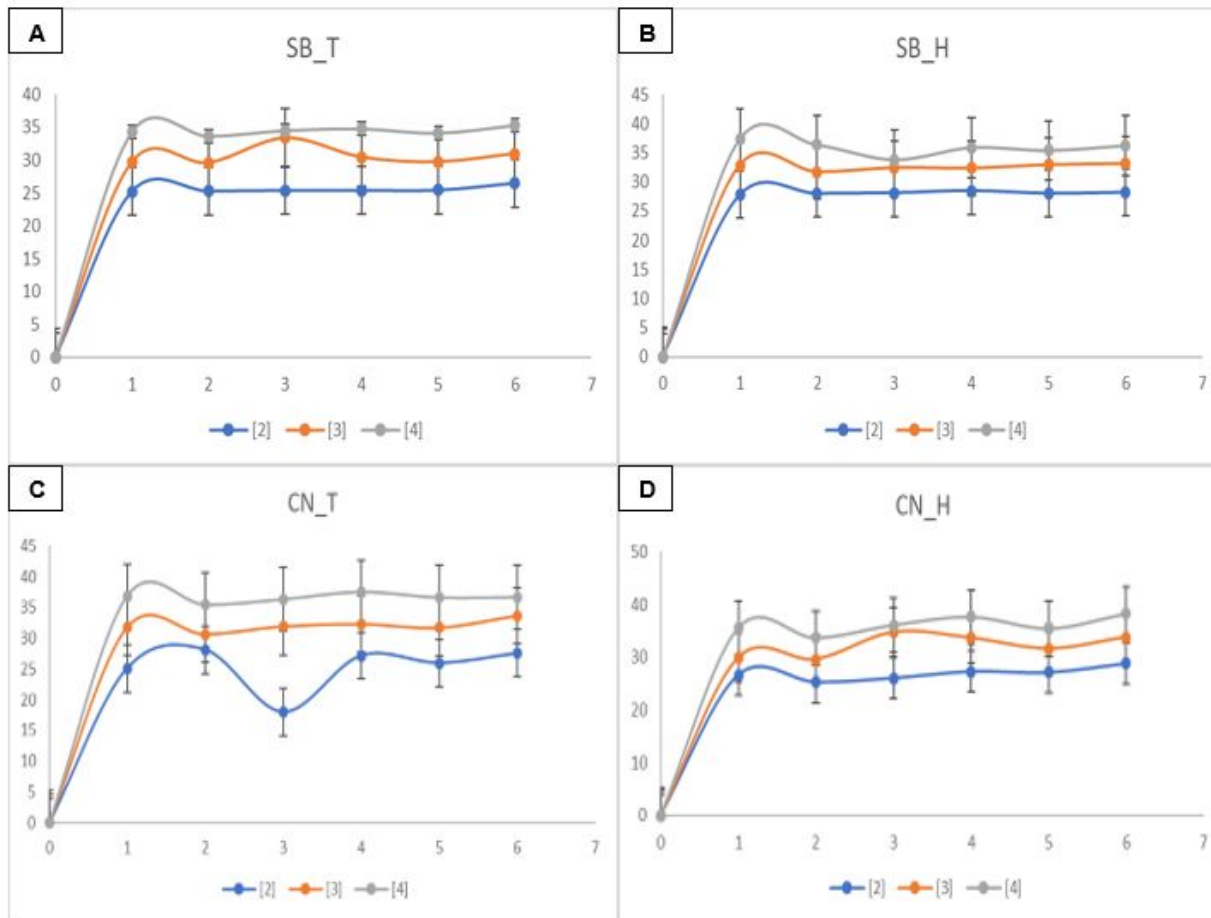
Morfología	Concentración NPs	Método de Siembra	Diámetro del halo de inhibición (mm)	±SD
18H	[2]	PDB_T	13,46	1,17
	[3]		22,61	2,29
	[4]		28,38*	2,14
	[2]	PDB_H	13,64	0,75
	[3]		21,21	2,07
	[4]		26,27*	1,84
	[2]	SE_T	16,16	0,22
	[3]		23,74	1,54
	[4]		31,25*	0,77
	[2]	SE_H	19,14	1,48
	[3]		24,94	3,69
	[4]		35,25*	3,48
28H	[2]	PDB_T	9,24	0,02
	[3]		11,21	0,63
	[4]		13,57*	0,87
	[2]	PDB_H	9,34	0,80
	[3]		11,96	1,25
	[4]		13,94*	0,99
	[2]	SE_T	9,40	0,69
	[3]		10,85	0,74
	[4]		20,52*	7,38
	[2]	SE_H	8,91	0,31
	[3]		10,12	1,09
	[4]		14,13*	1,58

* El valor es significativamente diferente a los demás valores promedio del diámetro del halo de inhibición por la acción de NPs de Cu₂O



Diámetro de inhibición a lo largo del tiempo

Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu_2O aplicadas en *Ralstonia pickettii*

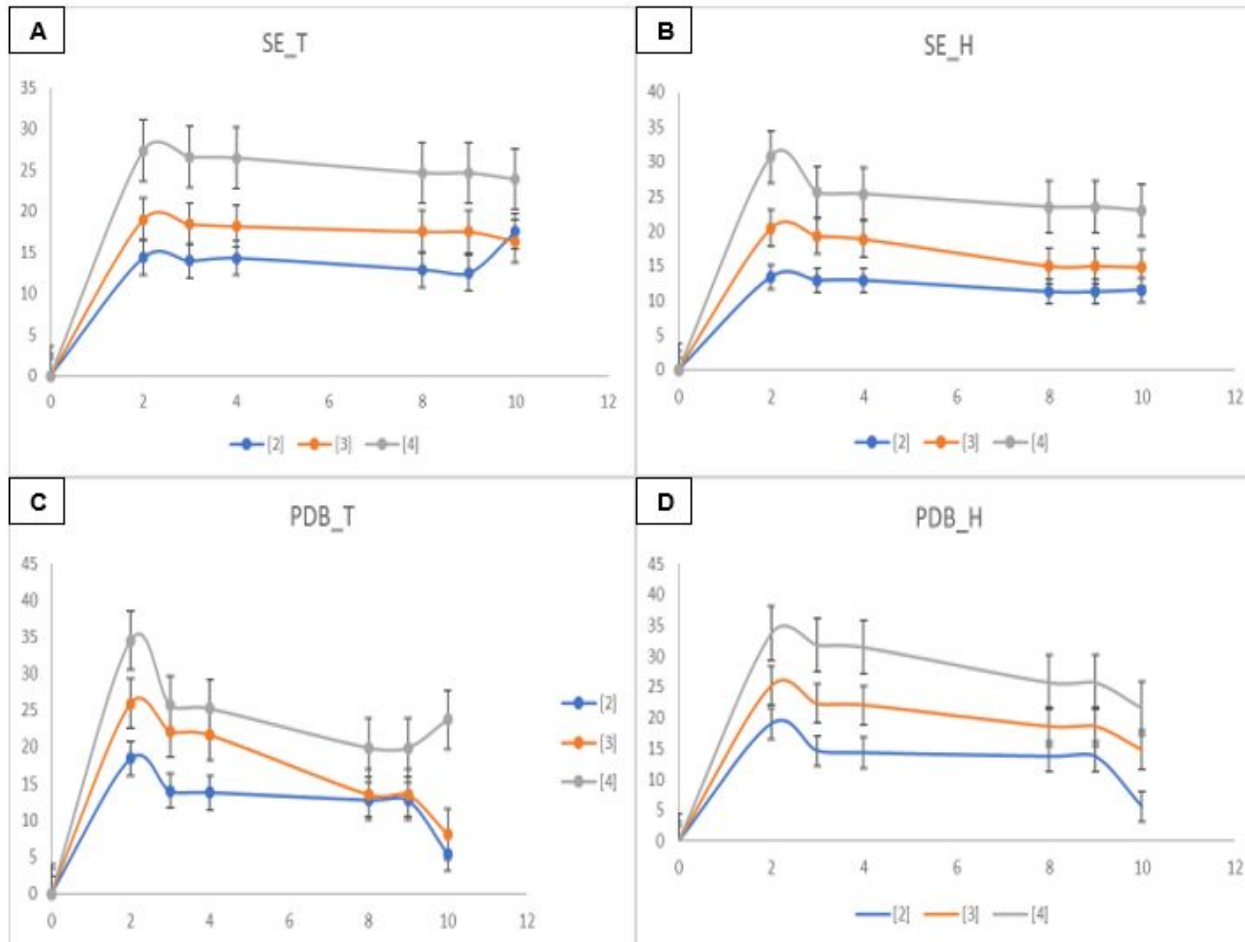


A) solución de bacterias con triángulo (SB_T),
B) solución de bacterias con hisopo (SB_H),
C) caldo nutriente con triángulo (CN_T) y
D) caldo nutriente con hisopo (CN_H).

[1], [2] y [4] corresponde a las concentraciones de NPs de Cu_2O aplicadas 1,49M, 0,245 M, 0,123 M, respectivamente



Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu_2O aplicadas en la morfología 4H

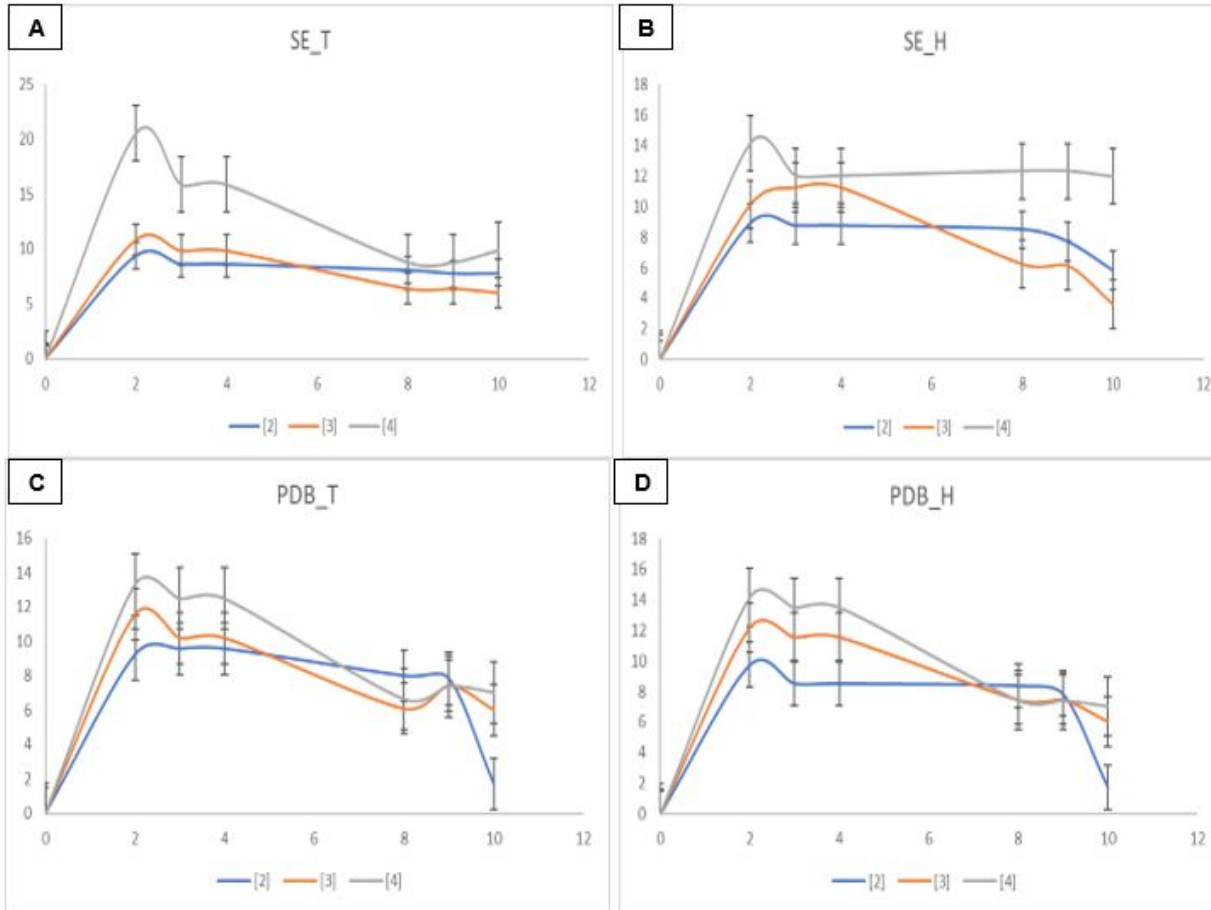


A) suspensión de esporas con triángulo (SE_T), B) suspensión de esporas con hisopo (SE_H), C) caldo PDA con triángulo (PDB_T) y D) caldo PDA con hisopo (PDB_H)

[1], [2] y [4] corresponde a las concentraciones de NPs de Cu_2O aplicadas 1,49M, 0.245 M, 0,123 M, respectivamente



Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu_2O aplicadas en la morfología 5H

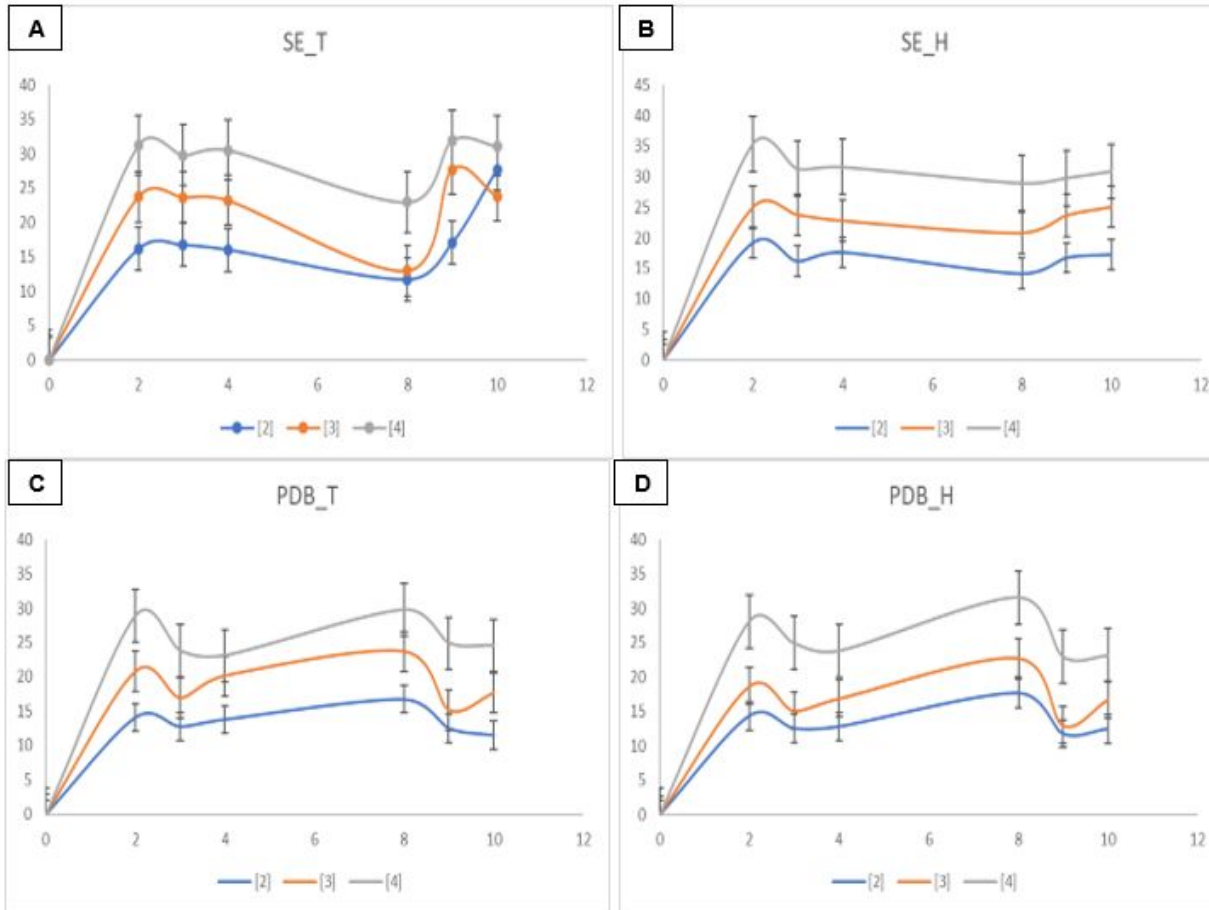


A) suspensión de esporas con triángulo (SE_T), B) suspensión de esporas con hisopo (SE_H), C) caldo PDA con triángulo (PDB_T) y D) caldo PDA con hisopo (PDB_H)

[1], [2] y [4] corresponde a las concentraciones de NPs de Cu_2O aplicadas 1,49M, 0.245 M, 0,123 M, respectivamente



Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu_2O aplicadas en la morfología 13H

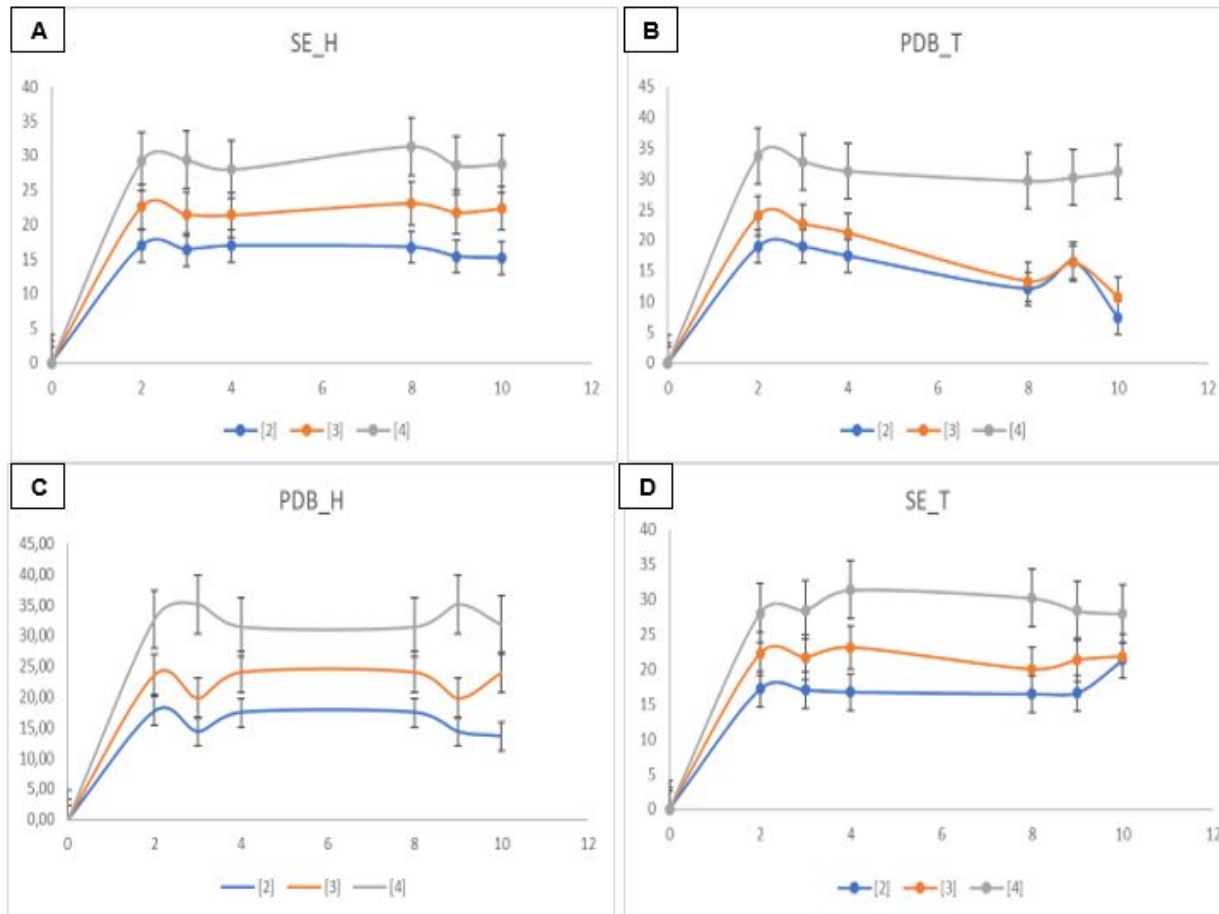


A) suspensión de esporas con triángulo (SE_T), B) suspensión de esporas con hisopo (SE_H), C) caldo PDA con triángulo (PDB_T) y D) caldo PDA con hisopo (PDB_H)

[1], [2] y [4] corresponde a las concentraciones de NPs de Cu_2O aplicadas 1,49M, 0.245 M, 0,123 M, respectivamente



Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu_2O aplicadas en la morfología 18H

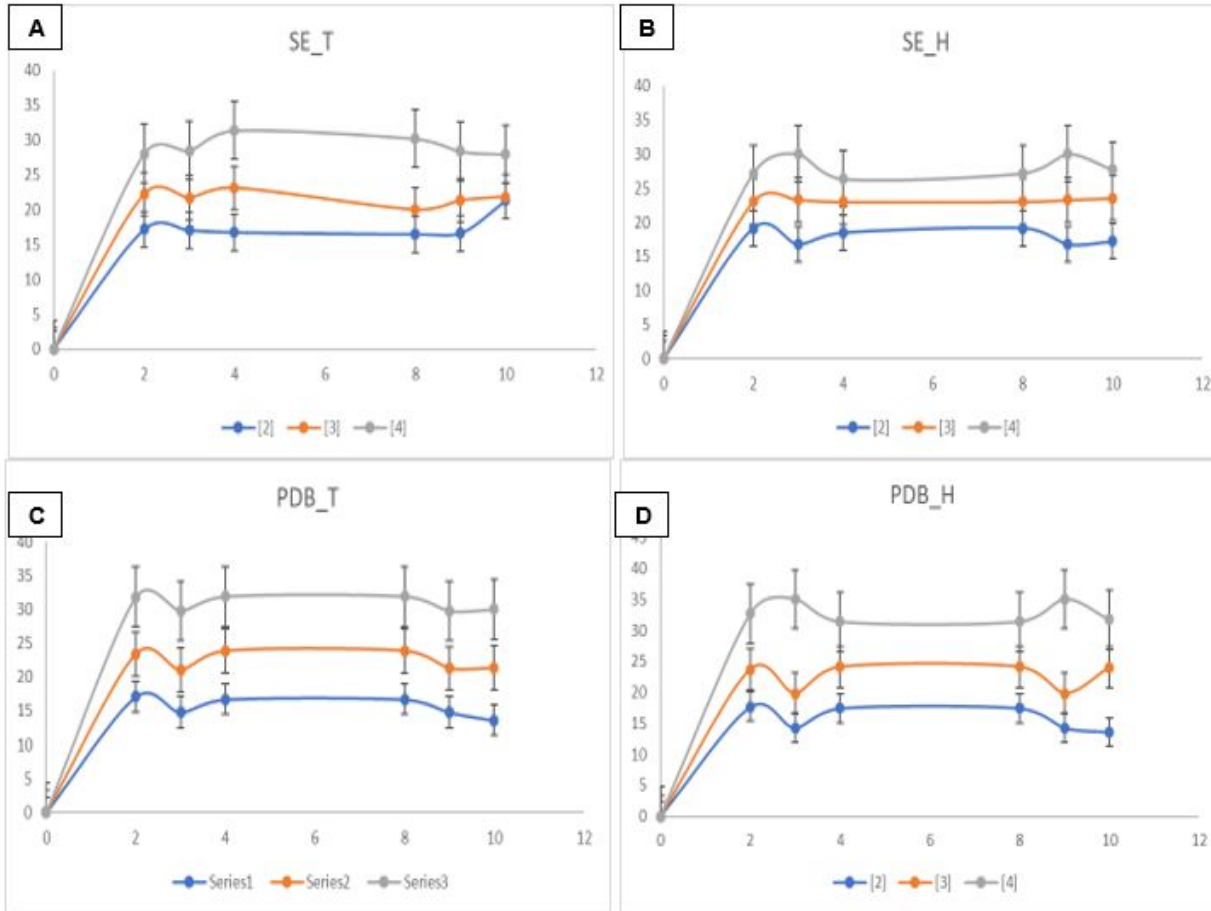


A) suspensión de esporas con triángulo (SE_T), B) suspensión de esporas con hisopo (SE_H), C) caldo PDA con triángulo (PDB_T) y D) caldo PDA con hisopo (PDB_H)

[1], [2] y [4] corresponde a las concentraciones de NPs de Cu_2O aplicadas 1,49M, 0.245 M, 0,123 M, respectivamente



Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu_2O aplicadas en la morfología 28H



A) suspensión de esporas con triángulo (SE_T), B) suspensión de esporas con hisopo (SE_H), C) caldo PDA con triángulo (PDB_T) y D) caldo PDA con hisopo (PDB_H)

[1], [2] y [4] corresponde a las concentraciones de NPs de Cu_2O aplicadas 1,49M, 0.245 M, 0,123 M, respectivamente



CONCLUSIONES

- Se logro sintetizar NPs Cu_2O mediante química verde utilizando extracto de taxo, mediante la confirmación del cambio de color azul intenso a una coloración borgoña/amarillo al obtenerse los óxidos de cobre.
- Se confirmó la formación de las NPs mediante con el equipo UV-Vis obteniéndose un pico máximo de absorbancia del plasmón formado en 455 nm.
- El diámetro hidrodinámico de la NPs fue de $9,8 \pm (0.58)$ nm el mismo que se obtuvo mediante el equipo DLS.
- Se logró caracterizar la NPs mediante la técnica TEM obteniendo una gráfica de la misma a una escala nanométrica que mediante un análisis en FIJI-ImageJ se obtuvo un tamaño de 8,458 nm.
- Se obtuvo una composición elemental de la NPs mediante el equipo SEM-EDS dando como resultado la presencia de cobre, oxígeno y sodio en un 62,03503%, 32,26025% y 5,714713%, respectivamente.
- Se confirmó la composición estructural de NPs de óxido de cobre de fase cúbica con los los picos obtenidos por difracción de rayos X (XRD) (2θ : 29.5440° , 36.3629° , 42.3142° , 61.4016° y 73.6604°) los cuales coinciden con el código de referencia (01-080-7711).



CONCLUSIONES

- Se realizó tres muestreos a partir del hormigón de resistencia media ($f'c= 240$ kg/cm²) de los cuales se aislaron 28 morfologías distintas y mediante un análisis de frecuencia y densidad relativa se escogió a las morfologías más predominantes (dos bacterias y cinco hongos).
- Mediante técnicas independientes de cultivo, como la extracción de ADN y secuenciación masiva NGS se logró identificar a nivel de género y especie las bacterias *Ralstonia pickettii* y *Pseudomonas azotomorfans*.
- La identificación molecular de los hongos queda pendiente por no recibir los resultados de secuenciación de la empresa Biosequence S.A.S.
- Se comprobó que las NPs de Cu de mayor concentración expuestas a los diferentes microorganismos mediante el método de difusión en pozo, presentando un halo de inhibición mayor que las otras concentraciones aplicadas, con una diferencia significativa, analizada por un ANOVA de dos vías y el test de Bonferroni.
- Los diámetros de los halos de inhibición formados por las NPs disminuyen a lo largo del tiempo resultado el cual está relacionado con la baja estabilidad de las mismas.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda analizar y mejorar la estabilidad de las NPs de óxido de cobre por más días, para mejorar la eficiencia.
- Se recomienda analizar la actividad antimicrobiana de las NPs de óxido de cobre sobre los microorganismos restantes aislados del hormigón de resistencia media.
- Realizar ensayos preliminares de aplicación directa sobre el hormigón para la comprobación de la actividad antimicrobiana sobre las biopelículas formadas.

AGRADECIMIENTOS

Andrés Izquierdo, Ph.D.
Director del Proyecto de Investigación

Erika Murgueitio, Ph.D.
Co-directora del Proyecto de Investigación

Carina Stael
Técnica del Laboratorio de CENCINAT

Geovana Arroyo
Técnica del Laboratorio de CENCINAT

Tesistas y pasantes
Laboratorio de CENCINAT

A mis padres y hermanas

Amigas, Amigos

