

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGIA**

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

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

**Autor:** Samantha Mishell Fajardo Cuti

**Director:** Ing. Andrés Izquierdo, PhD.

Sangolqui, 30 de Agosto de 2023

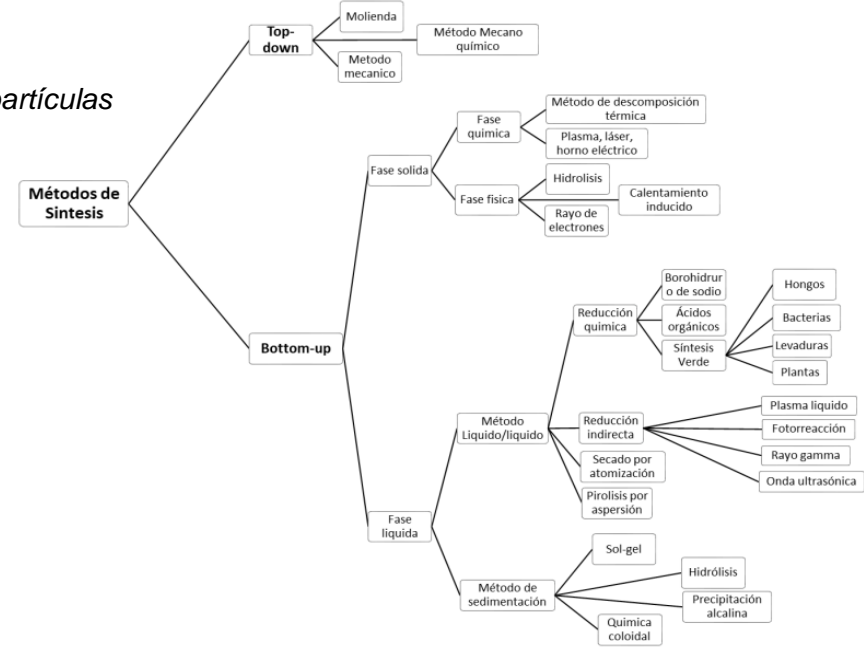


- INTRODUCCIÓN**
- OBJETIVOS**
- MATERIALES Y MÉTODOS**
- RESULTADOS**
- DISCUSIÓN**
- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**
- AGRADECIMIENTO**



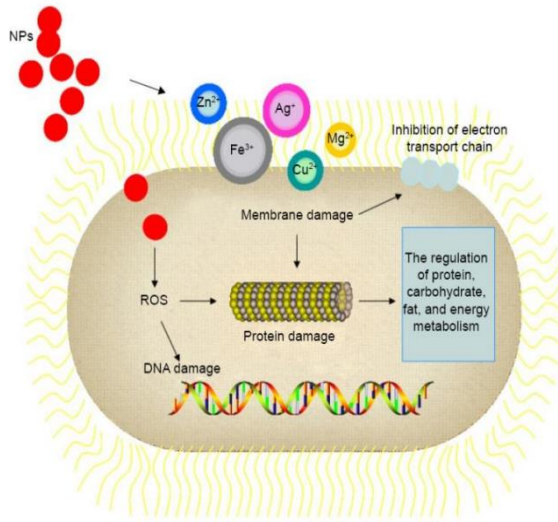
**Figure 1**

*Principales métodos de síntesis de nanopartículas*



**Figure 2**

*Mecanismos de acción de las nanopartículas metálicas en la célula bacteriana*



**Figure 3**

*Manchas en materiales de construcción, por parte de archea y bacterias*



(Gamez, 2022)  
 (Ettenauer et al., 2014).  
 (Ore Payano, 2022)  
 (Ramos Cortez, 2018)



# INDICE DE CONTENIDOS

- INTRODUCCIÓN
- **OBJETIVOS**
- MATERIALES Y MÉTODOS
- RESULTADOS
- DISCUSIÓN
- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
- AGRADECIMIENTO



## 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 la comprobar la actividad antimicrobiana.



## Hipótesis

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



# INDICE DE CONTENIDOS

- INTRODUCCIÓN
- OBJETIVOS
- **MATERIALES Y MÉTODOS**
- RESULTADOS
- DISCUSIÓN
- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
- AGRADECIMIENTO



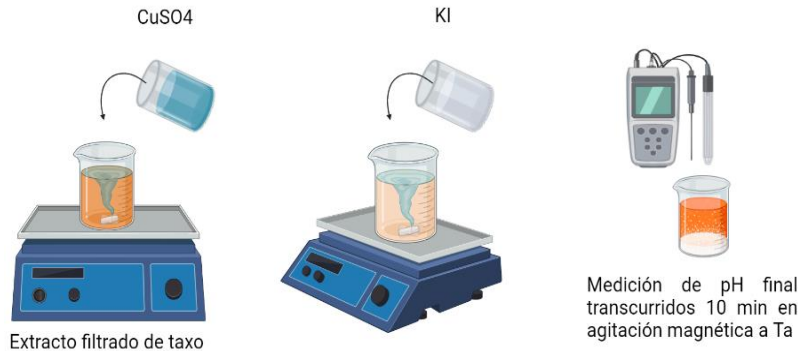
## Preparación del extracto y síntesis

Lavar y secar la fruta

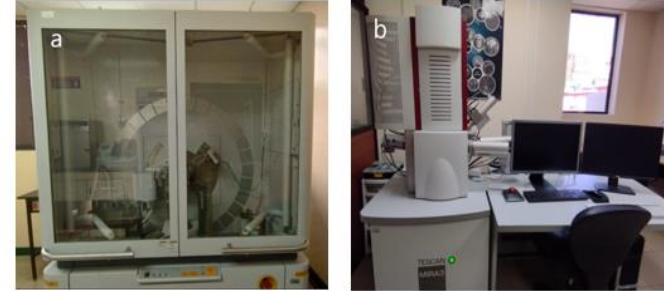
Licuar los arilos y colocar 10 mL de etanol 70% / 5 g de pulpa.

Agitar de forma orbital por 4h.

Filtrar el extracto



## Caracterización de NPs CuI



Espectrofotometro (Thermo Spectronic, GENESYS™ 8)

DLS (HORIBA LB550).

Difractómetro Empyrean (Malvern Panalytical) tubos de rayos de cobre

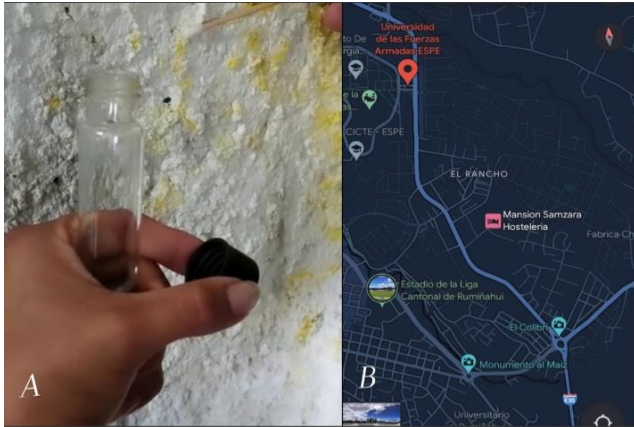
SEM (Mira 3 Tescan)

TEM (FEI Tecnai)

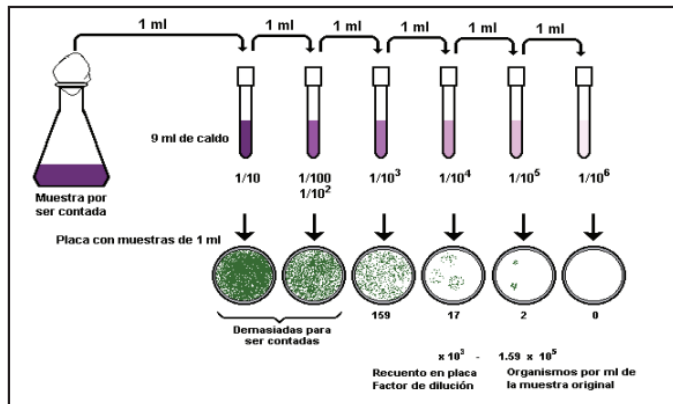




## Sitios de muestreo y siembra



Técnica del hisopado: (Gamez Espinoza, 2022),



## Aislamiento e identificación

Técnica del hisopado (Gámez Espinosa, 2022).

Diluciones seriadas (Arrieta, 2009).

Inoculación de 0,1 mL de c/dilución y directo → PDA y RB.

Incubación de placas a 28°C.



Aislamiento de cepas (M1, M2, M3) en PDA

- M1: ABECEDARIO
- M2: minúsculas
- M3: números cardinales

Identificación macroscópica

- Morfología

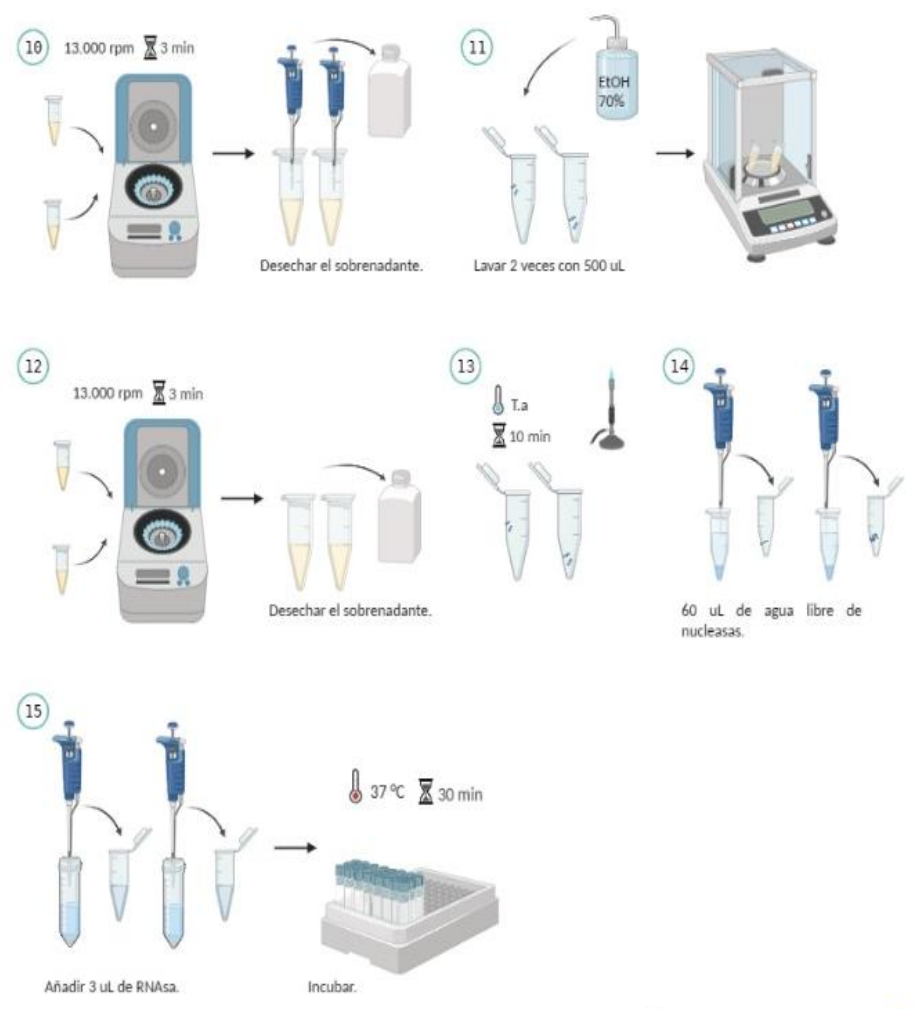
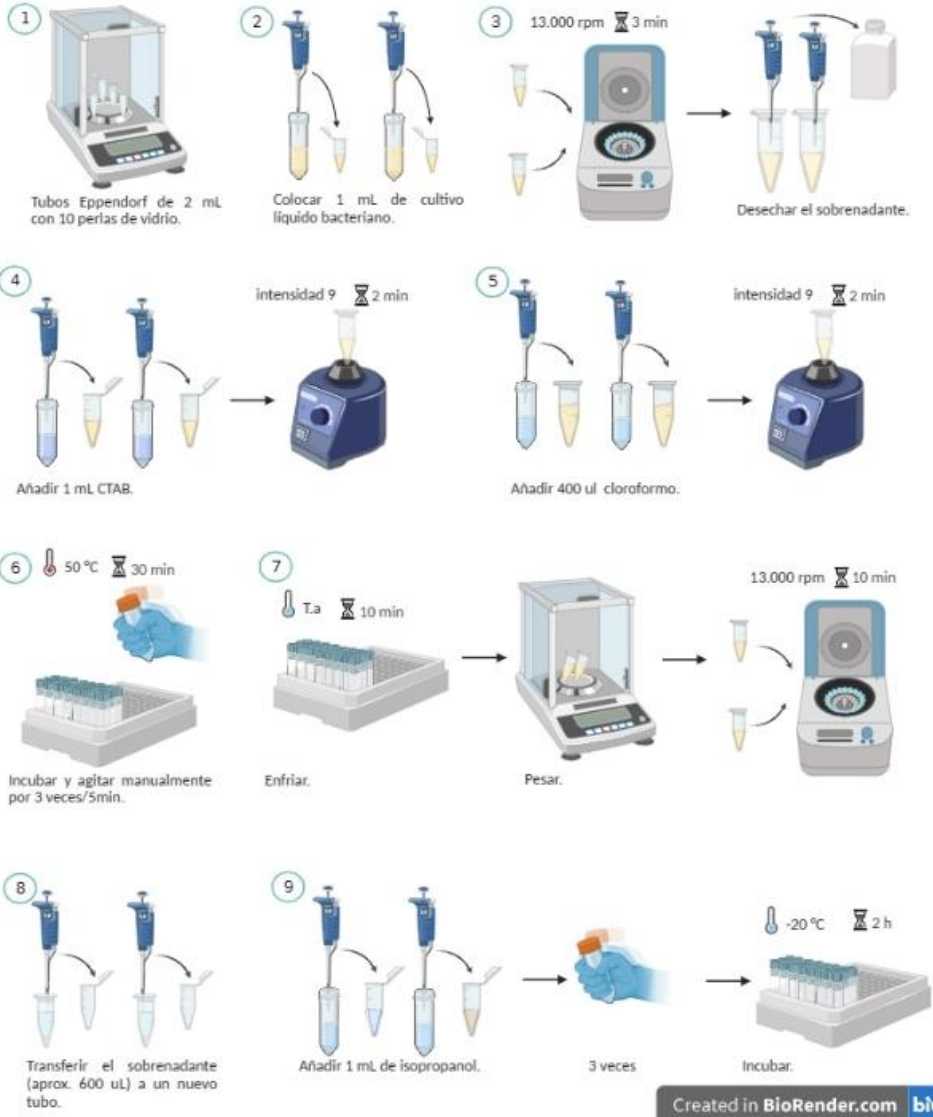
Selección de cepas predominantes

\* Frecuencia relativa c/u

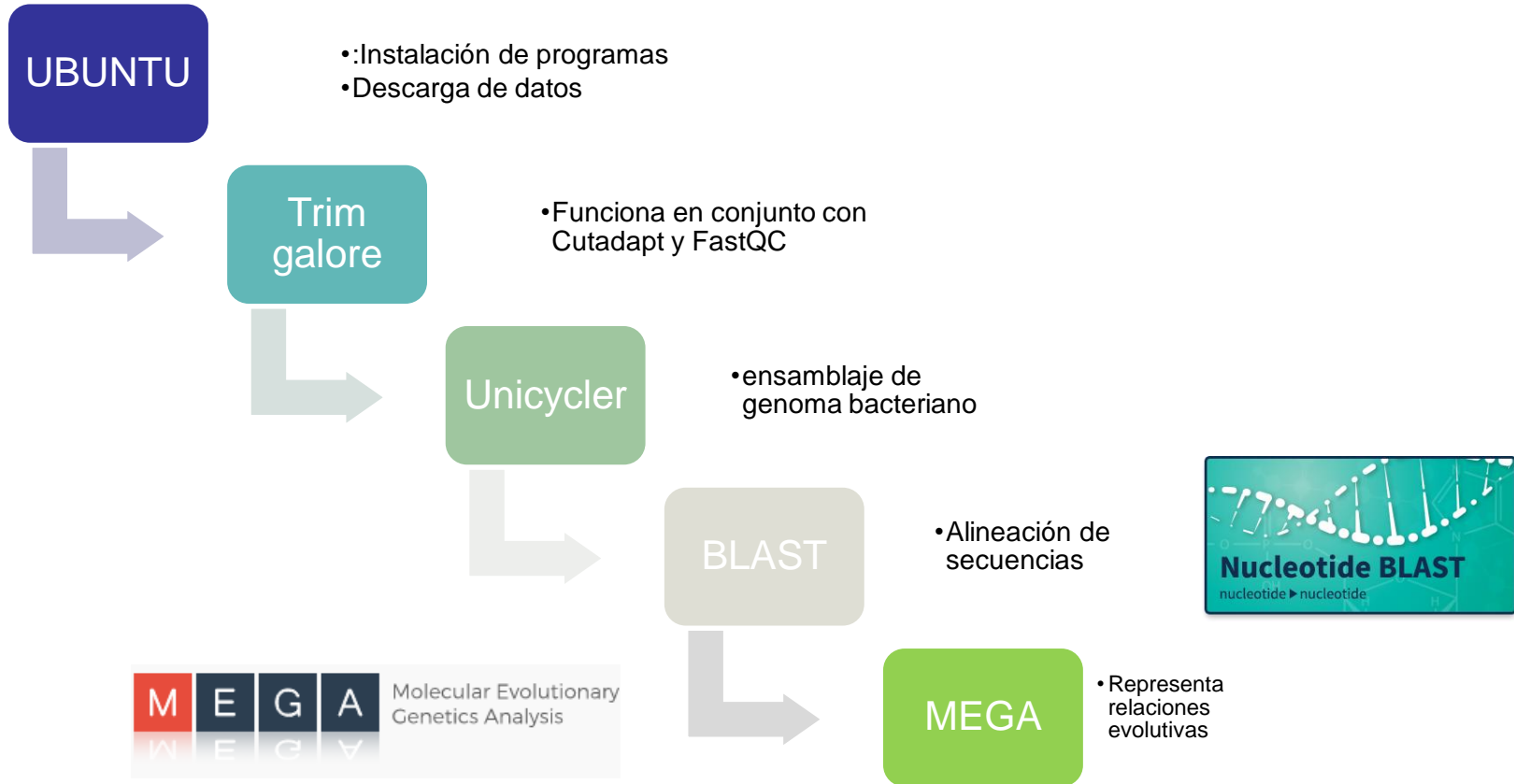
Purificación de cepas



## Extracción y secuenciación

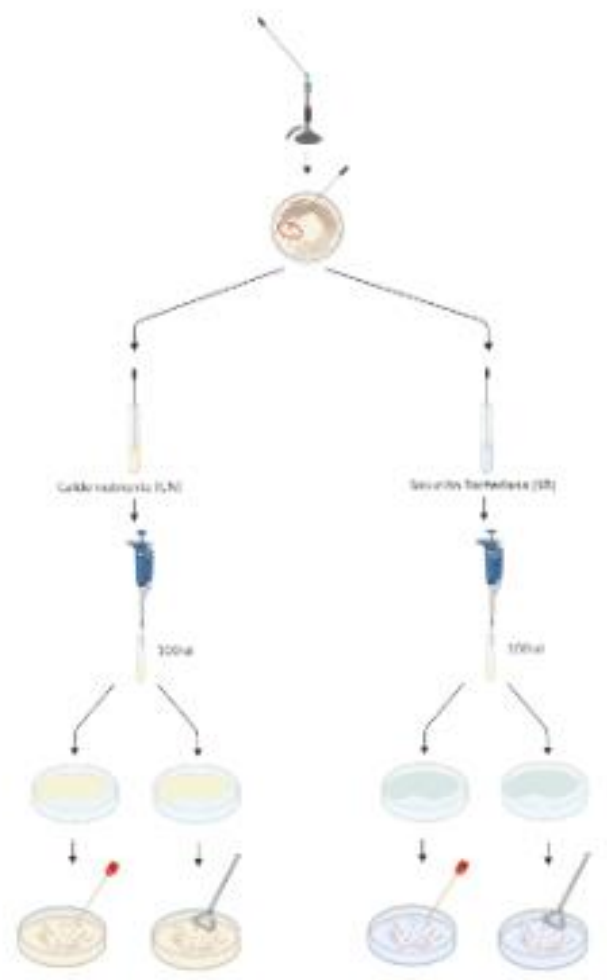


## Identificación molecular de cepas mas predominantes

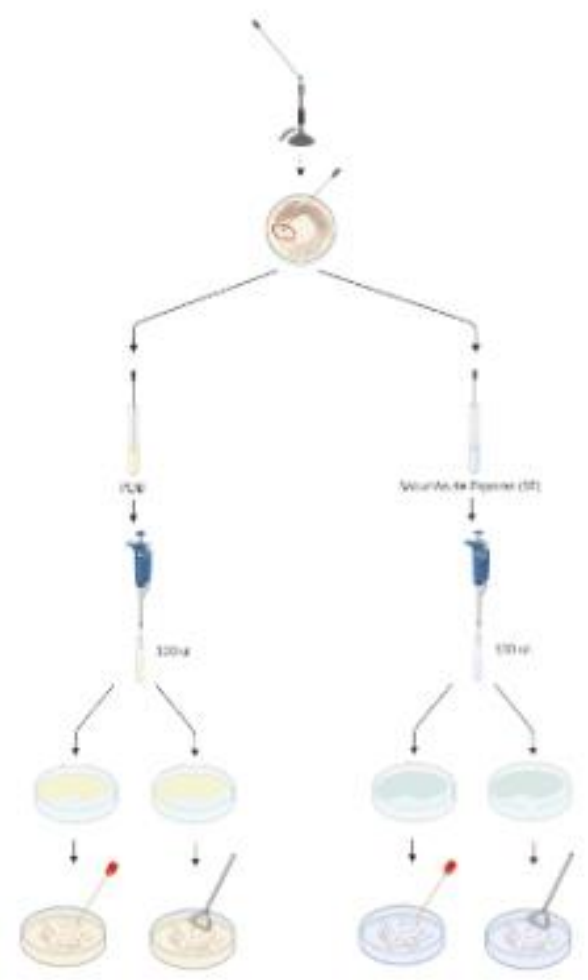


## Aplicación de nanopartículas

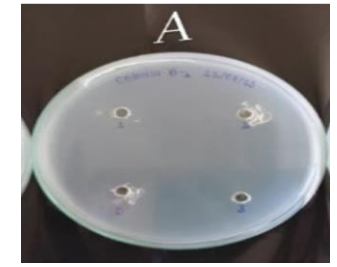
Bacterias (1B – 2B)



Hongos (3-10-13-18-28)H



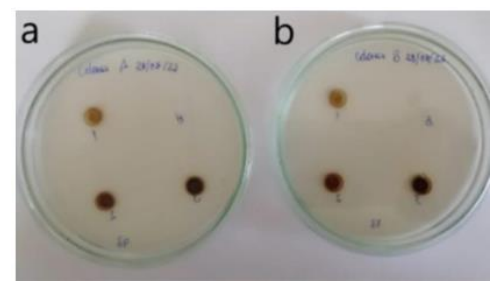
Método de difusión en pozo



Concentraciones alta, media y baja



NPs de Cul aplicadas



## Análisis estadístico

**Tabla 1.**  
Diámetros de inhibición (1B) frente a NPs de Cul, en un tiempo de 6 días

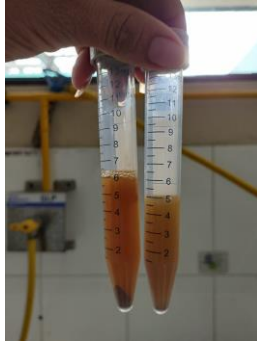
		BACTERIA (1B)											
		Caldo Nutriente (CN)						Solución concentrada (SC)					
Día (h)	Concentracion	Hisopo (H)			Triangulo (T)			Hisopo (H)			Triangulo (T)		
		H1	H2	H3	T1	T2	T3	H1	H2	H3	T1	T2	T3
24	1	16,04	15,56	14,2	21,99	14,13	18,26	24,14	21	20,64	13,96	0	18,69
	2	27,19	24,29	23,33	29,16	23,36	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



- **INTRODUCCIÓN**
- **OBJETIVOS**
- **MATERIALES Y MÉTODOS**
- **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
- **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**
- **AGRADECIMIENTO**

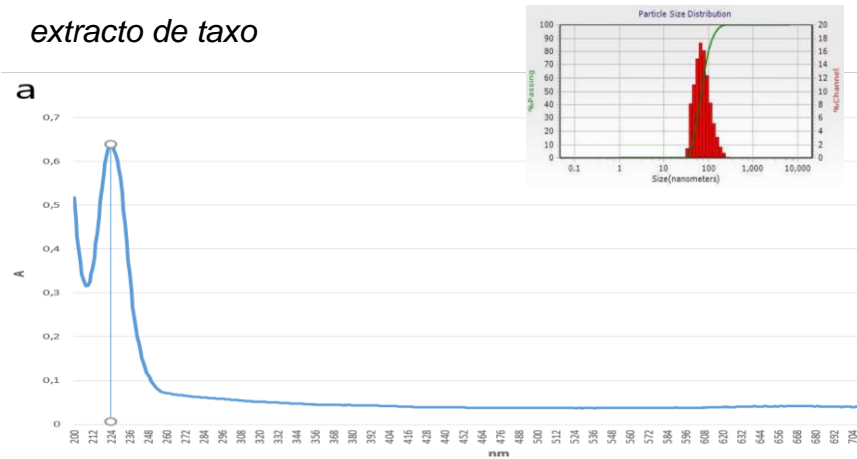
## Síntesis de nanopartículas de yoduro de cobre

1. Cambio de la coloración
2. Formación de precipitado café blanquecino

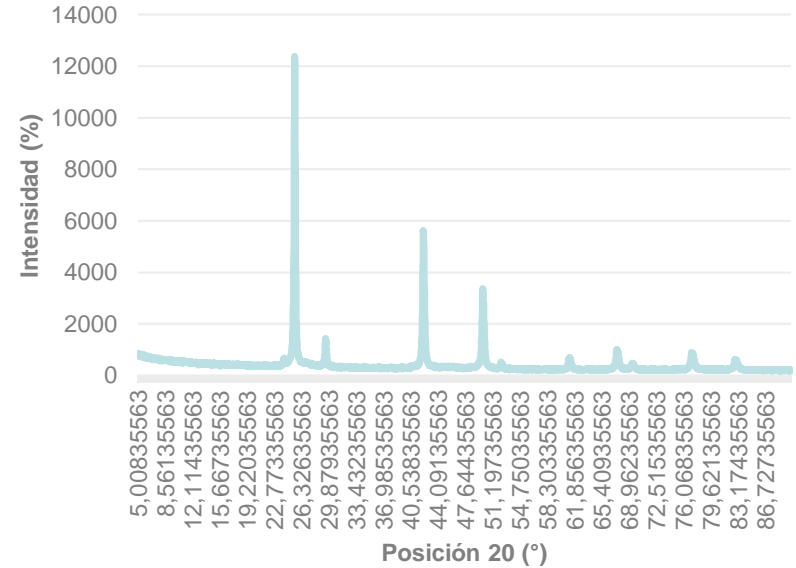


## Caracterización UV-Visible y DLS

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



## Caracterización DRX

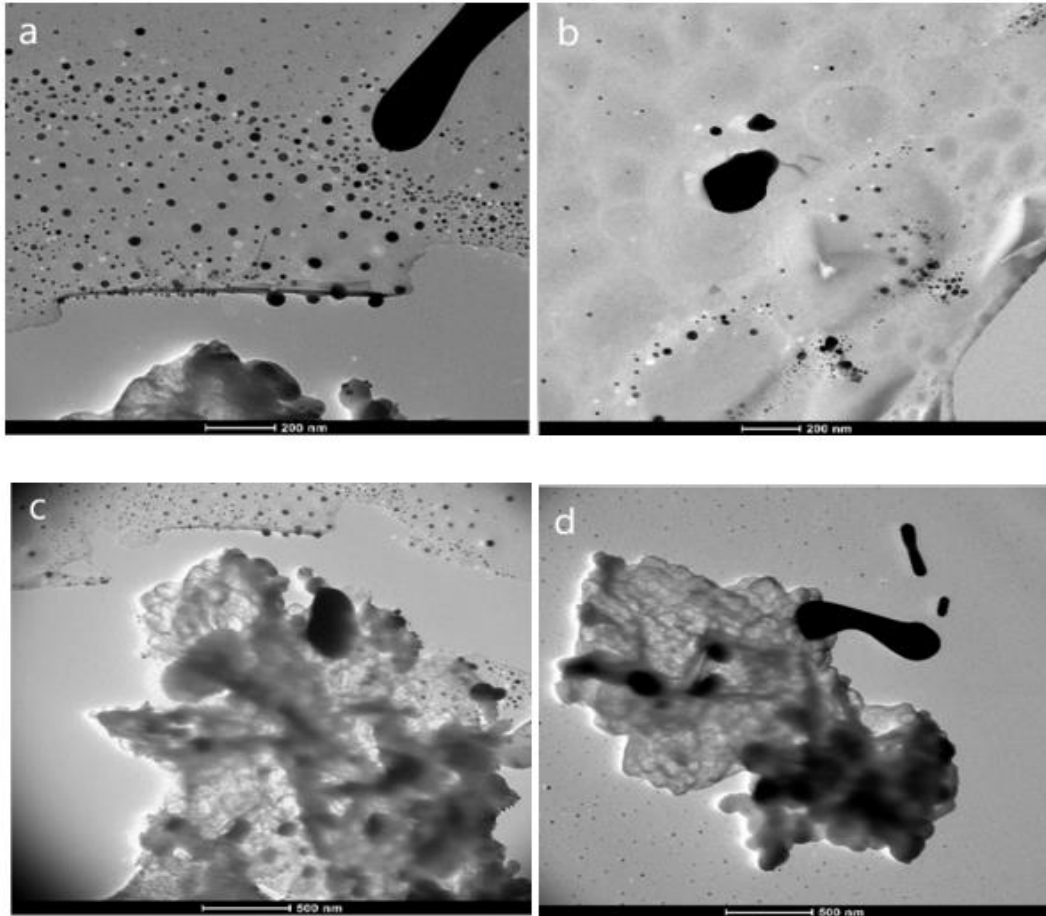


Los picos de difracción (25.42°, 29.43°, 42.16°, 49.90°, 52.29°, 61.17°, 67.35°, 69.31°, 74.71°, 77.12° y 82.77°) y sus posiciones corresponden a la fase cúbica pura establecido en el código de referencia (01-082-2111) con un Score de 92% para el Copper Iodide.



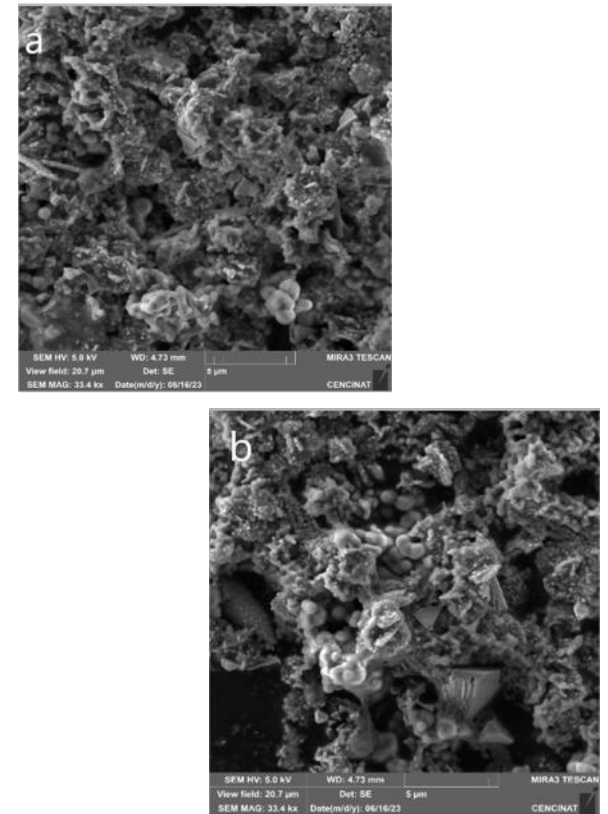
## Caracterización TEM

*Imágenes TEM de las nanoestructuras de Cul*



## Caracterización SEM

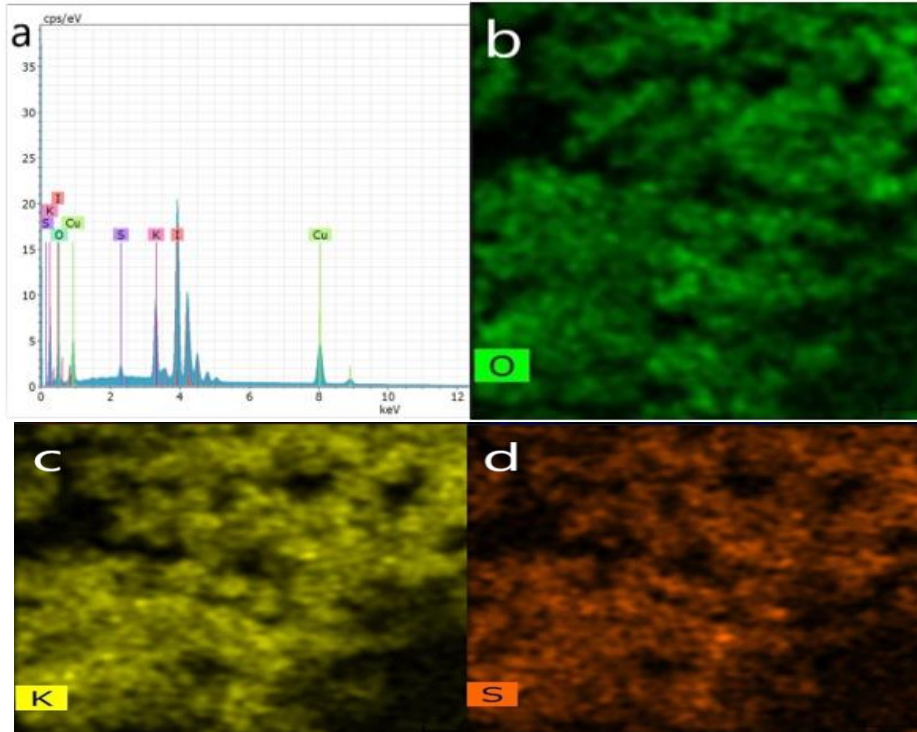
*Las imágenes muestra la morfología superficial en tres dimensiones de las NPs esféricas de Cul analizadas mediante microscopio electrónico de barrido (SEM).*





## Caracterización SEM/EDS

*Pureza química mediante SEM/EDS, muestran la presencia de otros elementos*



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

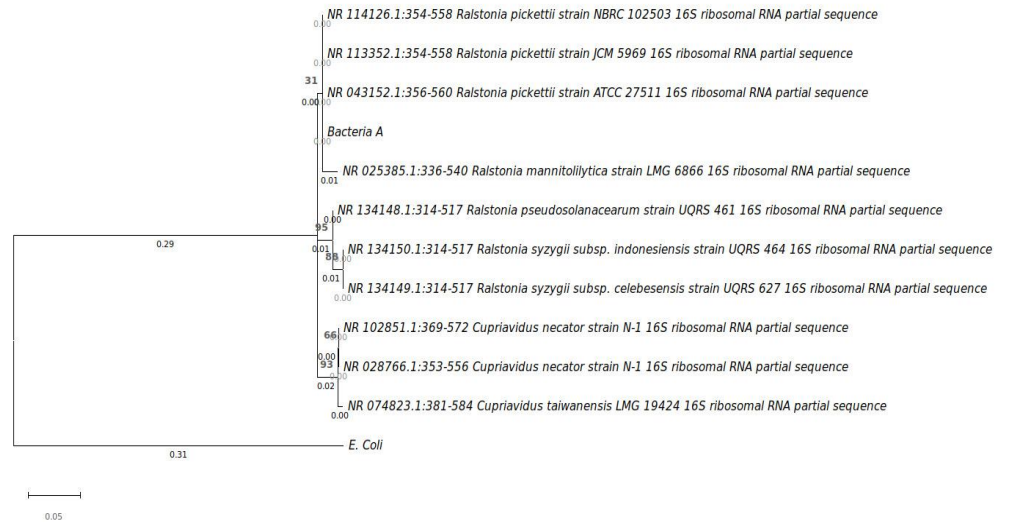
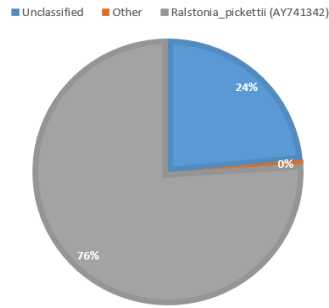
28 cepas diferentes

*Aislamiento y purificación de la colonia predominante*

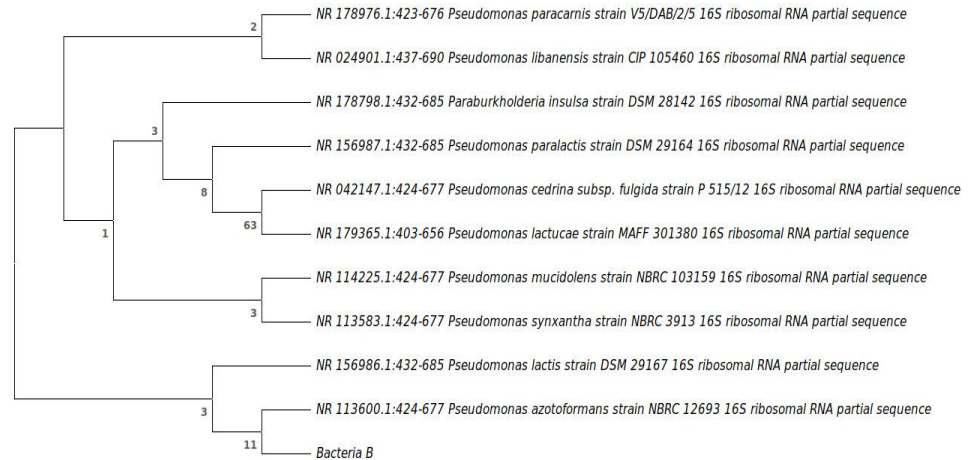


## Identificación molecular

### Identificación molecular de la Bacteria A como *Ralstonia pickettii* (AY741342)

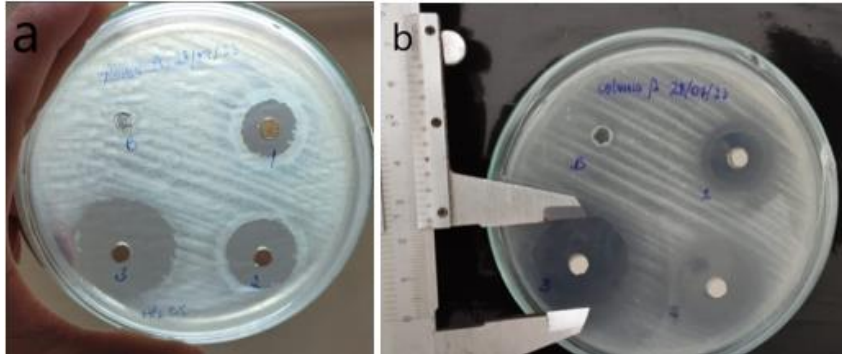


Mediante la secuenciación y el análisis de los arboles filogenéticos, la bacteria 2B pertenecen a *Pseudomonas azotoformans*

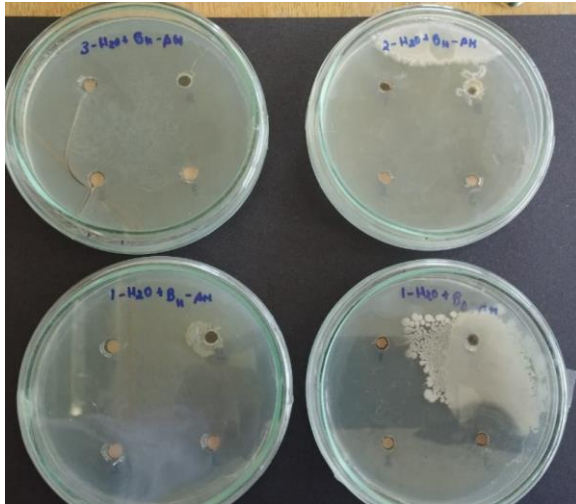


## Evaluación de la actividad antimicrobiana

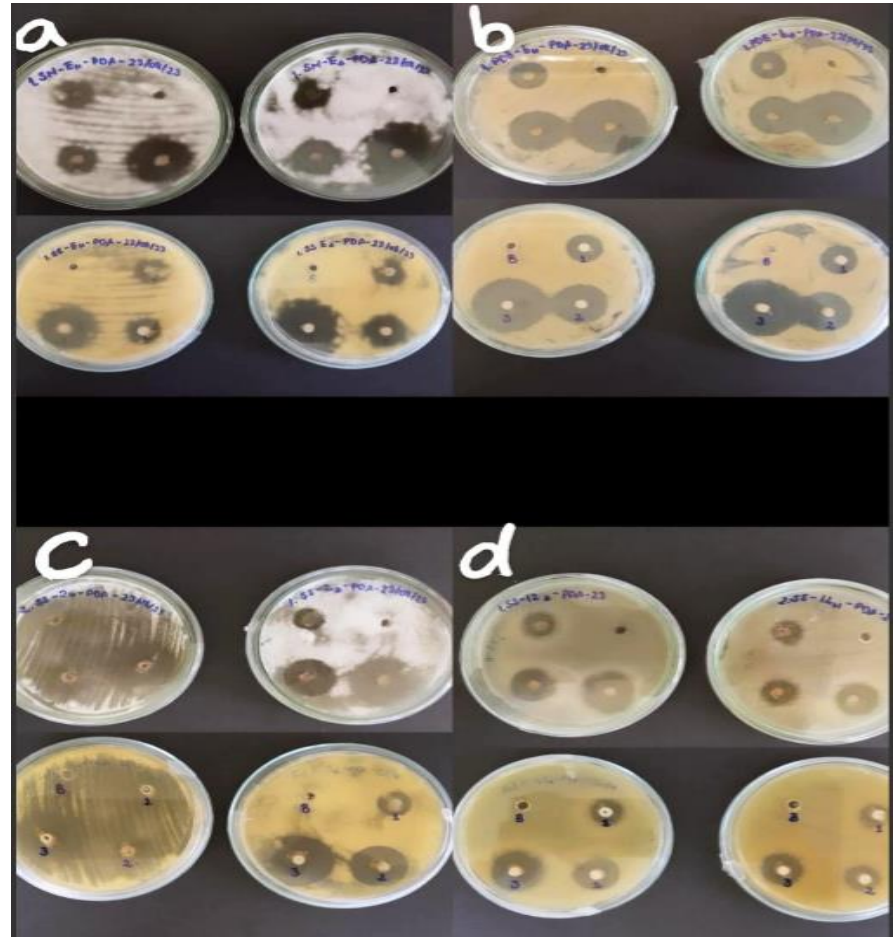
Halos de inhibición en la bacteria 1B *Ralstonia pickettii*



Halos de inhibición en la bacteria 2B



Halos de inhibición frente a los hongos a 72 horas desde la aplicación



a) 10H, b) 13H, c) 18H, d) 28H



Tabla 1

Medias y desviación estándar de las diferentes concentraciones para la bacteria (1B)

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

Diámetros de los halos de inhibición, a partir del inoculo y método de siembra

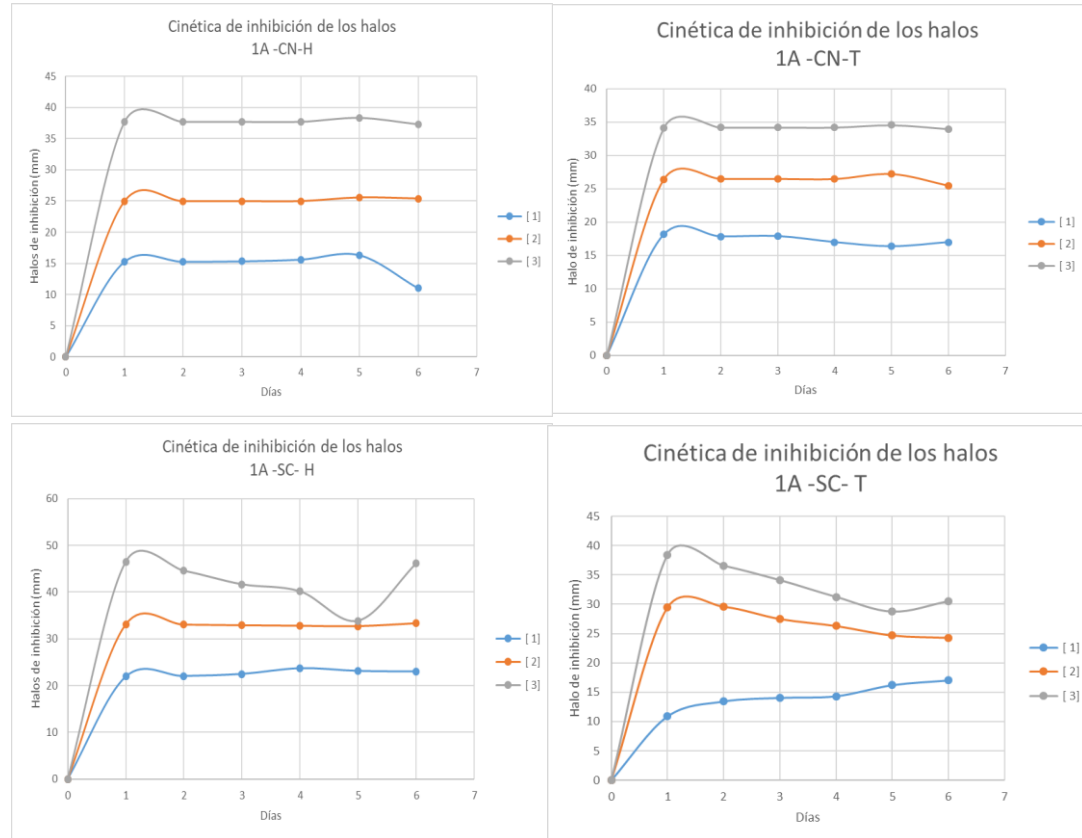
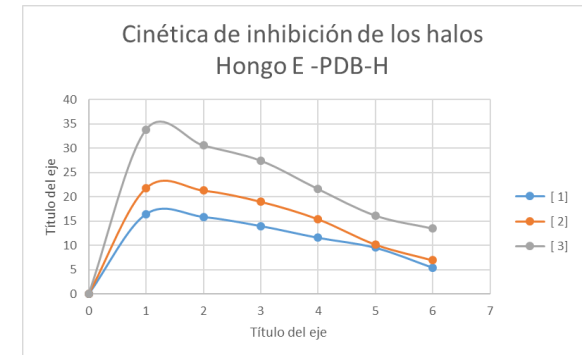
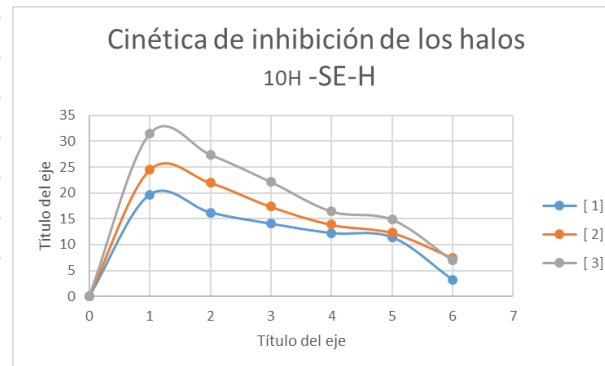
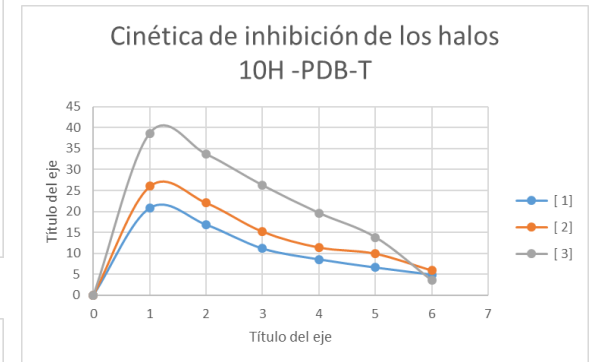
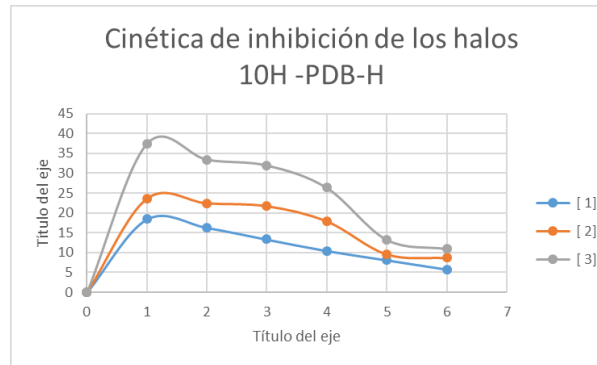


Tabla 2

Medias y desviación estándar de las diferentes concentraciones para la bacteria (1B)

Cepa	[NPs Cul]	n	Metodo de siembra e inoculacio	Diametro promedio (mm)	Desviacion estandar
10H	1	1	PDB-H	10,352	6,355
		2		14,875	8,936
		3		21,922	13,967
	2	1	PDB-T	9,8558	7,152
		2		12,928	9,028
		3		19,354	14,6019
	3	1	SE-H	10,967	7
		2		13,915	8,443
		3		17,017	11,09
	1	1	SE-T	10,421	5,988
		2		13,52	8,167
		3		20,43	11,66



# INDICE DE CONTENIDOS

- **INTRODUCCIÓN**
- **OBJETIVOS**
- **MATERIALES Y MÉTODOS**
- **RESULTADOS**
- **DISCUSIÓN**
- **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**
- **AGRADECIMIENTO**



- ❖ Las NPs de CuI poseen actividad antimicrobiana sobre los microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media, tanto para bacterias como para hongos.
- ❖ Se sintetizaron 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 realizó 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 obtenidas 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 cúbica con los picos obtenidos ( $25.42^\circ$ ,  $29.43^\circ$ ,  $42.16^\circ$ ,  $49.90^\circ$ ,  $52.29^\circ$ ,  $61.17^\circ$ ,  $67.35^\circ$ ,  $69.31^\circ$ ,  $74.71^\circ$ ,  $77.12^\circ$  y  $82.77^\circ$ ) mediante XRD, 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 ( $f'c= 240 \text{ kg/cm}^2$ ), 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.
- ❖ 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 nanopartículas, disminuye a lo largo del tiempo, por lo que se puede deber a la inestabilidad de las mismas.





- **INTRODUCCIÓN**
- **OBJETIVOS**
- **MATERIALES Y MÉTODOS**
- **RESULTADOS**
- **DISCUSIÓN**
- **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**
- **AGRADECIMIENTO**

# AGRADECIMIENTOS



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

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

**Tesistas y pasantes**  
Laboratorio de CENCINAT

**A mis padres y Amigos**

