



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

Padilla Quishpe, Joel Andrés

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo

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

Sangolquí, 25 de agosto del 2023



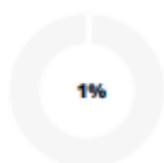
Plagiarism and AI Content Detection Report

PUIC Antiplagio Joel Padilla.docx

Scan details

Scan time: September 4th, 2023 at 20:44 UTC Total Pages: 49 Total Words: 12118

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.5%	59
Minor Changes	0%	1
Paraphrased	0.5%	66
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage		Words
AI text	12.6%	1523
Human text	87.4%	10595

[Learn more](#)

🔍 Plagiarism Results: (5)

🌐 **download** 0.4%

<https://repositorio.unsa.edu.pe/server/api/core/bitstreams/d...>

Pedro Coilla A

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN ESCUELA DE POSGRADO UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y FORMALES...

🌐 **tesis_Karla Maritza Flores Rábago_14 sep 2022.pdf** 0.3%

<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/10...>

Biblioteca CICESE

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de E...

🌐 **T-ESPE-044708.pdf** 0.2%

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/25680/1/t-e...>

Dana Isai Utreras Vinuesa

1 Carátula Aislamiento y evaluación de dos bacterias entomopatógenas como potenciales agentes de biocontrol para Tetranychus urticae en...



ANDRÉS RICARDO
ESQUIBELDO ROMERO



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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 óxido de cobre sobre microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media" fue realizado por el señor Padilla Quishpe, Joel Andres 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



Escaneo digitalizado
firmado electrónicamente

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

C. I. 1714479506



Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo **Padilla Quishpe, Joel Andrés** con cédula de ciudadanía n°1724520083, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Comprobación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de óxido 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

Padilla Quishpe, Joel Andrés

C. I. 1724520083



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Padilla Quishpe, Joel Andrés** con cédula de ciudadanía n°1724520083, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Comprobación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas de óxido 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

.....
Padilla Quishpe, Joel Andrés

C. I. 1724520083

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado con mucho cariño y amor a todas las personas que me apoyaron en este emocionante capítulo de mi vida, sin su apoyo incondicional e inquebrantable no habría sido posible.

A mis padres, Olga y Víctor, por enseñarme la importancia de la dedicación y esfuerzo, por ser aquella fuente para mi inspiración, por sus consejos y constante apoyo que me ha impulsado a alcanzar mis metas personales y académicas.

A mis hermanas y sobrinas, quienes han permanecido a mi lado con su cariño, apoyo incondicional y comprensión ha sido de gran ayuda en los momentos difíciles

A mis amigos, que a lo largo de este viaje académico se ha compartido risas, alegrías y a su vez desafíos, les agradezco por creer en mí, por brindarme momentos de distracción y ser mi red de apoyo.

Agradecimiento

Quiero expresar mi agradecimiento a mis distinguidos tutores Quím. Erika Murgueitio PhD y Andrés Izquierdo PhD, por su orientación, paciencia, dedicación incansable, sus valiosos consejos y conocimientos compartidos.

Al centro de Nanociencia y nanotecnología, por proporcionarme un entorno propicio para la investigación y el aprendizaje.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por la oportunidad de formarme en un entorno académico y de excelencia, construyendo mi camino en la investigación.

A todos mis compañeros de trabajo, amigos, tesisistas y pasantes que han estado a mi lado durante este proceso, por su apoyo moral, que han contribuido significativamente con su colaboración y esfuerzo. Su trabajo en equipo ha enriquecido enormemente mis experiencias y resultados.

Índice de Contenido

Informe de originalidad	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Abreviaturas	15
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Planteamiento del problema	18
Justificación del problema.....	19
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Hipótesis.....	20
Capítulo II: Marco Teórico.....	21
Biodeterioro	21
Biodeterioro de materiales de construcción.....	22
Microorganismos asociados en el biodeterioro de materiales	23
Control del biodeterioro	25

Nanopartículas	25
Nanopartículas metálicas	27
Métodos de síntesis de nanopartículas	27
Síntesis verde de nanopartículas	28
Nanopartículas de cobre	29
Actividad antimicrobiana de nanopartículas de óxido de cobre	30
Caracterización de nanopartículas	31
Espectrofotometría UV-Vis	32
Dynamic Light Scattering (DLS)	33
Técnicas de microscopía electrónica	34
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	34
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	34
Difracción de rayos X (XRD)	35
Aislamiento e Identificación de Microorganismos	36
Aislamiento de microorganismos	36
Identificación de microorganismos	36
Comprobación de la actividad antimicrobiana	37
Método de difusión en pozo	37
Capítulo III: Metodología	37
Materiales y preparaciones	37
Preparación del extracto a partir de pulpa de taxo	37

	10
Síntesis verde de NPs de Oxido de cobre.....	38
Caracterización de las NPs de óxido de cobre	39
Determinación de absorbancias de las NPs de Cu ₂ O mediante UV-Vis.....	39
Determinación del tamaño de las NPs de Cu ₂ O mediante DLS	40
Análisis de la estructura cristalina de las NPs Cu ₂ O	40
Análisis de la morfología de las NPs Cu ₂ O.....	41
Aislamiento e identificación de microorganismos.....	42
Fase de campo	42
Fase de laboratorio.....	43
Análisis filogenético	46
Actividad antimicrobiana de las NPs Cu ₂ O.....	46
Diámetro del halo de inhibición a lo largo del tiempo	47
Análisis estadístico.....	48
Capítulo IV: Resultados	49
Síntesis de NPs de Cu ₂ O con extracto de taxo.....	49
Caracterización de nanopartículas de óxido de cobre	49
Análisis del espectro UV-Vis de las NPs de Cu ₂ O.....	49
Análisis del tamaño hidrodinámico (DLS).....	50
Análisis de la estructura cristalina de las NPs Cu ₂ O	51
Análisis de la morfología de las NPs de Cu ₂ O.....	53
Concentración de las NPs de Cu ₂ O.....	57

Aislamientos e identificación de microorganismos.....	57
Selección de los microorganismos más predominantes	60
Identificación molecular de los microorganismos	62
Análisis filogenético.....	63
Actividad antimicrobiana de las NPs de Cu ₂ O	66
Diámetro del halo de inhibición a lo largo del tiempo	71
Capítulo V: Discusión.....	78
Capítulo VI: Conclusiones	81
Capítulo VII: Recomendaciones	83
Capítulo VIII: Bibliografía	84

Índice de tablas

Tabla 1. Microorganismos biodeteriógicos.....	24
Tabla 2. Potenciales de reducción estándar de metales en disolución.....	30
Tabla 3. Métodos y técnicas comunes para la caracterización de nanopartículas.....	32
Tabla 4. Estabilidad y tamaño hidrodinámico de las NPs de Cu ₂ O.....	51
Tabla 5. Lista de picos y posiciones [2θ] para las NPs Cu ₂ O.....	52
Tabla 6. Lista de patrones elegidos.....	53
Tabla 7. Cuantificación de ADN.....	62
Tabla 8. Microorganismos próximos a la bacteria 1B.....	64
Tabla 9. Microorganismos próximos a la bacteria 2B.....	65
Tabla 10. Diámetro del halo de inhibición de los microorganismos más predominantes aislados de un hormigón de resistencia media por acción de NPs de Cu ₂ O.....	68

Índice de Figuras

Figura 1. Etapas de formación de biopelículas sobre una superficie	23
Figura 2. Métodos de obtención de nanopartículas	26
Figura 3. Principales metodologías para la síntesis de nanopartículas	28
Figura 4. Mecanismo de las especies reactivas de oxígeno	31
Figura 5. Espectro referencial del UV-visible de nanopartículas de Cu ₂ O	33
Figura 6. Patrón de XRD de nanopartículas de Cu ₂ O	35
Figura 7. Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre.....	39
Figura 8. Sitio de muestreo y hormigón de resistencia media	43
Figura 9. Diluciones seriadas y siembra por el método de extensión en placa	44
Figura 10. Síntesis de NPs de Cu ₂ O por química verde.....	49
Figura 11. Espectro UV-Vis de las NPs de Cu ₂ O	50
Figura 12. Patrón de difracción de rayos X (XRD) para las NPs de Cu ₂ O.....	52
Figura 13. Micrografía electrónica de transmisión de las NPs de Cu ₂ O	54
Figura 14. Análisis del tamaño de las NPs de Cu ₂ O mediante ImageJ-FIJI	55
Figura 15. Mapeo elemental de Cu, O ₂ y Na de las NPs de Cu ₂ O.....	56
Figura 16. Análisis elemental de las NPs de Cu ₂ O determinado por EDS.....	57
Figura 17. Muestreos directos y por diluciones.....	58
Figura 18. Aislamientos y purificaciones de microorganismos.	59
Figura 19. Frecuencia relativa y densidad relativa de los microorganismos aislados ..	60
Figura 20. Morfología de los microorganismos más predominantes	61
Figura 21. Visualización de Índice PCR previa secuenciación.....	63
Figura 22. Cladograma de microorganismos homólogos a la bacteria 1B.....	65
Figura 23. Cladograma de microorganismos homólogos a la bacteria 2B.....	66
Figura 24. Comprobación de la actividad antimicrobiana de las NPs de Cu ₂ O.....	67

Figura 25. Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu ₂ O aplicadas en <i>Ralstonia pickettii</i>	72
Figura 26. Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu ₂ O aplicadas en la morfología 4H.....	73
Figura 27. Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu ₂ O aplicadas en la morfología 5H.....	74
Figura 28. Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu ₂ O aplicadas en la morfología 13H.....	75
Figura 29. Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu ₂ O aplicadas en la morfología 18H.....	76
Figura 30. Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu ₂ O aplicadas en la morfología 28H.....	77

Abreviaturas

NPs: Nanopartículas

NPsCu: Nanopartículas de cobre

CuO: Óxido Cúprico

Cu₂O: Óxido Cuproso

DLS: Dynamic light scattering

UV-Vis: Espectroscopía ultravioleta visible

XRD: Difracción de rayos X

TEM: Microscopio electrónico de transmisión

SEM: Microscopio electrónico de barrido

EDS: Espectrómetro de energía dispersiva

ADN: Ácido desoxirribonucleico

SNGs: Secuenciación de siguiente generación

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Resumen

Este proyecto de integración curricular buscó comprobar la actividad antimicrobiana de nanopartículas de óxido de cobre sobre microorganismos aislados de un hormigón de resistencia media. Para ello se sintetizó y caracterizó las nanopartículas obtenidas por química verde utilizando un extracto de taxo como agente reductor mediante las técnicas y equipos UV-Vis, DLS, TEM, SEM-EDS y XRD, para identificar su reflectancia, tamaño, dispersión, forma, aglomeración, composición, fase y cristinabilidad. Se realizaron tres muestreos en un hormigón de resistencia media mediante la técnica del hisopado, de los cuales se aisló los microorganismos presentes mediante técnicas dependientes de cultivo y se seleccionó los microorganismos más predominantes mediante la frecuencia y densidad relativa para su identificación por técnicas moleculares como la secuenciación de siguiente generación. Se evaluó la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de óxido de cobre aplicando 50 μ L de tres concentraciones de las NPs (0.49 M, 0.245 M y 0.123 M) sobre los microorganismos más predominantes mediante la técnica de difusión en pozo aplicando 4 metodologías diferentes de siembra tanto para las bacterias como para los hongos partiendo de diferente inóculo con siembra por extensión con un asa Drigalsky e hisopo. Mediante la técnica de UV-Vis se observó que las NPs obtuvieron un pico del plasmón en 455 nm, además de un tamaño hidrodinámico de $9.8 \pm (0.58)$ nm medido con el DLS. De acuerdo a las imágenes TEM las NPs presentan un tamaño de 8.458 nm, por otro lado, se identificó que las NPs presentan una fase cubica, los ángulos difracción de ángulo 2θ : 29.5256° , 36.3698° , 42.2601° , 61.3648° y 73.5237° y con un score del 83% una similitud con Cu_2O medido con el XRD y un análisis SEM-EDS que permitió reconocer la composición elemental de las NPs (Cu: 62,03503%, O_2 :32,26025% y Na: 5,714713%). Finalmente, se evidencio la actividad antimicrobiana de las NPs de Cu_2O sobre los microorganismos más predominantes.

Palabras claves: Nanopartículas, Cu_2O , difusión en pozo, Antimicrobiana

Abstract

This curricular integration project sought to verify the antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles on microorganisms isolated from a medium strength concrete. To this end, the nanoparticles obtained by green chemistry were synthesized and characterized using a taxo extract as a reducing agent using UV-Vis, DLS, TEM, SEM-EDS and XRD techniques and equipment, to identify their reflectance, size, dispersion, shape, agglomeration, composition, phase and cristinality. Three samplings were carried out in a concrete of medium resistance by means of the swab technique, from which the microorganisms present were isolated by culture-dependent techniques and the most predominant microorganisms were selected by frequency and relative density for identification by molecular techniques by next-generation sequencing. The antimicrobial capacity of copper oxide nanoparticles was evaluated by applying 50 μ L of three concentrations of NPs (0.49 M, 0.245 M and 0.123 M) on the most predominant microorganisms by means of the well diffusion technique applying 4 different planting methodologies for both bacteria and fungi starting from different inoculum with sowing by extension with a Drigalsky handle and swab. Using the UV-Vis technique it was observed that the NPs obtained a plasmon peak at 455 nm, in addition to a hydrodynamic size of $9.8 \pm (0.58)$ nm measured with the DLS. According to the TEM images the NPs have a size of 8.458 nm, also by XRD it was identified that the NPs have a cubic phase, the angle diffraction angles 2θ : 29.5256° , 36.3698° , 42.2601° , 61.3648° and 73.5237° and with a score of 83% a similarity with Cu_2O and a SEM-EDS analysis that allowed to recognize the elemental composition of the NPs (Cu: 62.03503%, O2: 32.26025% and Na: 5.714713%). The antimicrobial activity of Cu_2O NPs on the most predominant microorganisms was evidenced.

Keywords: Nanoparticles, Cu_2O , well diffusion, Antimicrobial

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

El deterioro de materiales de construcción (hormigón, cemento, piedra) se considera una problemática global debido al costo que implica a propietarios de edificios y fabricantes (Romani et al., 2022). La mayoría de los materiales de construcción pueden llegar a ser susceptibles a la colonización por microorganismos, los cuales forman biopelículas sobre la superficie de los materiales que a largo plazo mediante diversos factores y reacciones bioquímicas conducen a una degradación del material (Gulotta et al., 2018) (Zhgun et al., 2020).

Este fenómeno indeseable de cambios en las propiedades físicas y químicas de un material producido por la actividad vital de las comunidades microbianas de bacterias, hongos y algas se conoce como biodeterioro (Liu et al., 2020). Una vez que la biopelícula crece se observan cambios sobre la superficie de los materiales generando grietas profundas y el aumento de la porosidad (Romani et al., 2022). Además, los factores ambientales como la humedad, temperatura, radiación solar, conducen de forma directa o indirecta al debilitamiento y descomposición más rápido acelerando los procesos en el biodeterioro (Li et al., 2018) (Pena et al., 2018).

A lo largo de los siglos se ha implementado el uso de procedimientos mecánicos aplicando aceites o ceras para tratar este fenómeno natural, por otra parte, en la modernidad se han desarrollado tratamientos basados en limpiadores de alta presión, el uso de biocidas, que si bien, estas técnicas poseen el beneficio de limpieza, estos llegan a tener numerosas limitaciones como la rápida recolonización donde los microorganismos se vuelven más resistentes a los químicos (Dongpeng et al., 2022) (Joseph, 2021).

Justificación del problema

Se han documentado de que el uso de biocidas es perjudicial para el medio ambiente, así como también para la salud humana, estos compuestos antiincrustantes en su gran mayoría son ecotóxicos y que a largo plazo generan contaminación del suelo y aguas (Romani et al., 2022). Por ello, para el uso de este tipo de sustancias existen regulaciones y limitaciones en la comercialización. Uno de los principales inconvenientes es que se les otorga una resistencia a los microorganismos a estos agentes químicos (Dresler et al., 2017) (Fidanza y Caneva, 2019).

Es por ello que debido a esta problemática asociada al uso de este tipo de sustancias tóxicas, se llegó a la necesidad de desarrollar nuevas técnicas con diversos enfoques para la obtención de nuevos compuestos que permitan reducir o eliminar el biodeterioro, además de que sean seguros y amigables con el medio ambiente (Arreche y Vázquez, 2020). Entre las alternativas destaca la aplicación y uso de nanopartículas de cobre como agente para el control del biodeterioro (Fouda et al., 2019) (Barberia et al., 2019).

La síntesis de nanopartículas tradicional conlleva el uso de diversos compuestos químicos que suelen llegar a ser efectivos pero tóxicos (Sathiyavimal et al., 2018). Por tal razón, se busca implementar el uso de nanopartículas de óxido de cobre obtenidas por síntesis verde para el control del deterioro de los materiales estructurales por efecto de los microorganismos y minimizar el impacto en la salud humana, en el área ambiental y en el ámbito económico (Mohamed, 2020) (Murinzi et al., 2018). Asimismo, reconocer la eficacia y la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas mediadas por síntesis verde y química.

Objetivos de la Investigación

Objetivo general

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

Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de óxido de cobre mediante química verde, para su posterior caracterización con los equipos UV-Vis y DLS.
- Caracterizar las nanopartículas de óxido de cobre mediante las técnicas de TEM, SEM y DRX, para la medición de su 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 óxido de cobre obtenidas sobre los microorganismos mediante el método de difusión en pozo, para la comprobación de su actividad antimicrobiana.

Hipótesis

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

Capítulo II: Marco Teórico

Biodeterioro

El biodeterioro o la corrosión influenciada microbiológicamente (MIC) hace referencia a los cambios indeseables que se generan sobre un material y que son provocados por la actividad deteriorante de microorganismos (Pyzik et al., 2021). Los diversos microorganismos como las bacterias, hongos, arqueas y microalgas colonizan la superficie de los materiales formando biopelículas (biofilms) que interactúan y sostienen acciones metabólicas funcionando como catalizadores geomicrobianos, siendo así como se generan diversos daños irreversibles para los materiales debido a las actividades vitales microbianas como la división celular, producción de ácidos, actividades redox, diversos mecanismos que conducen a la degradación a largo plazo de los materiales (Liu et al., 2022) (Romani et al., 2021).

La colonización por parte de los microorganismos sobre cualquier superficie de un material depende de diversos fenómenos químicos y físicos, como rugosidad de la superficie, la porosidad, la absorción del agua, propiedades iónicas, actividad fotoquímica (Falkiewics-Dulik et al., 2015). Además, existen diversos factores en los que se apoya el biodeterioro, entre los cuales integran una interacción compleja entre factores ambientales (humedad, temperatura, radiación solar), factores meteorológicos y el efecto del clima (Zhgun et al., 2020) (Gámez Espinosa et al., 2020).

El primer problema relacionado con la colonización microbiana tiene que ver con el aspecto antiestético (Grabek et al., 2017). De acuerdo a la industria de materiales de construcción las biopelículas formadas por los microorganismos en primera instancia son imperceptibles, ya que con el tiempo se vuelven visibles dando como resultado estructuras gruesas y pigmentas lo que produce la modificación, pérdida de características y la formación de grietas en la superficie y de forma profunda, lo que conduce a un aumento de la porosidad de muchos de los materiales (Liu et al., 2020). El coste de procesos de restauración materiales

deteriorados como descontaminación de depósitos infectados o salas es alto lo que implica pérdidas económicas, es por ello que las industrias de materiales invierten en diversas estrategias para evitar esta problemática (Ituen et al., 2020).

Biodeterioro de materiales de construcción

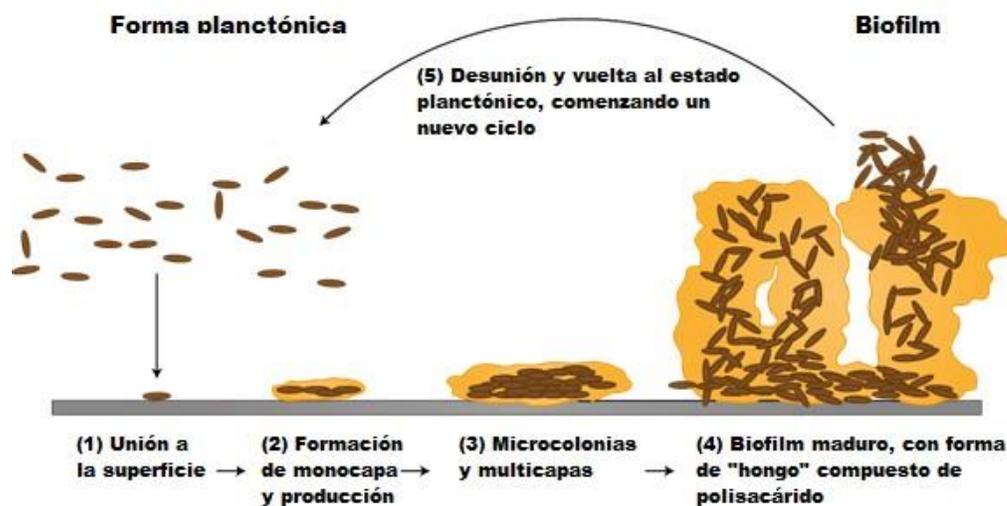
Diversos materiales de construcción como el hormigón, el cemento, la piedra y la cerámica son propensos al biodeterioro por diversos factores, entre los que resaltan la forma y conformación química del material, condiciones climáticas y el mantenimiento de las superficies (Romani et al., 2021) (Falkiewics-Dulik et al., 2015). Se ha observado que los microorganismos contribuyen a los fenómenos de deterioro en el hormigón, esto debido a los entornos húmedos y la capacidad de formar biopelículas en los espacios porosos del material de construcción (Bridier et al., 2017).

Los microorganismos que se encuentran dentro de una biopelícula tienden a sobrevivir a ambientes hostiles como la desecación, baja concentración de nutrientes, cambios de temperatura, radiación UV (Flemming et al., 2016). Estas interacciones entre célula y ambiente es impulsada por las interacciones entre las diversas especies que forman la biopelícula, para la formación de la biopelícula como se muestra en la figura 1, inicia con la creación de una capa de acondicionamiento compuesta por sustancias orgánicas (polisacáridos y proteínas) sobre las superficies que aún no han sido colonizadas, posteriormente las células microbianas de los diversos microorganismos se adhieren a las sustancias orgánicas debido a factores como su tamaño y carga negativa mediante diversas interacciones inespecíficas como fuerzas hidrofóbicas, electrostáticas y de Van der Waals. En un paso consiguiente, las células se unen firmemente a la superficie obteniéndose una matriz compuesta por sustancias poliméricas extracelulares (EPS), por tanto, se generan acumulaciones de microorganismos formando de

esta forma interacciones de coagregación, y finalmente la dispersión de células de la biopelícula lo que de esta forma permite la colonización de nuevas superficies (Pinna D. , 2021)

Figura 1.

Etapas de formación de biopelículas sobre una superficie



Nota. Tomado de Crecimiento microbiano y sus efectos sobre materiales patrimoniales inorgánicos: Microorganismos en el deterioro y preservación del patrimonio cultural (p 3-35), por Pinna, D., 2021, Springer, Cham.

Microorganismos asociados en el biodeterioro de materiales

De acuerdo a Mittelman (2018), diversos tipos de microorganismos (bacterias, hongos y algas) contribuyen al daño y desgaste de un material de construcción, por otro lado, la temperatura, el pH, la humedad relativa, composición química del material son parámetros que propician un ambiente para que crezca el microorganismo. Las bacterias tienen la capacidad de formar biopelículas en entornos húmedos dentro de los poros del material de construcción, debido a los diversos requerimientos vitales de las bacterias esto hace que su presencia pueda ser limitada. Sin embargo, existen ciertas bacterias que pueden intervenir en el deterioro del

material como las bacterias quimioheterótrofas (*Bacillus sp* y *Myxococcus sp*), proteobacterias y actinobacterias (Pinna D. , 2021).

Los materiales con una alta porosidad son más susceptibles a una colonización por parte de hongos, que van desde organismos unicelulares hasta organismos micelares grandes, los colonizadores primarios comprenden especies de *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Erotium* ya que son capaces de crecer en áreas que tengan una actividad del agua por debajo de 0.8, además, se pueden generar colonizaciones por diversas cianobacterias en dependencia de la alcalinidad del hormigón (Pinna et al., 2018). En la tabla 1 se muestran los microorganismos considerados como biodeteriogenos que están involucrados en la degradación de distintos materiales.

Tabla 1.

Microorganismos biodeteriogenos.

Bacterias	Hongos
<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> ,	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> ,
<i>Blastococcus sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> ,	<i>Penicillium sp.</i> , <i>Coniosporium sp.</i> ,
<i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Nitrobacter sp.</i> , <i>P</i>	<i>Alternaria sp.</i> , <i>Capnobotryella sp.</i> , <i>Sar</i>
<i>seudomonas sp.</i> ,	<i>cinomyces sp.</i> ,
<i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Staphylococcus s</i>	<i>Rhizopus sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i>
<i>p.</i> , <i>Streptomyces sp.</i>	

Nota. La tabla muestra los distintos microorganismos asociados con el biodeterioro de diversos materiales de construcción. Recuperado de The Bad and the Good-Microorganisms in Cultural Heritage Environments-An Update on Biodeterioration and Biotreatment Approaches, por Pyzik et al., 2021, *Materials*, 14(1), 177.

Control del biodeterioro

Para el control del deterioro causado por acción de los microorganismos frecuentemente se utilizan estrategias preventivas y curativas contra este tipo de biocolonización como la limpieza física-mecánica de la biopelícula o la aplicación de biocidas activos de amplio espectro (Kakakhel et al., 2019). Sin embargo, la aplicación de estos productos tiene impactos negativos tanto en el medio ambiente como en la salud humana, así como también, una posible interferencia con los materiales (Correa et al., 2020).

Los biocidas se definen como agentes químicos que permiten prevenir la colonización de los microorganismos, los cuales en su gran mayoría se basan su producción en métodos químicos (Fidanza y Caneva, 2019). En los últimos años, se han implementado nuevas legislaciones acerca del uso de diversos compuestos químicos como derivados halogenados y aromáticos, estos agentes químicos como el triclosán o los fenil-mercuriales son muy cuestionados por su toxicidad, por lo que en la actualidad ya no están permitidos (Barberia-Roque et al., 2019). Es por ello que se ha visto la necesidad la utilización de sustancias o metodologías alternativas y ecológicas que reduzcan o eliminen dichos impactos que generan este tipo de productos (Dongpeng et al., 2022). Esto ha dado lugar la producción de diversas combinaciones más eficientes como nanoaditivos bioactivos, recubrimientos líquidos iónicos, nanomateriales y nanopartículas metálicas (Femilaa et al., 2020).

Nanopartículas

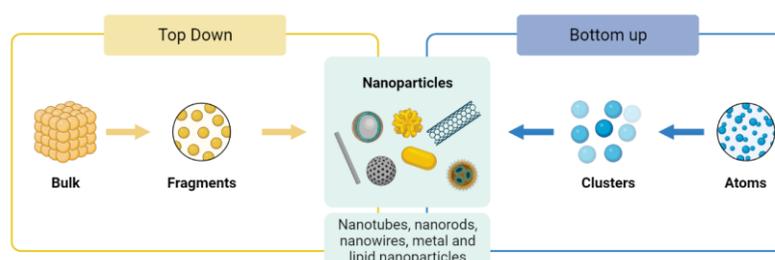
En el ámbito de la nanotecnología, aquellas partículas que tengan un tamaño mayor a 1 y menor a 100 nanómetros se definen como nanopartículas (NPs) (Mallakpour y Jarahiyan, 2017). Las NPs al ser de diversas clases de materiales, y debido a la química superficial, el tamaño y la forma, tienen una gran importancia ya que pueden influir en diversas propiedades fisicoquímicas, ópticas, catalíticas, magnéticas y/o electrónicas (Tao et al., 2021).

Existen varios métodos para la obtención de NPs, los cuales se dividen en dos principales clases, el enfoque Bottom up y el enfoque Top Down (Islam et al., 2022). Como se muestra en la figura 2, la síntesis Top Down implica un enfoque destructivo, es decir, que se descompone una molécula grande en partículas más pequeñas hasta llegar al tamaño adecuado de una nanopartícula y se realiza por diversas técnicas de descomposición como la molienda, deposición química de vapor, de posición física de vapor, entre otras (Saurabh et al., 2021). Por otro lado, la síntesis Bottom Up mantiene un enfoque de construcción, es decir, que las NPs se forman a partir de sustancias simples como elementos a escala atómica que forman a partir de los denominados “clusters” (Roy et al., 2021). Este tipo de síntesis poseen ciertas ventajas en el tamaño y la forma en comparación con el enfoque Top Down, además, la distribución, carga y morfología de las partículas dependen del polímero que se utilice y la técnica de síntesis (Indiaro et al., 2022).

Para que la elaboración de las NPs mantenga la forma, dimensión, morfología y química superficial, se deben controlar varias condiciones experimentales para sus síntesis como el tiempo de reacción, la temperatura, la concentración de los reactivos para que la fabricación sea precisa, eficiente y mantenga la estabilidad (Galati et al., 2017).

Figura 2.

Métodos de obtención de nanopartículas



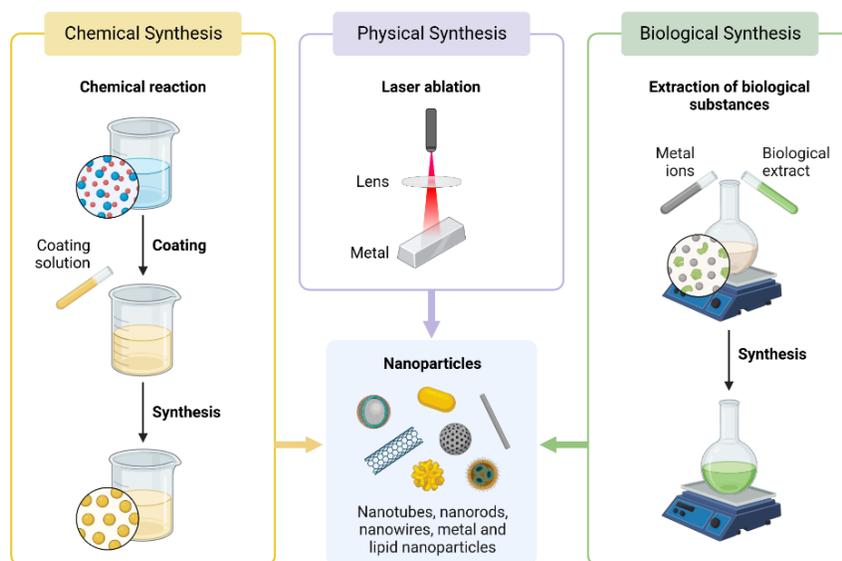
Nota. En la figura se muestra los enfoques Top Down y Bottom up para la obtención de nanopartículas.

Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas son consideradas una alternativa novedosa que permite controlar la colonización de microorganismos, debido a que poseen un alto potencial de desinfección, prevención del biodeterioro (Eyssautier et al., 2023). Las NPs metálicas poseen diversas propiedades optoelectricas únicas debido a las características de resonancia de plasmones superficiales (Khan et al., 2019). Las NPs provenientes de precursores de metales alcalinos o nobles como el cobre (Cu), Plata (Ag) y Oro (Au), poseen una banda de absorción amplia en la región visible del espectro electromagnético solar, y poseen grandes energías superficiales (Medici et al., 2021).

Métodos de síntesis de nanopartículas

Existen diversas metodologías para la síntesis de nanopartículas entre ellos se encuentra los métodos físicos, métodos químicos, métodos de ablación laser, métodos de precipitación química, métodos de irradiación, métodos sol-gel (Akintelu et al., 2021). En la figura 3 se muestra una representación de una comparativa de los tres principales métodos utilizados para la síntesis de diversos tipos de nanopartículas. Se conoce que tiene una aplicación mucho más amplia en cuestión a los métodos de síntesis físicos y químicos (Parashar et al., 2020). Sin embargo, existe diversos efectos adversos asociados a estos tipos de métodos de síntesis de NPs, entre ellos los elevados costos, procesos minuciosos, la producción de subproductos tóxicos que generan preocupaciones de impacto ambiental y pueden tener efectos tóxicos en los seres humanos (Cerchier et al., 2017).

Figura 3.**Principales metodologías para la síntesis de nanopartículas**

Nota. En la figura se muestra una representación comparativa de los tres métodos químicos, físicos y biológicos para la síntesis de diversos tipos de NPs. Modificado de Biological Synthesis of Nanocatalysts and Their Applications, por Roy et al., 2021, *Catalysts*, 11(12), 1494.

Síntesis verde de nanopartículas

En la actualidad, para reducir los posibles impactos que se genera por el uso de métodos químicos y físicos para la síntesis de nanopartículas en el ambiente y en los seres humanos, se ha implementado novedosas alternativas, entre ellos, la utilización de extractos de plantas, hongos y bacterias como agente reductor para la síntesis de NPs metálicas (Palit y Hussain, 2018). Existen diversas ventajas en la síntesis de NPs a partir de extractos de plantas (aminoácidos, polifenoles, vitaminas, polisacáridos) debido a que se le proporciona un procedimiento sencillo, baja toxicidad y eliminación de la contaminación, además, de la reducción de costos y ser un proceso escalable; estos enfoques tienen el potencial para el desarrollo de NPs con un tamaño bien definido y con una alta estabilidad (Naikoo et al., 2021).

En la síntesis verde de NPs mediante la utilización de componentes vegetales se considera un método estándar de oro, debido a la diversidad de plantas existentes, la facilidad de uso y las propiedades únicas que estas poseen (Sadeghi et al., 2023). Por otro lado, existen diversos factores que pueden afectar a la distribución de tamaño de las NPs que incluyen la naturaleza del extracto de la planta, el pH y la temperatura de la reacción, es por ello que esta metodología sigue siendo un tema de investigación (Mohamed, 2020). En este tipo de síntesis de NPs el método más utilizado se basa en una reacción de oxidación-reducción (redox), esta metodología tiene como base la transferencia de electrones entre dos especies químicas (Saurabh et al., 2021). Para que se produzca la reacción se debe tomar en cuenta el potencial de reducción, es decir, aquellas especies químicas que tienen la tendencia de ganar electrones (reduce) poseen un potencial de reducción más elevado que las especies que tienen el potencial de reducción bajo que por ende pierde electrones (oxida). Entre los diversos tipos de nanopartículas, las que llaman mucho la atención debido a sus diversas propiedades mecánicas, catalíticas, magnéticas, eléctricas, antibacterianas, además de su versatilidad, son las NPs de cobre y óxidos de cobre ya que pueden ser aplicados en diversas áreas como en la catálisis, sensores, fungicidas, entre otras (Mohamed, 2020).

Nanopartículas de cobre

La síntesis verde de nanopartículas de cobre (NPs_{Cu}) u óxidos de cobre es considerado un proceso con una baja repercusión del ambiente y proceso económico, estas NPs_{Cu} muestran un gran desempeño como agentes antimicrobianos. En la formación de este tipo de NPs es de gran importancia que el agente oxidante (metal) posea un potencial de reducción más elevado que el agente reductor (extracto), sin embargo, se ha visto que el potencial de reducción del Cu^{2+} no es el más elevado, es por ello que este metal es más difícil de reducir en comparación con otros metales como se observa en la tabla 2 (Amjad et al., 2021). A pesar de tener buenas características, las NPs de cobre tienden a aglomerarse y a

oxidarse rápidamente debido a que son muy sensibles al aire, se ha observado y evidenciado que debido a esta cuestión la fase de óxido es la más estable termodinámicamente (Hasan et al., 2023).

Tabla 2.

Potenciales de reducción estándar de metales en disolución.

Reacción	Potencial de reducción estándar (V)
$\text{Au}^+_{(\text{aq})} + \text{e}^- \rightarrow \text{Au}_{(\text{s})}$	1.680
$\text{Ag}^+_{(\text{aq})} + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}_{(\text{s})}$	0.799
$\text{Cu}^{2+}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cu}_{(\text{s})}$	0.337
$\text{Cu}^{2+}_{(\text{aq})} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^+_{(\text{aq})}$	0.153
$\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Fe}_{(\text{s})}$	-0.440

Nota. Modificado de (Milazzo et al., 1991).

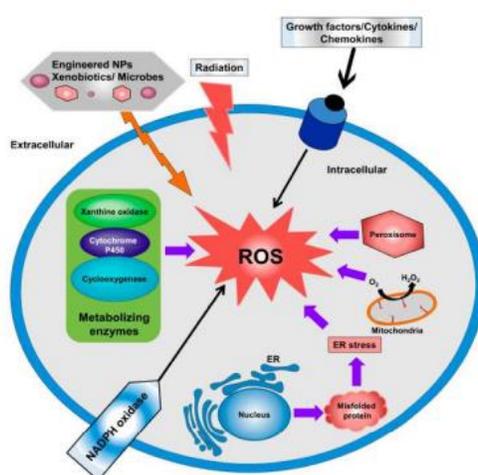
Actividad antimicrobiana de nanopartículas de óxido de cobre

Durante los últimos años, los metales precursores como el cobre han sido muy estudiados debido a sus propiedades antimicrobianas como nanopartículas (Sarwar et al., 2021). La actividad antimicrobiana de las NPs de óxido de cobre se le atribuye a su capacidad de ser aceptor y dador de electrones a medida que cambia su estado de oxidación, aunque no se conocen bien los mecanismos, se considera que el mecanismo antimicrobiano de las NPs de óxido de cobre se basa en la inducción al estrés oxidativo, mecanismos no oxidativos o liberaciones de iones metálicos (Wang et al., 2017). Estos mecanismos pueden darse de forma simultánea, de esta forma se pueden formar especies reactivas de oxígeno (ROS) que genera un daño en la membrana celular ya que inhibe el sistema de defensa antioxidante (Leung et al., 2014).

De acuerdo a investigaciones los efectos antibacterianos de las NPs se basan en generar daño de la pared celular y sus diversas interacciones con ADN y proteínas, en este contexto los iones metálicos libres del cobre podrían competir con otros iones metálicos (iones de zinc) propios de la célula y de tal forma generar un cambio conformacional en la célula y por ende una pérdida de la función proteica (Wang et al., 2017).

Figura 4.

Mecanismo de las especies reactivas de oxígeno



Nota. En la figura se muestra el posible mecanismo de acción de las NPs de óxido de cobre para inducir las especies reactivas de oxígeno. Obtenido de Impact of ROS Generated by Chemical, Physical, and Plasma Techniques on Cancer Attenuation, por Mitra et al., 2019, *Cancers*, 11(7), 1030.

Caracterización de nanopartículas

La caracterización de las NPs se considera crucial ya que nos permite entender y controlar la síntesis, determinar diversos parámetros como el tamaño, forma, cristalinidad, dispersión, entre otros. Los cuales son analizados por diferentes técnicas instrumentales, esto debido a la necesidad de preservar la integridad de las NPs, de esta forma así, evitar la obtención de información errónea ya sea en el tamaño o de su concentración (Sandoval y del

Pilar Infante Luna, 2021). Las principales técnicas por las cuales se pueden medir el tamaño, forma, dispersión, cristalinidad se basan en principios espectrofotométricos como UV-visible, DLS, y técnicas de microscopía electrónica como el TEM, SEM, DRX o EDX como se muestra en la tabla 3 (Zaefferer, 2011).

Tabla 3.

Métodos y técnicas comunes para la caracterización de nanopartículas

	Técnica	Propiedades y características			
		Tamaño	Forma	Dispersión	Aglomeración
Morfología y topografía	TEM	✓	✓	✓	✓
	SEM	✓	✓	✓	✓
	DLS	✓		✓	
Estructural y química		Composición	Fase	Cristalinidad	
	DRX		✓	✓	
	EDS	✓			
Óptica, electrónica		Absorción	Reflectancia	Banda prohibida	
	UV-Vis	✓	✓	✓	

Nota. En la tabla se muestra el resumen de las propiedades y características que puede ser medido y observado con las distintas técnicas de caracterización. Modificado de (Nadeem y Dirk , 2022)

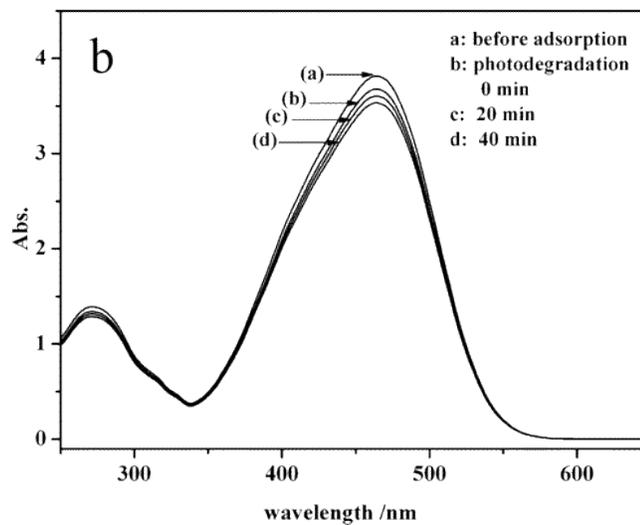
Espectrofotometría UV-Vis

La espectrofotometría UV-visible (UV-Vis) se utilizan para monitorear los picos que generan las nanopartículas metálicas dependiendo de sus características ópticas. La aparición de los plasmones superficiales está relacionada con las oscilaciones combinadas de electrones en el campo electromagnético, por otro lado, la espectroscopía UV-Vis también se ha utilizado para la estimación del tamaño y del estado de agregación de las NPs (Adewale et al., 2021). El

espectro UV-Vis de las nanopartículas de óxido cuproso (Cu_2O) oscila en un rango de 400 a 500 nm como se muestra en la Figura 5.

Figura 5.

Espectro referencial del UV-visible de nanopartículas de Cu_2O



Nota. En la figura se muestra un espectro UV-Vis que permite la identificación de Cu_2O en un rango entre 400 a 500 nm. Obtenido de Shape Evolution and Size-Controllable Synthesis of Cu_2O Octahedra and Their Morphology-Dependent Photocatalytic Properties, por Haolan et al., 2006, J. Phys. Chem. B, 110(28), 13829 – 13834.

Dynamic Light Scattering (DLS)

La dispersión dinámica de luz o también conocida como Dynamic Light Scattering (DLS) por sus siglas en inglés, es una de las técnicas más populares que permite dimensionar las partículas dispersas en una solución, basándose en el movimiento browniano. El movimiento browniano se basa en la transferencia de energía que se genera constantemente cuando las partículas se chocan constantemente con el disolvente (Bhattacharjee, 2016). De esta forma la

técnica del DLS estima la distribución del tamaño de la partícula mediante la medición de fluctuaciones de intensidades a lo largo del tiempo.

Técnicas de microscopía electrónica

Las técnicas más empleadas debido a su potencial en el campo de la investigación en la ciencia de los materiales y nanotecnología para la obtención de la morfología, tamaño y el estado de agregación son las técnicas de microscopía electrónica, entre ellas se encuentra las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la microscopía electrónica de barrido (SEM) (Reyes Gasga, 2021).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El funcionamiento del TEM se basa en la transmisión de un haz de electrones a través de la muestra lo que genera una imagen en función a la dispersión y absorción de estos electrones por los átomos de la muestra, como resultado nos proporciona imágenes con detalle de la estructura de las NPs, permitiendo de esta forma el análisis del tamaño, distribución y composición (Zaefferer, 2011).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El principio de la técnica del SEM nos proporciona imágenes tridimensionales de alta resolución debido a que utiliza un haz de electrones el cual se mueve de manera secuencial sobre la superficie de la muestra, de esta forma nos permite observar la topografía y morfología de la superficie de las nanopartículas (Liu et al., 2022). El empleo en conjunto de SEM y TEM permite un análisis detallado de las propiedades y comportamiento de las nanopartículas de

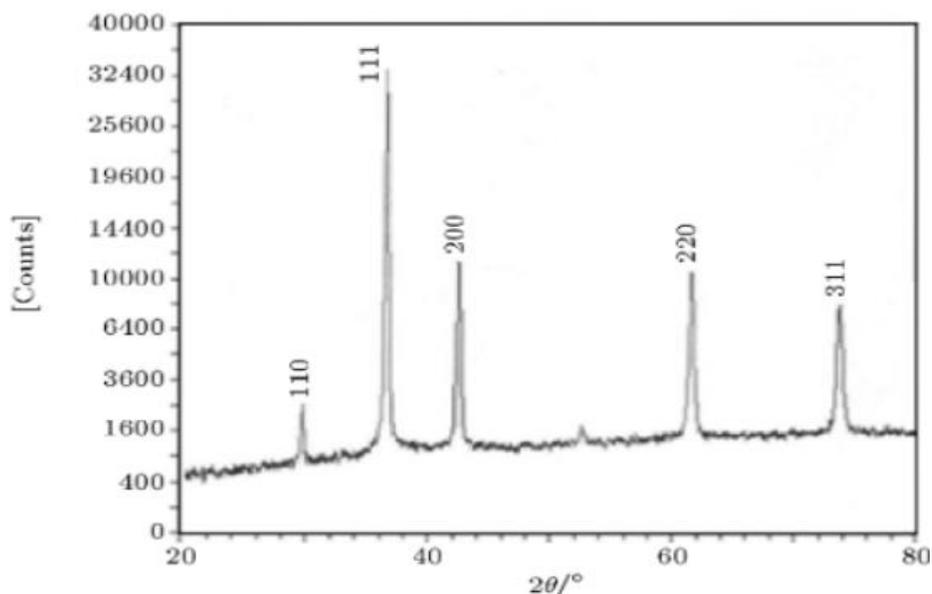
cobre y óxido de cobre, otorgando así la comprensión de las propiedades y aplicaciones en diversos campos científicos y tecnológicos (Tuama et al., 2020).

Difracción de rayos X (XRD)

La difracción de rayos X (XRD) nos proporciona información sobre la cristalinidad de las NPs, esta técnica no proporciona información estructural, pero a través de la estimación obtenida a partir del análisis del XRD del ancho de reflexión de Bragg, se puede obtener el tamaño de la NPs mediante la ecuación de Scherer (Adewale et al., 2021). En la figura 6 se muestra un patrón de DRX para óxido de cobre.

Figura 6.

Patrón de XRD de nanopartículas de Cu_2O



Nota. La figura muestra un difractograma perteneciente al Cu_2O . Obtenido de (Kooti y Matouri, 2010)

Aislamiento e Identificación de Microorganismos

Aislamiento de microorganismos

El aislamiento de microorganismos permite conocer las características morfológicas y condiciones que necesita para su crecimiento y la obtención de cultivos puros de microorganismos patógenos, este procedimiento es necesario para la investigación e imprescindible para el desarrollo de estrategias de prevención y control de los problemas (Álvarez et al., 2019). El aislamiento inicia con la colecta de la muestra mediante diversas técnicas microbiológicas para su análisis, y continua con la siembra de un cultivo directo, el cual nos permite aislar los microorganismos hasta la obtención de cultivos puros (Castelblanco et al., 2020).

Identificación de microorganismos

En el laboratorio de microbiología existen diversas metodologías para la identificación para un agente etiológico que está relacionado al biodeterioro, le método estándar se basa en metodologías moleculares y genotípicas (Barua et al., 2021). Se pueden identificar a bacterias y hongos a partir de sus propiedades fenotípicas (desarrollo y morfología) y propiedades bioquímicas. Los métodos moleculares para la identificación se basan en la utilización de dianas de diversos genes específicos como el ARNr 16S que se utiliza para bacterias y el ITS para hongos, estas metodologías se enfocan en la amplificación y secuenciación genómica de dichos genes con sus diversos fragmentos (Bou et al., 2011).

Comprobación de la actividad antimicrobiana

Método de difusión en pozo

La metodología de difusión en pozo es similar al método de Kirby-Bauer (difusión en disco). En este caso el microorganismo de interés se inocula en un medio de cultivo y se realizan orificios de 6 a 8 mm con una punta estéril o cualquier instrumento que tenga el diámetro requerido (Moncayo, 2022). En los pocillos realizados se coloca un volumen de 20 a 100 μL del agente microbiano que se desee analizar, la caja Petri se deja incubar toda la noche o por el tiempo necesario en dependencia del microorganismo. La formación de los halos indica que se difundió la muestra desde el orificio hacia el medio de agar, así se forma las zonas de inhibición brindando así la información sobre la concentración mínima inhibitoria (Moncayo, 2022).

Capítulo III: Metodología

Materiales y preparaciones

Los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich), NaOH, ácido cítrico (Loba Chemie), cloruro de sodio (Loba Chemie), agar papa dextrosa (PDA, TM Media), agar rosa de bengala-cloranfenicol (RBC, Himedia, MG640-500G), agar nutriente (AN, Difco™), caldo de papa dextrosa (PDB, Difco™), caldo nutriente (NB, TM Media), y se utilizaron sin una purificación previa.

Preparación del extracto a partir de pulpa de taxo

El proceso de la preparación del extracto se realizó siguiendo el protocolo de Bauz Lara, (2023) con ciertas modificaciones. El extracto del se obtuvo por un proceso de cinco pasos (adecuación, lavado, secado, extracción, filtrado), La preparación inicia con la (1) adecuación:

la muestra del taxo se le quitó todos los residuos que no son de importancia para los pasos consecuentes. (2) Lavado: se lavó la muestra con abundante jabón y se enjuago con agua potable y agua tipo 1 para eliminar cualquier tipo de suciedad presentes en la cascara, como paso consiguiente el (3) secado: se secó la muestra en un mesón sobre papel absorbente y a temperatura ambiente para proceder con el proceso de la (4) extracción: donde se trituró la pulpa del taxo con una licuadora marca Oster durante aproximadamente un minuto. Una vez obtenido el taxo triturado el extracto se preparó en una relación 1:2 (p/v), para ello, se colocó en un matraz 50 gramos del taxo con 100 mL de etanol absoluto (al 20%) y se lo llevó a agitación orbital en el equipo WiseShake a 120 rpm y durante 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente, al terminar el tiempo de agitación para el paso del (5) filtrado: se colocó el extracto en tubos falcón de 50 ml y se centrifugo a 6000 rpm por 15 minutos, y se procedió a filtrar el extracto con jeringas de 10 mL y filtros PTFE de 0.45 μm . El extracto se almaceno a 4°C hasta su posterior uso.

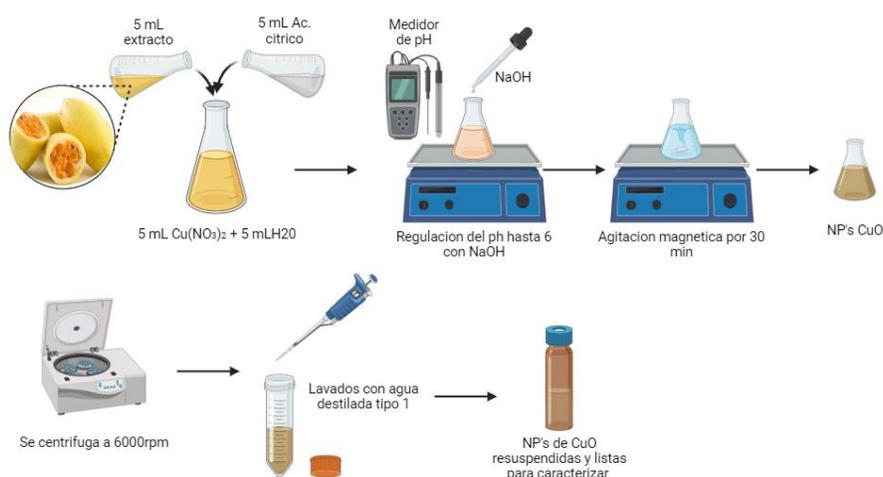
Síntesis verde de NPs de Oxido de cobre

La síntesis de las NPs de óxido de cobre se basa en la reacción de oxido-reducción, con este contexto, el extracto del taxo se utilizó como agente reductor y como sal precursora el nitrato de cobre hemi(pentahidratado) ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$). El procedimiento para la obtención de las NPs de cobre se basó en un estudio anterior de Bauz Lara, (2023) modificado, como se muestra en la figura 7, se mezcló el agente reductor con la sal precursora en relación 2:1(v/v), para esto se preparó una disolución a partir de 5 mL una solución de nitrato de cobre 0.1 M con 5 mL de agua tipo 1, luego se mezcló con 5 mL del extracto de taxo, se agregó 5 mL de ácido cítrico 0.2 M, se regulo el pH hasta llegar a 6 con hidróxido de sodio, todo el proceso de la síntesis se mantuvo en agitación magnética constante durante 30 minutos a temperatura ambiente, la obtención de las NPs de Cu_2O coloidales se confirmó con el cambio de color de un azul intenso a un color borgoña/amarillo. Se realizó una purificación del precipitado de las NPs

de óxido de cobre con dos lavados sucesivos con agua tipo 1 utilizando una centrifuga a 6000 rpm por 10 minutos, finalmente se resuspendió en 5 mL de agua tipo 1 para su posterior caracterización.

Figura 7.

Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre



Created in BioRender.com

Nota. En la figura se muestra el proceso realizado para la síntesis de nanopartículas de Cu₂O

Caracterización de las NPs de óxido de cobre

Determinación de absorbancias de las NPs de Cu₂O mediante UV-Vis

Las nanopartículas sintetizadas de Cu₂O fueron analizadas mediante la espectroscopia de absorción en un rango de longitud de onda de 200 a 700 nm, se utilizaron celdas de cuarzo en donde se realizó una dilución de las NPs de Cu₂O en una relación de 5:200. El análisis se realizó en un espectrofotómetro Genesys 10uv (Termo Scientific) mediante el programa Visión Lite.

Determinación del tamaño de las NPs de Cu₂O mediante DLS

El tamaño hidrodinámico de las nanopartículas de Cu₂O se midió utilizando el equipo de DLS (Horiba LB-550) mediante el programa "Organic simple". La medición de las NPs de Cu₂O se realizó en celdas de cuarzo en una dilución en relación de 1:10, para comprobar la estabilidad de las nanopartículas se realizó la medición del tamaño hidrodinámico a las 0, 2, 4, 8, 16, 32 horas.

Análisis de la estructura cristalina de las NPs Cu₂O

El análisis de la estructura cristalina de las nanopartículas de Cu₂O se realizó mediante el difractómetro XRD (Malvern PANalytical Empyrean, Reino Unido), se mantuvo la configuración de $\theta/2\theta$ en la geometría de Bragg-Brentano y equipado con un ánodo (tubo de rayos X) de cobre (radiación $K\alpha = 1.54060 \text{ \AA}$) operado a 45 kV y 40 mA. Para este análisis la muestra pasó por un proceso de preparación, donde se formó varias capas sobre un portaobjetos a una temperatura de 60°C, cada capa se realizó tras la evaporación del solvente de la capa anterior capa realizada.

El cálculo del tamaño de las nanopartículas se realizó mediante la ecuación de

Scherer:

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

Donde, d corresponde al tamaño de la nanopartícula, k es la constante de Scherrer ($k = 0.9$), λ la longitud de onda de los rayos X ($\lambda = 1.5106$), β el ancho completo del pico y θ corresponde al ángulo de Bragg- Brentano.

Análisis de la morfología de las NPs Cu₂O

Microscopio electrónico de transmisión (TEM). El análisis de morfología de las nanopartículas de Cu₂O se realizó mediante el microscopio electrónico de transmisión TEM (FEI Spirit Twin) operado a 80 kV, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Las imágenes obtenidas mediante el TEM se realizaron un análisis del tamaño promedio de las nanopartículas mediante el programa ImageJ – Fiji.

Microscopía electrónica de barrido (SEM). La morfología de la superficie de las NPs de Cu₂O se observó mediante el análisis de un microscopio electrónico de barrido (SEM) (TESCAN MIRA3) en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Espectrómetro de energía dispersiva (EDS) Se midió la composición elemental y la distribución de elemento de las nanopartículas de Cu₂O mediante el análisis de las imágenes obtenidas en el SEM utilizando el programa ESPRIT Spectrum.

Cálculo de la concentración de las NPs de Cu₂O

La concentración del cobre de las nanopartículas sintetizadas se midió en un Espectrómetro de absorción atómica en flama (Perkin Elmer Aanalyst 800) en el laboratorio de nanomateriales avanzados CENCINAT con una lampara de cobre de cátodo hueco, con un nebulizador de alta sensibilidad y con una longitud de onda de 324.8 nm, se realizó una curva de calibración con 6 puntos (0.1, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 2 ppm) obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.999455, y se midió una disolución de 5 µL de las nanopartículas de Cu₂O en 100 mL de agua destilada acidificado con HCl 1M. A la concentración más alta de le diluyo en relación 1:2 para obtener la mitad de la concentración, y consecuentemente se realizó el mismo procedimiento a partir de la primera dilución.

Aislamiento e identificación de microorganismos

Fase de campo

Muestreo para aislamiento de microorganismos. Se realizó tres muestreos (M1, M2 y M3) el 9, 19 y 31 del mes de mayo de 2023 en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (S 0°18'55.296", O 78°26'41.022") a partir de un hormigón de resistencia media proporcionado por el departamento de ciencias de la construcción. Para el muestreo se realizó la técnica del hisopado basada en Rosato et al., (2016), modificado. Con un hisopo estéril se raspó la superficie del hormigón de resistencia media, previamente humedecido en la solución salina (0.85% p/v), que presentaba visualmente biodeterioro, los hisopos con la muestra se colocaron en tubos de tapa rosca que contenían 20 mL de solución salina (0.85% p/v), la cual se denominó como solución madre. Por otro lado, para realizar un muestreo directo se remojó un hisopo estéril en la solución salina para tomar la muestra raspando la superficie del hormigón y se realizó una siembra directa en medio PDA y RBC mediante una siembra por extensión. Las muestras fueron movilizadas al laboratorio de Microbiología Ambiental del CENCINAT de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, para su posterior ensayo. En la figura 8 se muestra la localización del muestreo

Figura 8.

Sitio de muestreo y hormigón de resistencia media



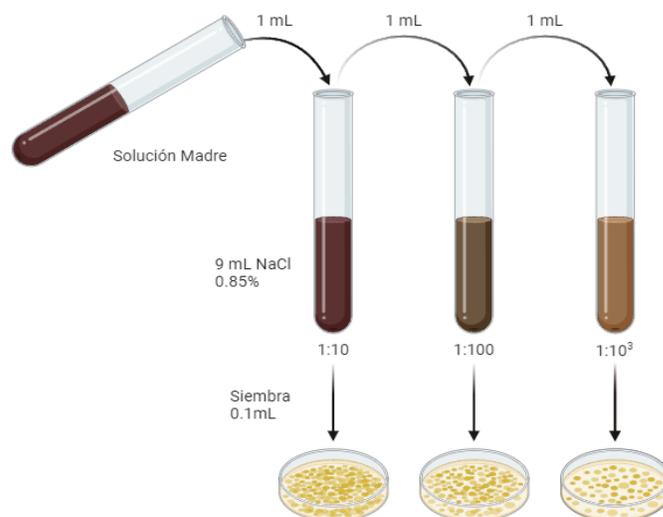
Nota. En la figura se muestra con el indicador rojo el lugar exacto del muestreo, A) Ecuador/ provincia de Pichincha, B) Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y C) Hormigón de resistencia media.

Fase de laboratorio

Siembra de microorganismos. Se homogenizó y realizó diluciones seriadas de 1/10, 1/100 y 1/1000 de la solución madre obtenida en el muestreo como se muestra en la figura 9. Después se implementó la técnica de extensión en placa, en donde inoculó 100 μL de cada una de las diluciones en cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA y RBC con un asa Drigalsky de vidrio, este proceso se realizó por duplicado. Las cajas de Petri se incubaron a 28°C y se monitoreo diariamente, para iniciar con el proceso de aislamiento de los microorganismos (Gámez Espinosa et al., 2020).

Figura 9.

Diluciones seriadas y siembra por el método de extensión en placa



Nota. La imagen muestra el proceso para la realización de diluciones seriadas.

Aislamiento de los microorganismos. Una vez culminó el tiempo de incubación se procedió a identificar las diferentes morfologías presentes en los medios de cultivo PDA y RBC de los muestreos directos y siembra por dilución. Con un asa estéril se recolectaron cada una de las diferentes morfologías y se sembraron mediante la metodología de siembra por estrías y por punción en otras cajas Petri con medio PDA y AN, para así obtener colonias completamente puras. La morfología los distintos cultivos puros se observaron de forma macroscópica y microscópica mediante tinción Gram, azul de lactofenol y azul de metileno, el proceso se detalla en el Anexo 1.

Selección de los microorganismos más predominantes. Se seleccionó los microorganismos más predominantes en relación a la densidad relativa y frecuencia relativa presente en las cajas Petri, comparando en los tres muestreos realizados. Una vez

seleccionados los microorganismos y diferenciados de forma macroscópica y microscópica, se realizaron subcultivos, tanto de las bacterias como de los hongos, para los análisis posteriores.

Extracción de ADN de los microorganismos más predominantes. Como paso previo se inocularon los microorganismos seleccionados aislados (bacterias) en cultivo líquido con caldo nutriente (NB) y se le incubó por 48 horas a 37°C. La extracción de DNA se realizó de acuerdo al protocolo CTAB descrito por Weising et al. (2005) con algunas modificaciones como se muestra en el Anexo 2. Por otro lado, en el caso de los microorganismos considerados como hongos realizó una extracción de DNA convencional basada en la metodología de extracción detalla por Barrendero (2008) con ciertas modificaciones, partiendo de 100 mg del micelio, ver Anexo 3. El DNA se cuantificó mediante un Nanodrop 8000 (Spectrophotometer, Thermo Scientific) mediante el programa Nanodrop, los ratios de pureza de DNA se consideraron como óptimos en un rango de 1.8 a 2 para el ratio de 260/280 y un rango de 2 a 2.2 para el ratio de 260/230 para el proceso de secuenciación de siguiente generación (SNGs).

Secuenciación de alto rendimiento (SNGs). Las muestras de DNA fueron transportadas manteniendo la custodia de frío a los laboratorios de Biosequence S.A.S, en la ciudad de Quito para continuar con la “Secuenciación NGS Metagenómica de Amplicón”. Como paso inicial se realizó un proceso de extracción del material genético enviado mediante un kit comercial ZymoBIOMICS DNA kits a base de columnas para continuar con el siguiente paso de amplificación del DNA genómico con primers específicos y se observó en un gel de agarosa del 1%. La secuenciación de alto rendimiento se realizó después de la preparación de las librerías de amplicón, mediante la utilización de primers universales: 16S, V3 – V4 (341F: CCTACGGGNGGCWGCAG y 805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC) e ITS: ITS1/ITS4, para bacterias y hongos, respectivamente.

Análisis filogenético

Los archivos Fastq proporcionados por la empresa Biosequence de los diferentes microorganismos, se llevaron a un análisis de calidad de acuerdo a (Hernández et al., 2020) mediante el programa FASTQC. A continuación, se realizó un control de calidad de las secuencias forward y reverse mediante Qiime, esto para generar un filtrado, remoción de quimeras y amplicon sequence variants (ASVs) con DADA2, la visualización taxonómica mediante un barplot de las secuencias obtenidas se realizó en Qiime2 view. Finalmente, las secuencias obtenidas se llevaron a un análisis de similitud y homología mediante el uso de BLASTN del NCBI.

Para la construcción de árboles filogenéticos se recogieron los 10 primeros resultados con mayor porcentaje de similitud obtenidos en el BLASTN, se utilizó la herramienta "MUSCLE" del programa MEGA 11 para generar una alineación de las secuencias. Mediante el parámetro más bajo del BIC (Criterio de información bayesiana) obtenido mediante la herramienta "MODELS" se seleccionó el mejor método para el desarrollo de los árboles filogenéticos. Para las bacterias A y B, se utilizó el modelo Kimura-2-parameter y se construyó los cladogramas mediante el método de máxima verosimilitud Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000.

Actividad antimicrobiana de las NPs Cu₂O

Para este ensayo se utilizaron los microorganismos más predominantes seleccionados e identificados; bacterias: *Ralstonia pickettii* y *Pseudomonas azotomorfans*; hongos: morfologías 4H, 5H, 13H, 18H y 28H, obtenidos a partir de los muestreos realizados de un hormigón de resistencia media. Para ello, como paso inicial se prepararon medios de cultivo de Caldo de Papa Dextrosa (PDB) y caldo nutriente (CN), donde se inocularon los hongos y las bacterias durante 5 y 3 días, respectivamente. Por otro lado, se realizó una suspensión de

esporas (SE) en una solución salina (0.85% p/v) para los hongos y una suspensión en agua destilada autoclavada tipo I (SB) para las bacterias.

Se siguió la metodología de García et al. (2000), con ciertas modificaciones, las siembras tanto en bacterias como en hongos se realizaron con dos métodos: 1) con la ayuda de un hisopo estéril se sembró 100 μ L de los microorganismos seleccionados mediante una siembra masiva (césped); 2) con la ayuda de un asa Drigalsky se sembró 100 μ L empleando la técnica de extensión en placa. En el caso de los hongos la siembra se realizó a partir de los cultivos líquidos (PDB_T, PDB_H) y suspensiones de esporas (SE_T, SE_H). Por otro lado, para las bacterias la siembra se realizó a partir de caldo nutriente (CN_T, CN_H) y suspensión de bacterias en agua tipo I (SB_T, SB_H). Se realizaron pocillos de 5 mm de diámetro a 3 cm del centro de la caja Petri, con la ayuda de la parte posterior de una pipeta Pasteur de vidrio, estéril. Las muestras se incubaron durante 48 horas para las bacterias a 37°C y para los hongos se incubaron a 28°C durante 5 días.

Se analizó la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas en los microorganismos más predominantes previamente identificados, utilizando el método de difusión en pozo de (Saravanakumar et al., 2017) (Nabila y Kannabiran, 2018) con modificaciones. Se aplicó 50 μ L de las nanopartículas a diferentes concentraciones (0,49 M, 0,245 M y 0.123 M) que se denominaron como [2], [3] y [4], respectivamente, y se utilizó un control negativo con agua tipo 1 que denominó como [1]. Los halos de inhibición se midieron después del tiempo establecido de incubación en cada caso, mediante un calibrador pie de rey digital.

Diámetro del halo de inhibición a lo largo del tiempo

La reducción del tamaño del halo de inhibición se midió tanto en las bacterias como en los hongos, para esto se midió el diámetro del halo de inhibición con un calibrador pie de rey

digital cada día durante 6 días para las bacterias y cada dos días durante 10 días para los hongos.

Análisis estadístico

Para los gráficos y análisis estadísticos se desarrollaron en el programa informático "OriginPro 2018". Se realizó los tratamientos por triplicado en todas las metodologías, en primer lugar, se comprobó los supuestos de normalidad, homocedasticidad y homogeneidad de los datos. Para determinar las diferencias significativas de los resultados obtenidos se empleó un ANOVA de dos vías y el test de Bonferroni, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

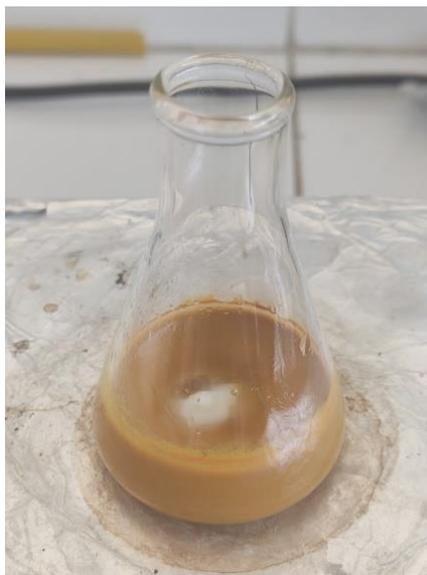
Capítulo IV: Resultados

Síntesis de NPs de Cu_2O con extracto de taxo

Utilizando la metodología descrita anteriormente para la síntesis de NPs de Cu_2O con extracto de taxo, se logró la síntesis de las mismas mediante la confirmación del cambio de color azul intenso a una coloración borgoña/amarillo al obtenerse los óxidos de cobre como se muestra en la figura 10.

Figura 10.

Síntesis de NPs de Cu_2O por química verde



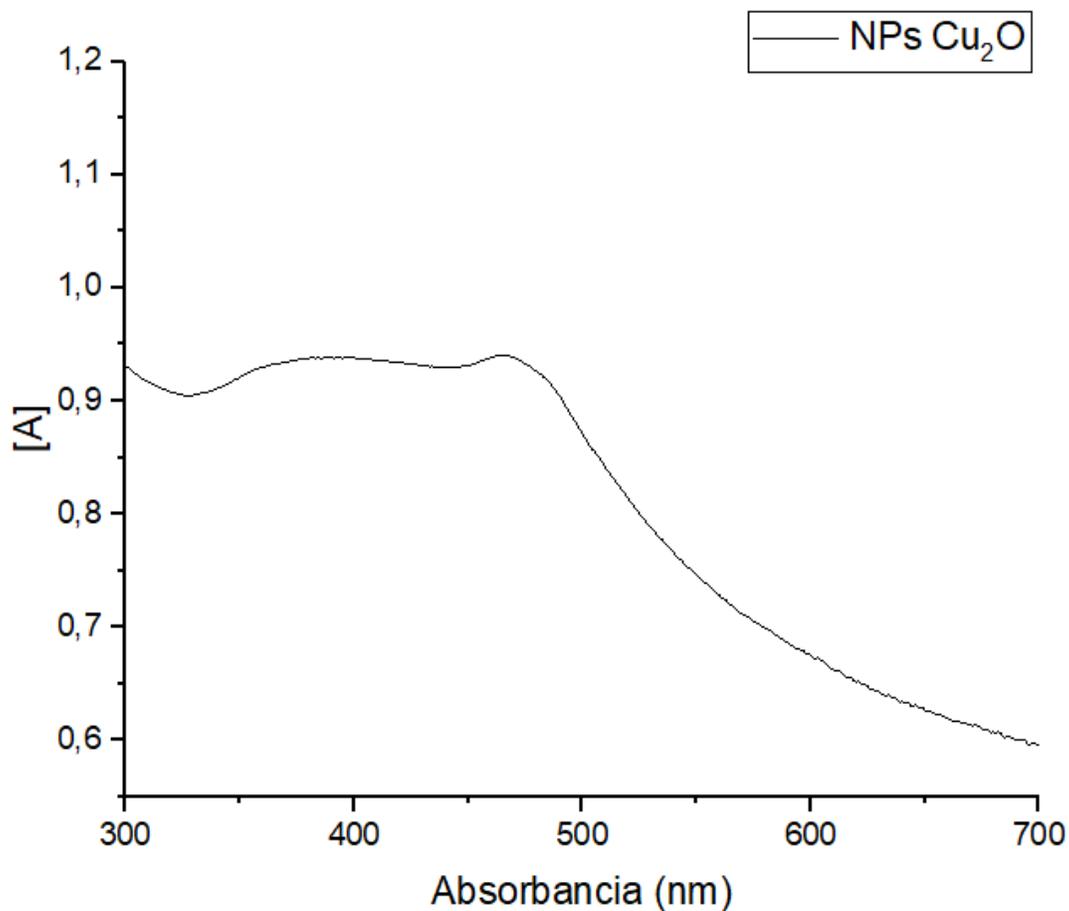
Caracterización de nanopartículas de óxido de cobre

Análisis del espectro UV-Vis de las NPs de Cu_2O

Mediante la espectrofotometría UV-Vis se observó una longitud de onda máxima de la resonancia del plasmón en 455 nm. En la figura 11 se indica en el espectrograma el pico del plasmón de la medición realizada en el espectrofotómetro Genesys 10uv (Termo Scientific) de las NPs de Cu_2O sintetizadas por química verde.

Figura 11.

Espectro UV-Vis de las NPs de Cu₂O



Nota. En la figura se muestra el pico del plasmón obtenido de 455 nm en la medición UV-Vis de las nanopartículas de óxidos de cobre obtenido por química verde.

Análisis del tamaño hidrodinámico (DLS)

A partir de la utilización del Dynamic Light Scattering Nanoparticle Size Analyzer DLS (Horiba LB-550), se obtuvo los valores de los diferentes tamaños hidrodinámicos mediante histogramas de distribución de las nanopartículas de óxidos de cobre sintetizadas. Los

diámetros hidrodinámicos medidos por DLS van desde una medida inicial de $9.8 \pm (0.58)$ nm a $17.2 \pm (0.54)$ nm de 32 horas de haber sido sintetizadas, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4.

Estabilidad y tamaño hidrodinámico de las NPs de Cu_2O

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

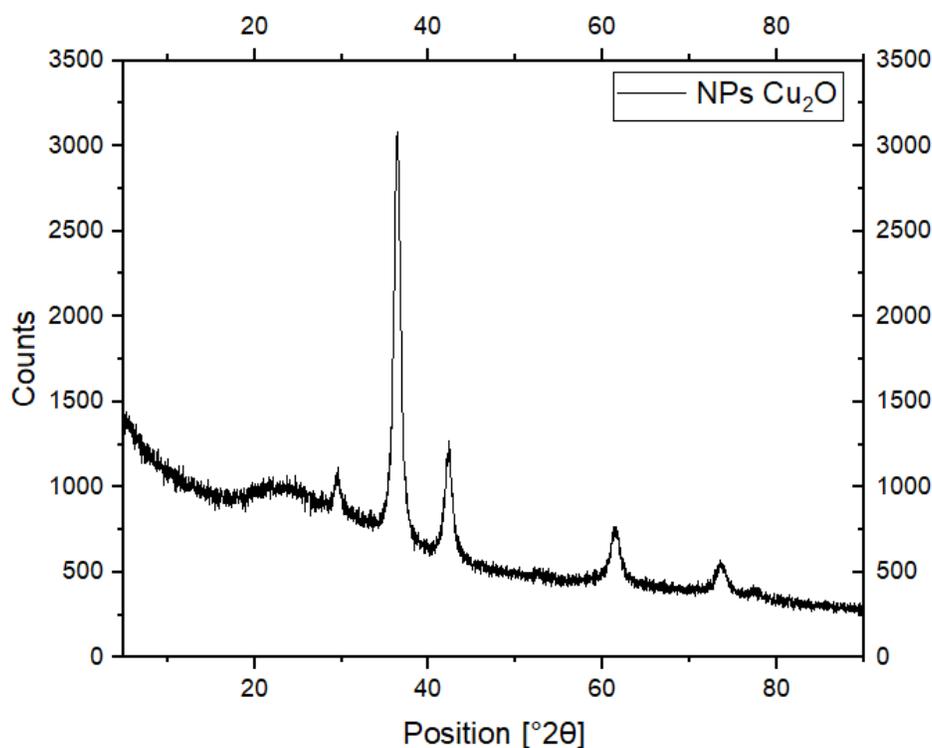
Nota. En la tabla se muestra los diámetros hidrodinámicos obtenidos en el análisis de la estabilidad de las nanopartículas de óxido de cobre obtenidos a partir del equipo DLS.

Análisis de la estructura cristalina de las NPs Cu_2O

El análisis de la cristalografía de las nanopartículas de óxido de cobre a partir del difractómetro XRD (Malvern PANalytical Empyrean, Reino Unido) dio como resultado un difractograma como se muestra en la Figura 12, donde se muestra los principales picos de difracción de ángulo 2θ : 29.5256° , 36.3698° , 42.2601° , 61.3648° y 73.5237° , que con característicos de Cu_2O . La lista de los picos de difracción y posiciones $[2\theta]$ obtenidas para las NPs de Cu_2O sintetizadas por química verde se muestran en la Tabla 5, y en la Tabla 6 se muestra la lista de patrones elegidos y el código de referencia (01-080-7711).

Figura 12.

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



Nota. En la figura se muestra los picos obtenidos por difracción de rayos X (XRD) que caracterizan al óxido de cobre (Cu₂O) 2θ: 29.5440°, 36.3629°, 42.3142°, 61.4016° y 73.6604°.

Tabla 5.

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

Nota. La tabla muestra los picos y posiciones respectivas [2θ] obtenidas del difractómetro de rayos X para las NPs de Cu₂O obtenidas por síntesis verde.

Tabla 6.*Lista de patrones elegidos*

Ref. Code	Score	Compound Name	Displacement [°2Th.]	Scale Factor	Chemical Formula	RIR	Crystal System	Cell Parameters
01-080-7711	83	Copper Oxide	0.000	0.918	Cu ₂ O	8.280	Cubic	a 4.271 – b 4.271 – c 7.271

Nota. La tabla muestra el código de referencia de las nanopartículas de óxido de cobre, además del sistema del cristal y la fórmula química.

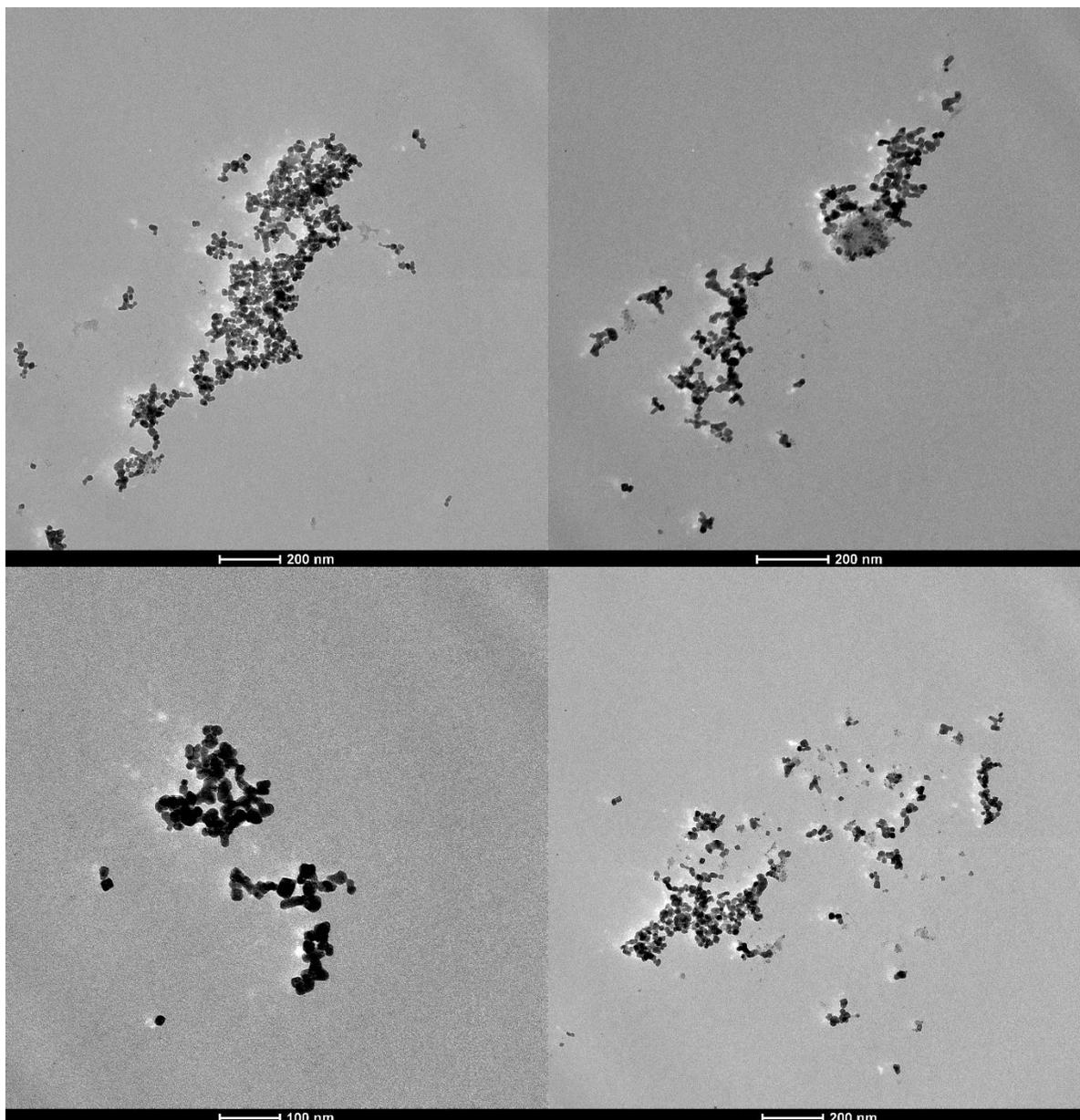
A partir de la ecuación de Scherrer se calculó el tamaño de la nanopartícula y se mantuvo en el rango de 9,1 nm.

Análisis de la morfología de las NPs de Cu₂O

A partir de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) muestra que las NPs de Cu₂O obtenidas por síntesis verde muestran una forma esférica y uniformes en gran medida como se presenta en la figura 13. A partir del análisis mediante ImageJ se obtuvo mediante un análisis de distribución se obtuvo tamaño promedio de 8.45 nm como se muestra en la figura 14.

Figura 13.

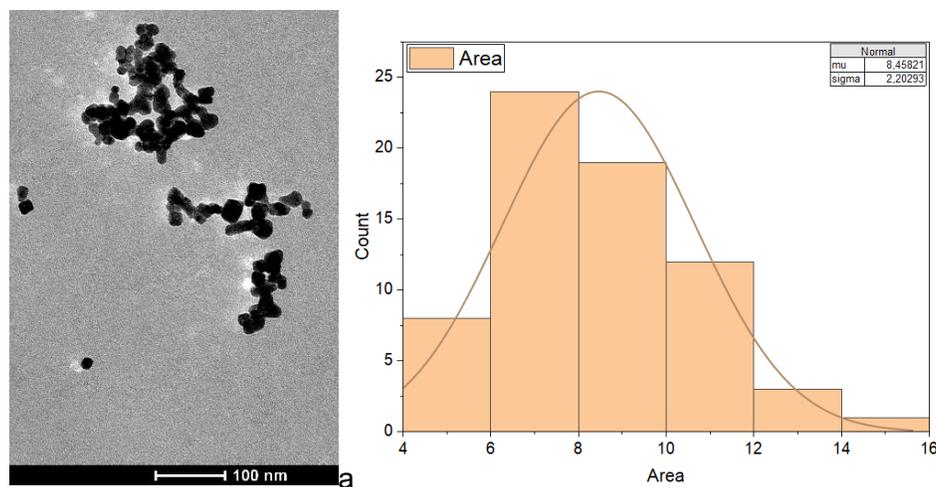
Micrografía electrónica de transmisión de las NPs de Cu_2O



Nota. En la figura se muestra imágenes a una escala de 100 y 200 nm obtenidas mediante la microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas de Cu_2O sintetizadas por química verde.

Figura 14.

Análisis del tamaño de las NPs de Cu₂O mediante ImageJ-FIJI

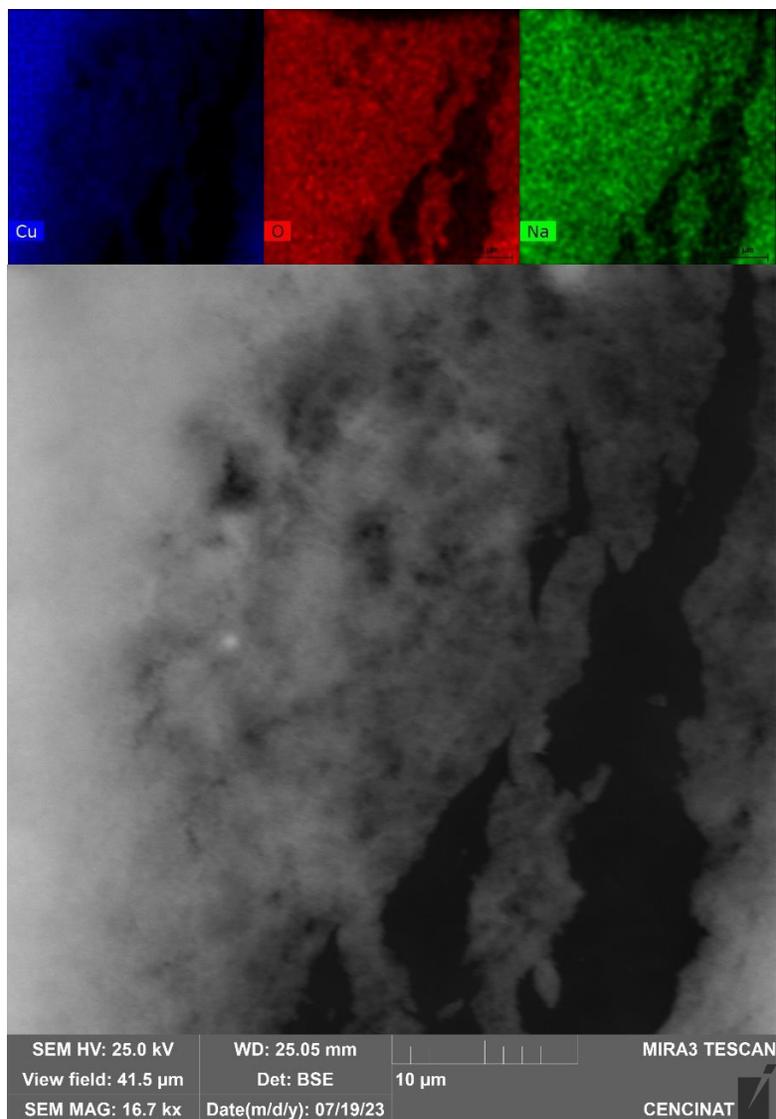


Nota. La grafica de distribución muestra que se obtuvo un tamaño uniforme promedio de 8.458 nm (μ), con una desviación estándar de 2.20293 (σ), un valor mínimo de 4.809 y un máximo de 15.5881.

Microscopio electrónico de barrido (SEM). Se obtuvo micrografías a partir del microscopio electrónico de barrido (SEM) las cuales se realizaron un análisis mediante la espectrometría de energía dispersiva (EDS) para obtener la composición química de las nanopartículas mediante el programa Bruker Nano GmbH Berlin, Germany como se muestra en la figura 15, mediante el análisis elemental se muestra la presencia de Cu (62.04%), O₂ (32.26%) y Na(5.71%) de masa normalizada (Figura 16).

Figura 15.

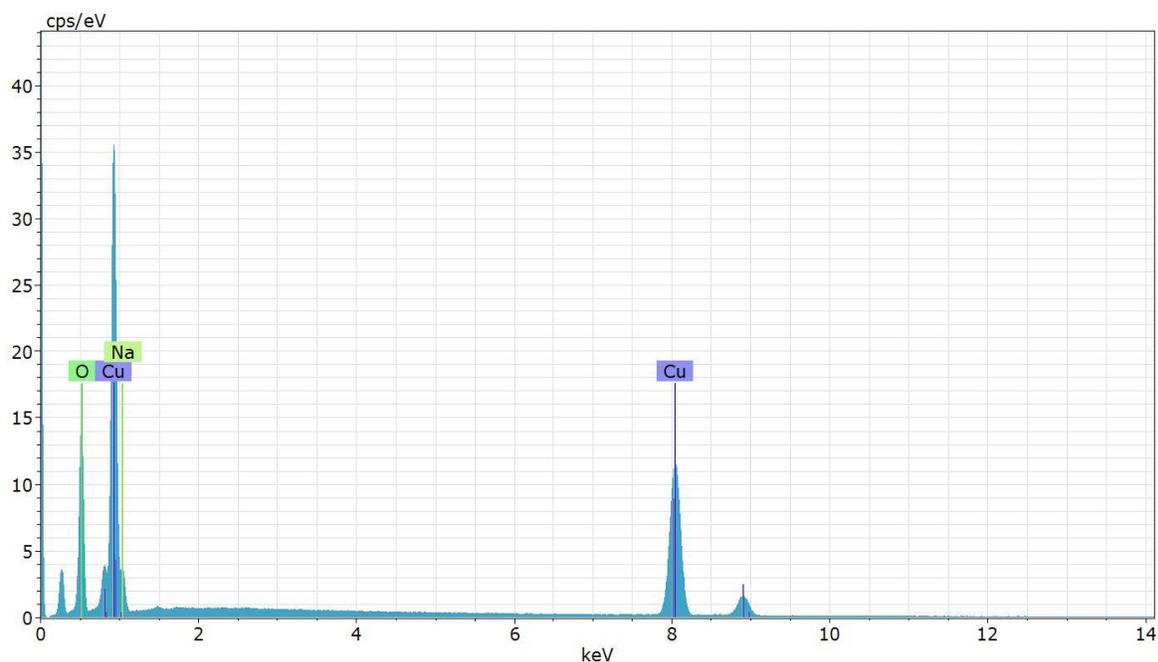
Mapeo elemental de Cu, O₂ y Na de las NPs de Cu₂O



Nota. Se muestra la imagen obtenida mediante el análisis del SEM y mapeo elemental para Cu (azul), O₂ (rojo) y Na (verde).

Figura 16.

Análisis elemental de las NPs de Cu₂O determinado por EDS



Nota. El espectro EDS muestra la composición química de las nanopartículas de óxido de cobre, en donde se muestra la presencia del cobre, oxígeno y sodio en un 62,03503%, 32,26025% y 5,714713%, respectivamente, en relación a la masa normalizada.

Concentración de las NPs de Cu₂O

Una vez sintetizada la nanopartícula se midió su concentración mediante Absorción Atómica de flama y se obtuvo una concentración de 0.49 M. Las diluciones realizadas de 1:2 fueron de 0.245 M y de 0.123 M.

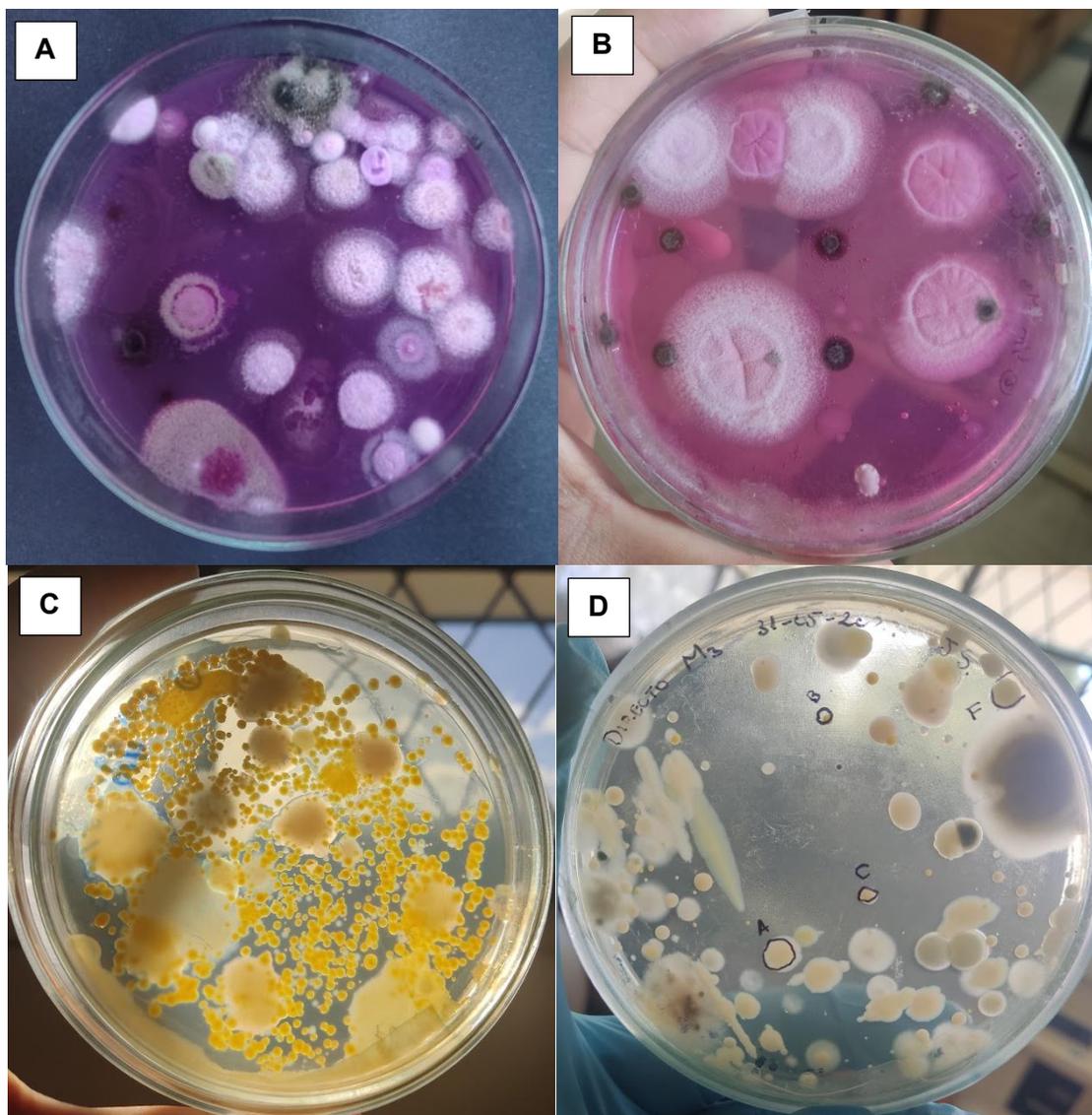
Aislamientos e identificación de microorganismos

Se identificaron 28 microorganismos en los tres muestreos realizados con el método del hisopado y el muestreo directo, además de las técnicas microbiológicas convencionales (macroscópicas y microscópicas). En la Figura 17 se muestra los registros fotográficos de las

cajas Petri de los muestreos realizados en placas Petri con Agar PDA y RBC, por otro lado, en la Figura 18 se muestra las cepas aisladas y purificadas de los muestreos realizados.

Figura 17.

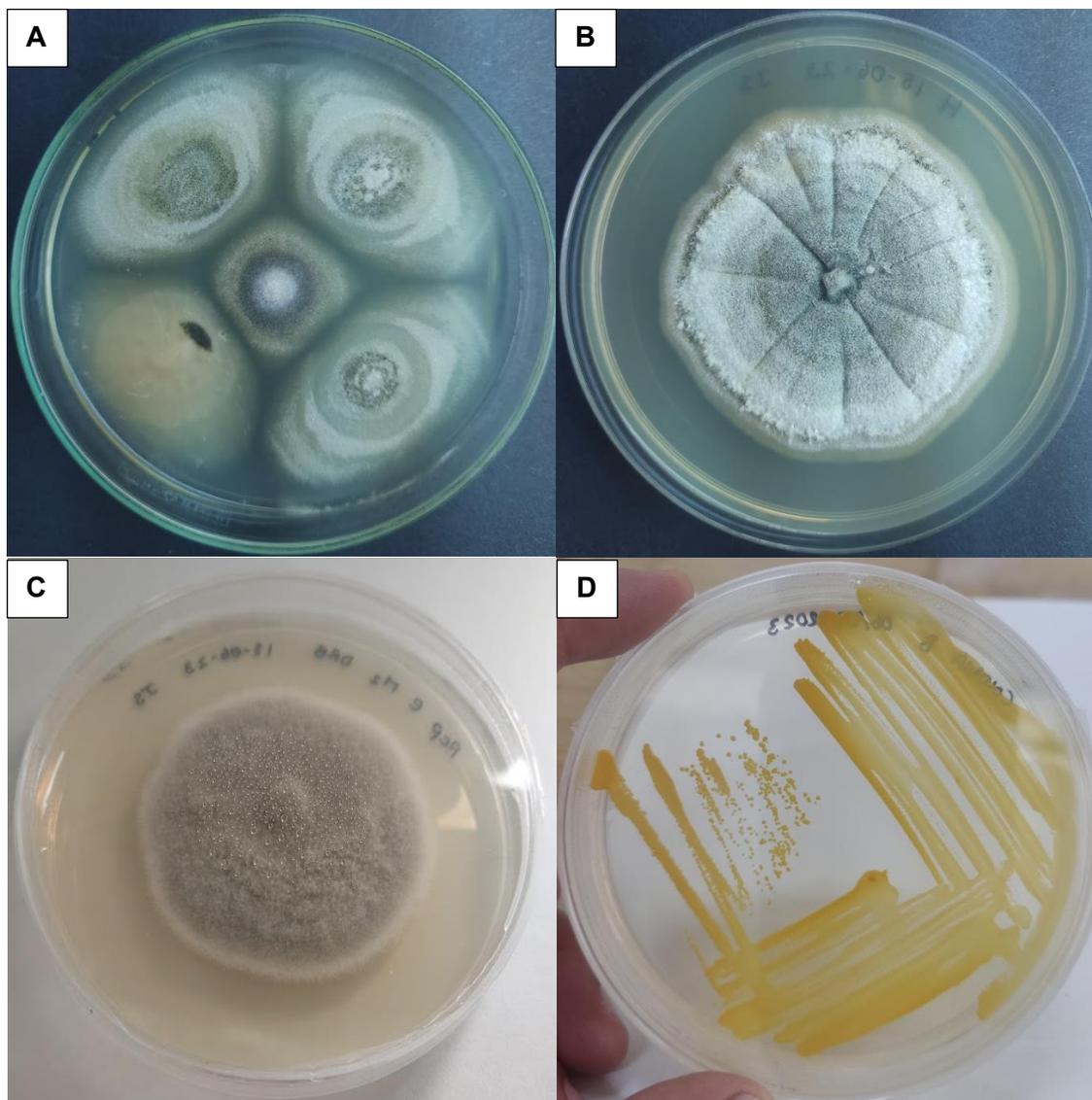
Muestreos directos y por diluciones.



Nota. La figura muestra las cajas Petri de los muestreos realizados directo y por diluciones en agar RBC (A y B) y en Agar PDA (C y D) incubadas por 4 días a 28°C.

Figura 18.

Aislamientos y purificaciones de microorganismos.



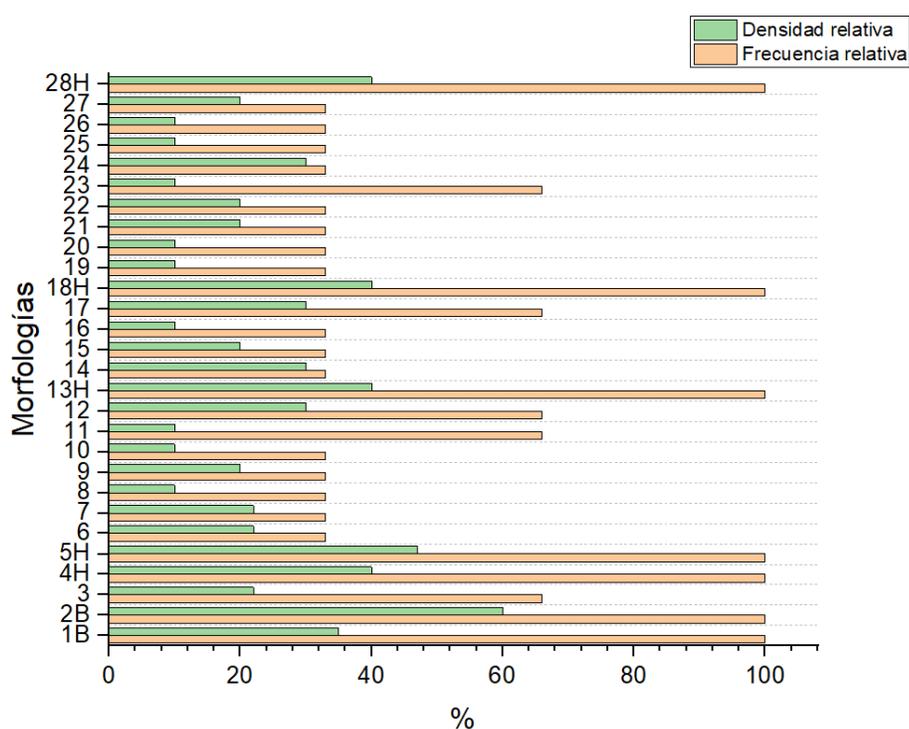
Nota. La figura muestra algunas de las cepas aisladas y purificadas en agar PDA (A, B y C) y Agar nutriente (D). Entre los aislados en este registro fotográfico se encuentran: A) aislado de la morfología 12H, B) aislado de la morfología 8, C) aislado de la morfología 17 y D) aislado de la morfología 2B.

Selección de los microorganismos más predominantes

La selección de los microorganismos más predominantes se hizo en relación a la densidad relativa y la frecuencia relativa presentes en los muestreos realizados. Se obtuvo que las morfologías 1B, 2B, 4H, 5H, 13H, 18H y 28H, fueron las cepas más predominantes en relación al gráfico que se muestra en la figura 19.

Figura 19.

Frecuencia relativa y densidad relativa de los microorganismos aislados

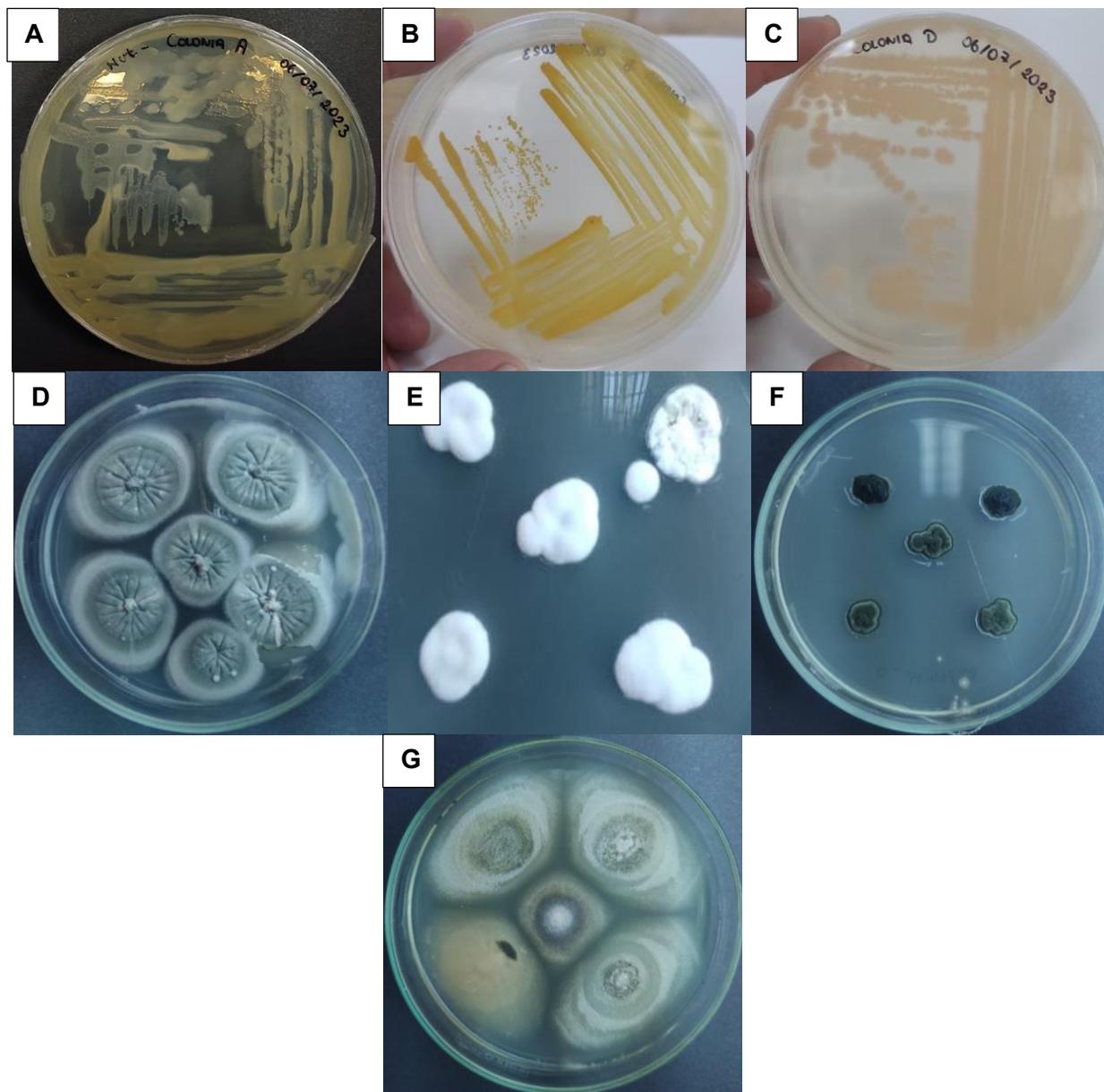


Nota. La figura muestra que los microorganismos 1B, 2B, 4H, 5H, 13H, 18H y 21H son los más predominantes en relación a la frecuencia y densidad relativa.

En la figura 20 se muestran las morfologías y cultivos puros de los microorganismos más predominantes seleccionados para la identificación molecular.

Figura 20.

Morfología de los microorganismos más predominantes



Nota. Se muestra los microorganismos más predominantes seleccionados partir del análisis de densidad y frecuencia relativa, donde A, B, C, D, E, F y G corresponde a las morfologías identificadas como 1B, 2B, 4H, 5H, 13H, 18H y 28H, respectivamente.

Identificación molecular de los microorganismos

Una vez seleccionado los microorganismos más predominantes (Morfologías 1B, 2B, 4H, 5H, 13H, 18H y 21H) se realizó una extracción de DNA con protocolos convencionales CTAB específicos para bacterias y hongos, en donde se obtuvo las condiciones óptimas de la concentración y ratios de pureza (Tabla 7), para poder realizar la secuenciación de siguiente generación (SNGs).

Tabla 7.

Cuantificación de ADN

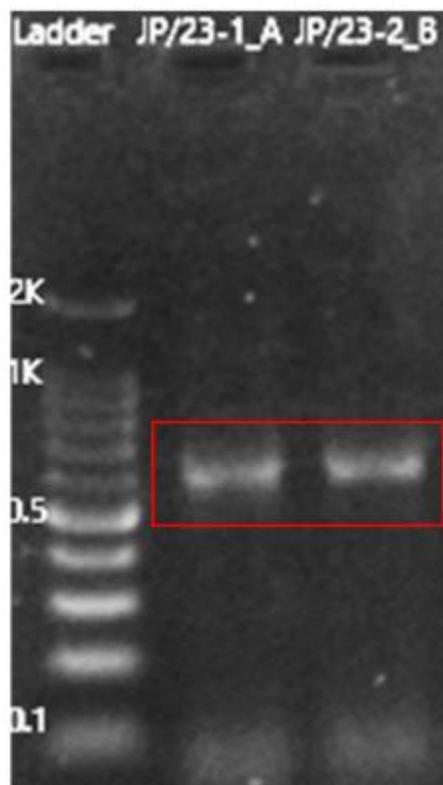
Morfología	Concentración [ng/μL]	260/280	260/230
1B	155.2	1.98	1.63
2B	295.0	1.97	1.83
4H	226.9	1.94	1.61
5H	72.6	1.93	0.74
13H	37.9	1.97	2.10
18H	76.6	2.06	1.62
28H	41.1	2.09	2.10

Nota. Se muestra la concentración en ng/μL de ADN extraído para las diferentes morfologías seleccionadas, además de los ratios de pureza de 260/280 y 260/230.

Una vez culminado el proceso de extracción se realizó una PCR índice para el desarrollo de las librerías para la metagenómica de amplicones 16S: V3-V4 (Figura 21) que fue realizado y proporcionado por la empresa Biosequence.

Figura 21.

Visualización de Índice PCR previa secuenciación.



Nota. Imagen proporcionada por Biosequence en el control de calidad de las muestras. Las codificaciones JP/23-1_A y JP/23-2_B corresponde a las morfologías de las bacterias 1B y 2B, respectivamente, (Ladder: marcador molecular).

Análisis filogenético

Las secuencias de las bacterias y hongos realizado por la empresa Biosequence se llevó a un proceso de calidad con DADA2 para la generación de secuencias consenso. Los análisis de similitud y homología realizado con las bases de datos del NCBI mediante BLASTN mostro el porcentaje de identidad con los posibles microorganismos. Para la construcción del árbol filogenético se eligió las 10 mejores puntuaciones en el porcentaje de identidad (Tabla 8 y 9) y se realizó en MEGA con la herramienta MUSCLE. A partir de los cladogramas realizados

se pudo observar que para la bacteria 1B posee una mayor relación con *Ralstonia pickettii* cepa, con un porcentaje de identidad del 100% (Figura 22) y para la bacteria 2B corresponde a *Pseudomonas azotomoffans* (Figura 23).

Tabla 8.

Microorganismos próximos a la bacteria 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

Nota. Se muestra las diez mejores puntuaciones de porcentaje de identidad presentadas en

BLASTN para la bacteria 1B.

Figura 22.

Cladograma de microorganismos homólogos a la bacteria 1B



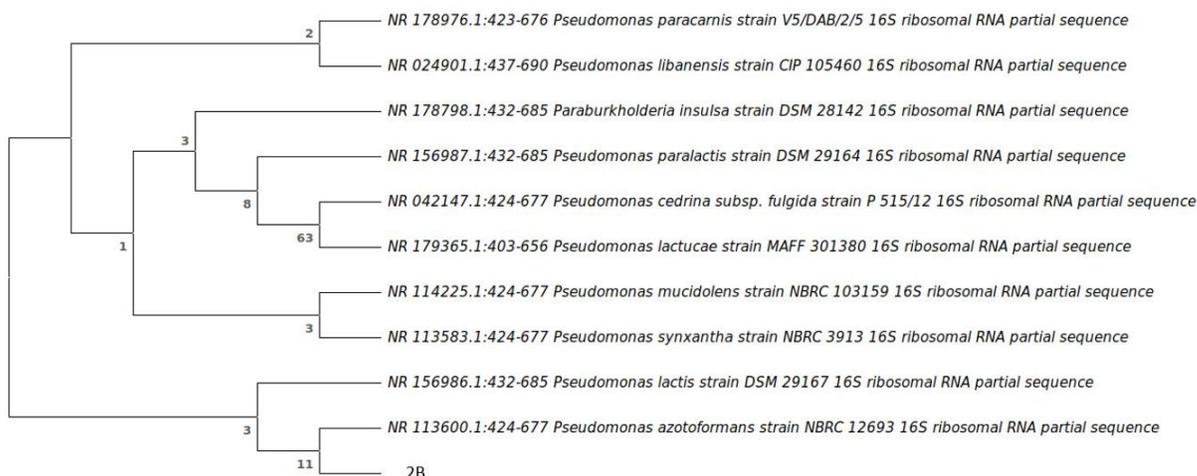
Nota. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen ARNr entre los aislados pertenecientes al género *Ralstonia* y *Cupriavidus*. El árbol se generó con el método de máxima verosimilitud, con un valor de Bootstrap basado en 1000 repeticiones.

Tabla 9.

Microorganismos próximos a la bacteria 2B.

Descripción	Cobertura de consulta	Porcentaje de identidad	Número de acceso
<i>Pseudomonas azotomoffans</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>Paraburkholderia insulsa</i> (DMS 28142)	100%	100%	NR_178998.1
<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

Nota. Se muestra las diez mejores puntuaciones de porcentaje de identidad presentadas en BLASTN para la bacteria 2B.

Figura 23.*Cladograma de microorganismos homólogos a la bacteria 2B*

Nota. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen ARNr entre los aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* y *Paraburkholderia*. El árbol se generó con el método de máxima verosimilitud, con un valor de Bootstrap basado en 1000 repeticiones.

La identificación de los hongos de las morfologías 4H, 5H, 13H, 18H y 28H, mediante la secuenciación de siguiente generación (SNGs) no se pudo llevar a cabo debido a fallos en la entrega de las secuencias por parte de la empresa Biosequence S.A.S.

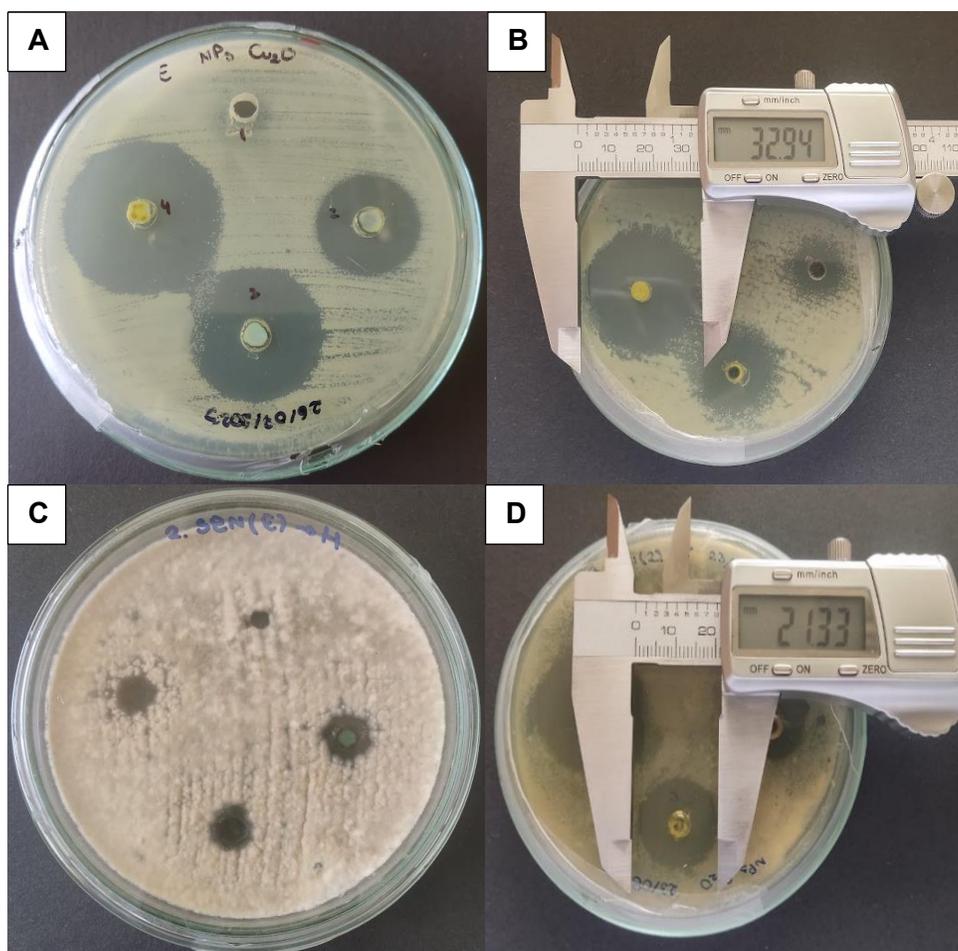
Actividad antimicrobiana de las NPs de Cu₂O

Las NPs de Cu₂O obtenidas por síntesis verde presentaron un halo de inhibición del crecimiento bacteriano para *Ralstonia pickettii* presentando un diámetro máximo de inhibición de 37.36 mm (SB_H), sin embargo, para *Pseudomonas azotomorfans* no se observó formación de halos y solo hubo crecimiento sobre el pocillo control. Por otro lado, en caso de la inhibición del crecimiento micelial se observó un diámetro máximo del halo de 35.43 mm, 35.99 mm, 32.93 mm, 31.25 mm, 20.52 mm para las morfologías 4H, 5H, 13H, 18H y 28H,

respectivamente. En la figura 24 se muestra los halos de inhibición y los diámetros medidos (Tabla 10)

Figura 24.

Comprobación de la actividad antimicrobiana de las NPs de Cu_2O



Nota. Determinación del potencial antimicrobiano de las NPS de Cu_2O mediante el método de difusión en pozo. 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 inhibición con calibrador digital morfología 13H.

Tabla 10.

Diámetro del halo de inhibición de los microorganismos más predominantes aislados de un hormigón de resistencia media por acción de NPs de Cu₂O.

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

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

Nota. Se muestra el valor promedio del diámetro del halo de inhibición y desviación estándar (\pm SD) para cada metodología de siembra: caldo nutriente con triángulo (CN_T), caldo nutriente con hisopo (CN_H), solución de bacterias con triángulo (SB_T), solución de bacterias con hisopo (SB_H), caldo PDA con triángulo (PDB_T), caldo PDA con hisopo (PDB_H), suspensión

de esporas con triangulo (SE_T) y suspensión de esporas con hisopo (SE_H) para cada una de las concentraciones [1]: 1,49M , [2]: 0.245 M y [4]: 0.123M. * El valor es significativamente diferente a los demás valores promedio del diámetro del halo de inhibición por la acción de NPs de Cu₂O y coincide con la concentración más alta de NPs aplicado, analizado mediante un ANOVA de dos vías y con el test de Bonferroni.

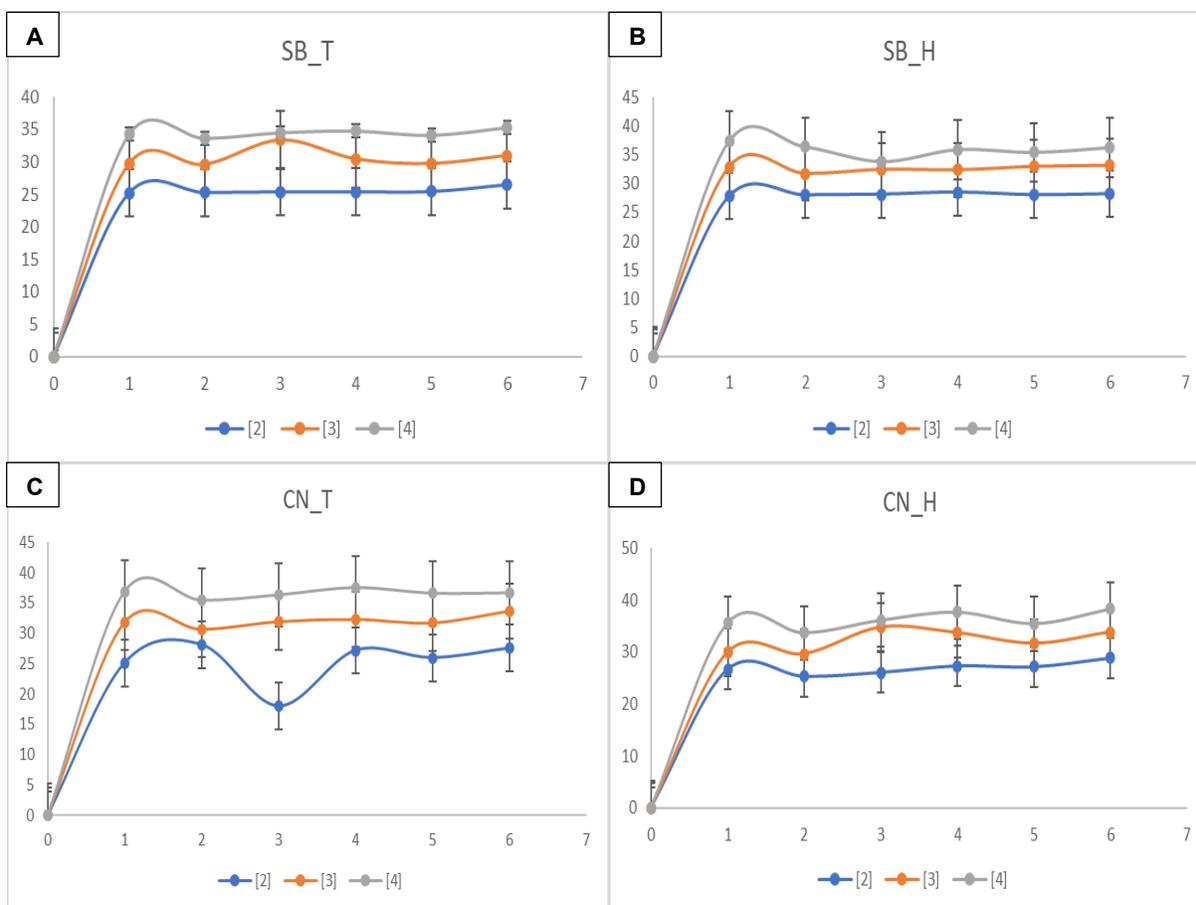
A partir del análisis estadístico se observó que existen diferencias significativas entre los valores promedio del diámetro de inhibición para las tres diferentes concentraciones de NPs Cu₂O aplicadas. Se establece que la interacción entre la “concentración” y “morfología” son significativamente diferentes a un nivel de significancia de 0.05 (Anexos 4 y 5)

Diámetro del halo de inhibición a lo largo del tiempo

El diámetro del halo de inhibición de las nanopartículas de óxido de cobre se realizó midiendo los halos con un calibrador pie de rey, en donde se tomó mediciones durante 6 días para las bacterias y 10 días para los hongos. En las figuras se muestra los gráficos que indican la inhibición a lo largo del tiempo con las cuatro metodologías en el caso de bacterias (SB_T, SB_H, CN_T y CN_H) para *Ralstonia pickettii* (Figura 25), y en el caso de hongos uso de las metodologías (SE_T, SE_H, PDB_T y PDB_H) para la morfología 4H (Figura 26), 5H (Figura 27), 13H (Figura 28), 18H (Figura 29) y 28H (Figura 30).

Figura 25.

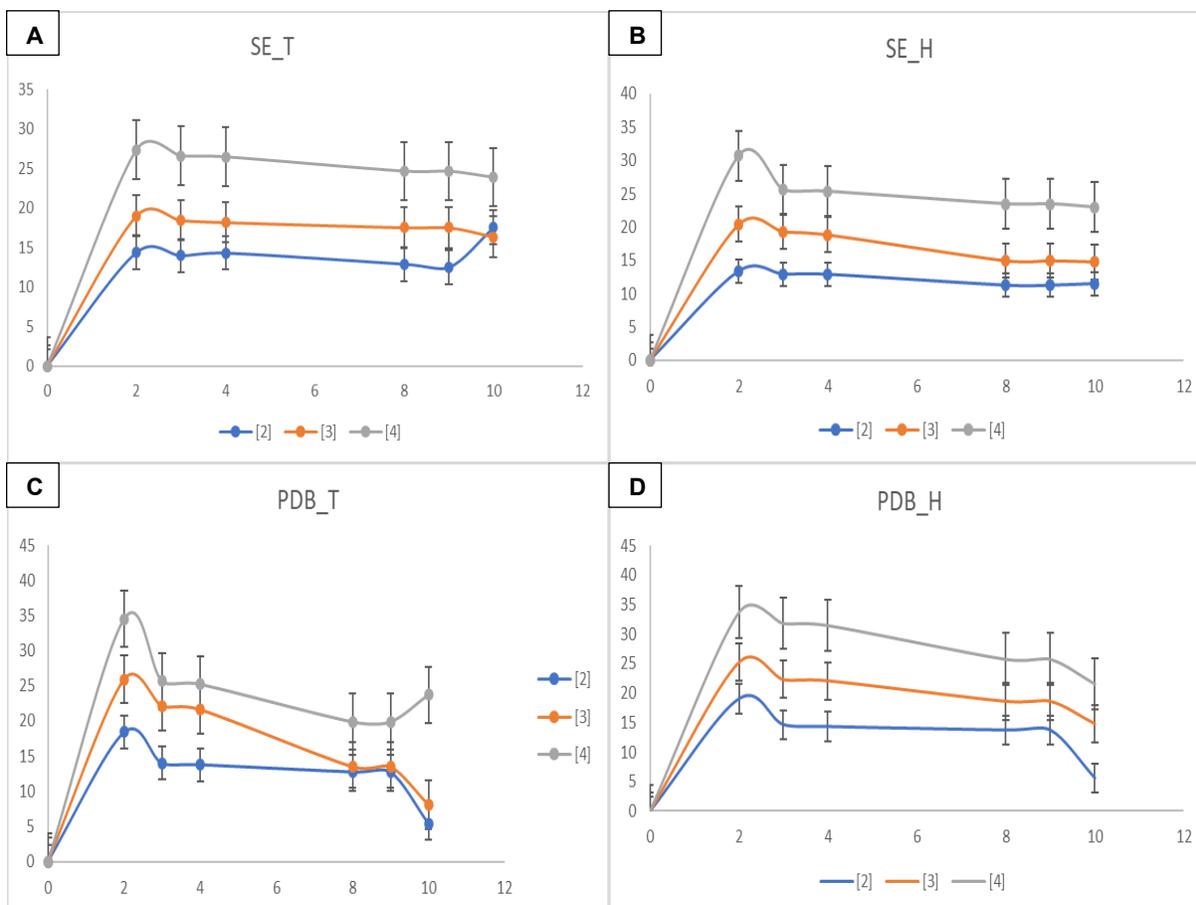
Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu_2O aplicadas en *Ralstonia pickettii*



Nota. Se muestra el promedio del diámetro de inhibición por parte de las NPs de Cu_2O en *Ralstonia pickettii*, durante 6 días, con las metodologías: 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.

Figura 26.

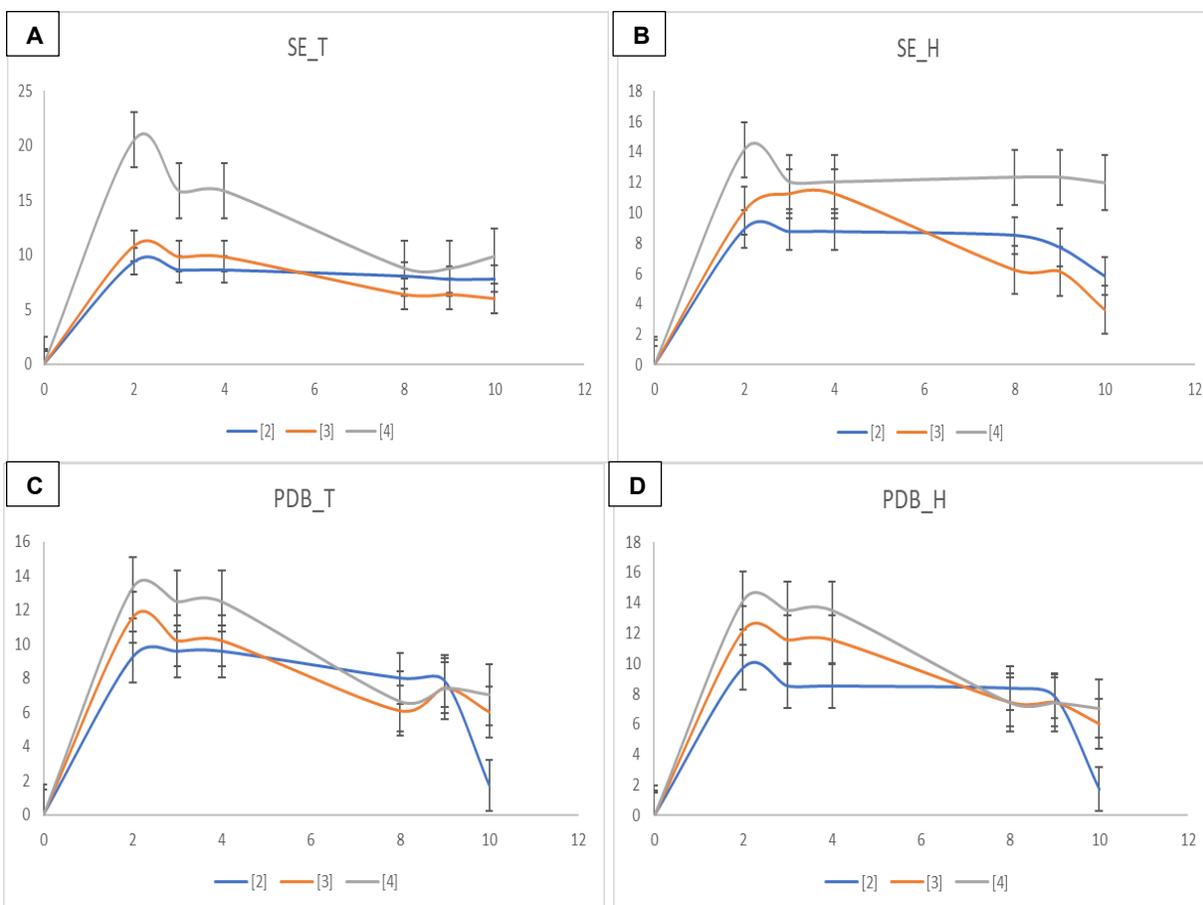
Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu₂O aplicadas en la morfología 4H



Nota. Se muestra el promedio del diámetro del halo de inhibición por parte de las NPs de Cu₂O en morfología 4H, durante 10 días, con las metodologías: 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 Cu₂O aplicadas 1,49M, 0,245 M, 0,123 M, respectivamente.

Figura 27.

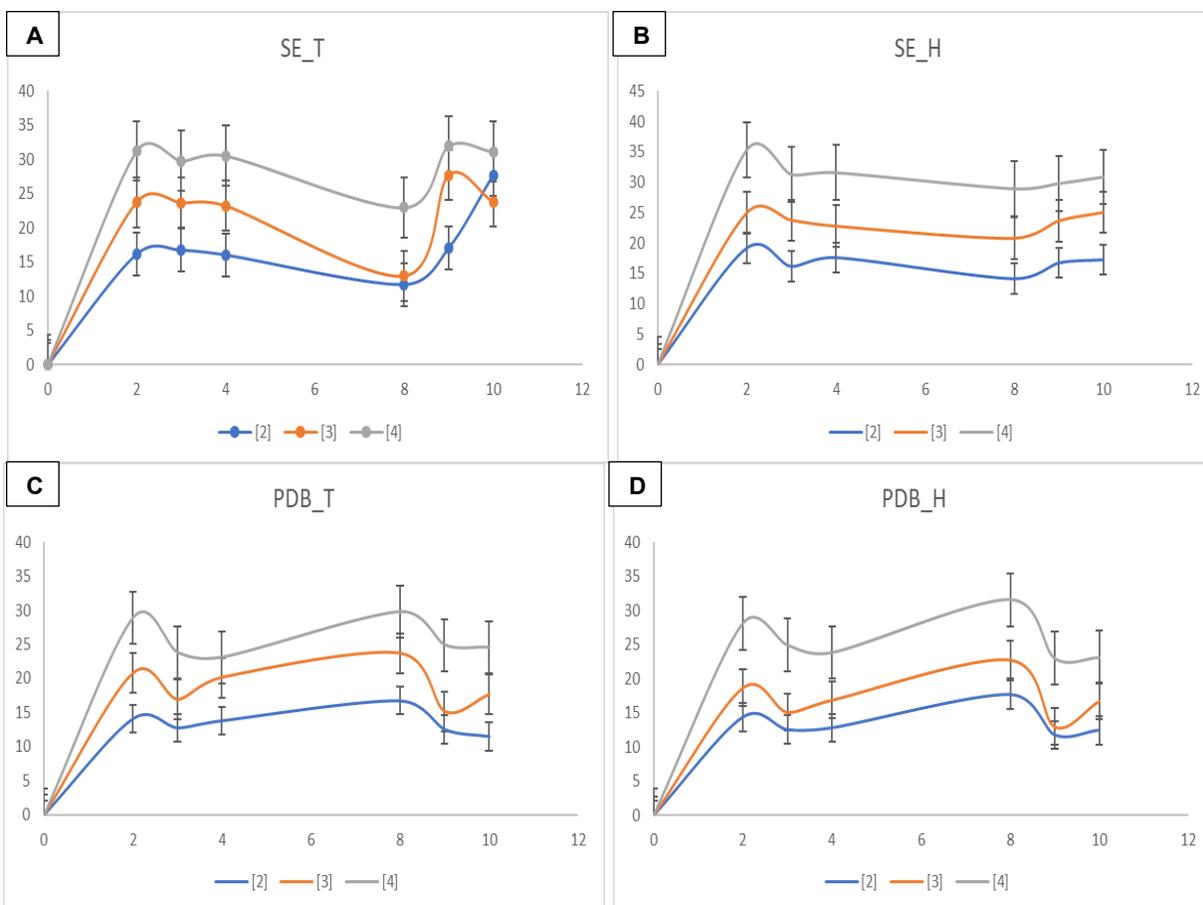
Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu₂O aplicadas en la morfología 5H



Nota. Se muestra el promedio del diámetro del halo de inhibición por parte de las NPs de Cu₂O en morfología 5H, durante 10 días, con las metodologías: 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 Cu₂O aplicadas 1,49M, 0,245 M, 0,123 M, respectivamente.

Figura 28.

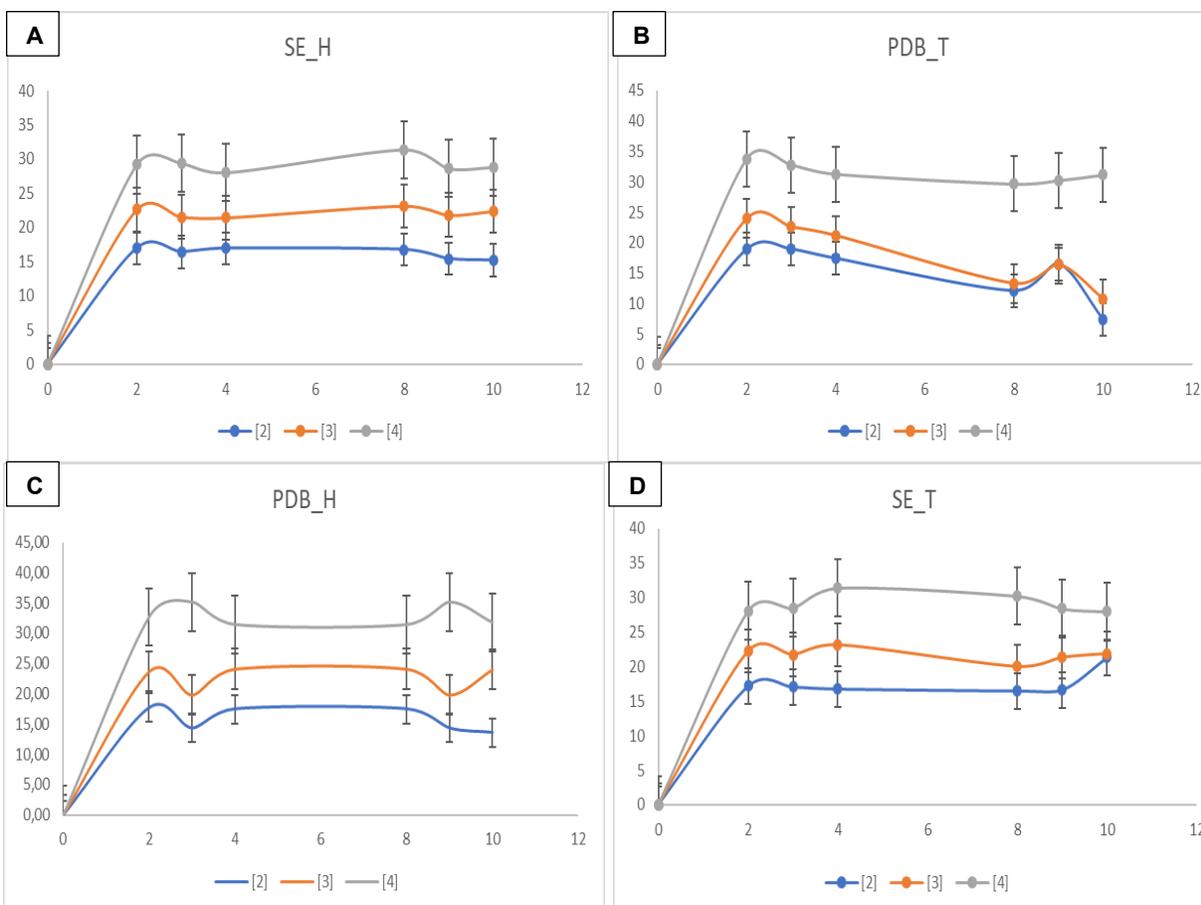
Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu₂O aplicadas en la morfología 13H



Nota. Se muestra el promedio del diámetro del halo de inhibición por parte de las NPs de Cu₂O en morfología 13H, durante 10 días, con las metodologías: 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 Cu₂O aplicadas 1,49M, 0,245 M, 0,123 M, respectivamente.

Figura 29.

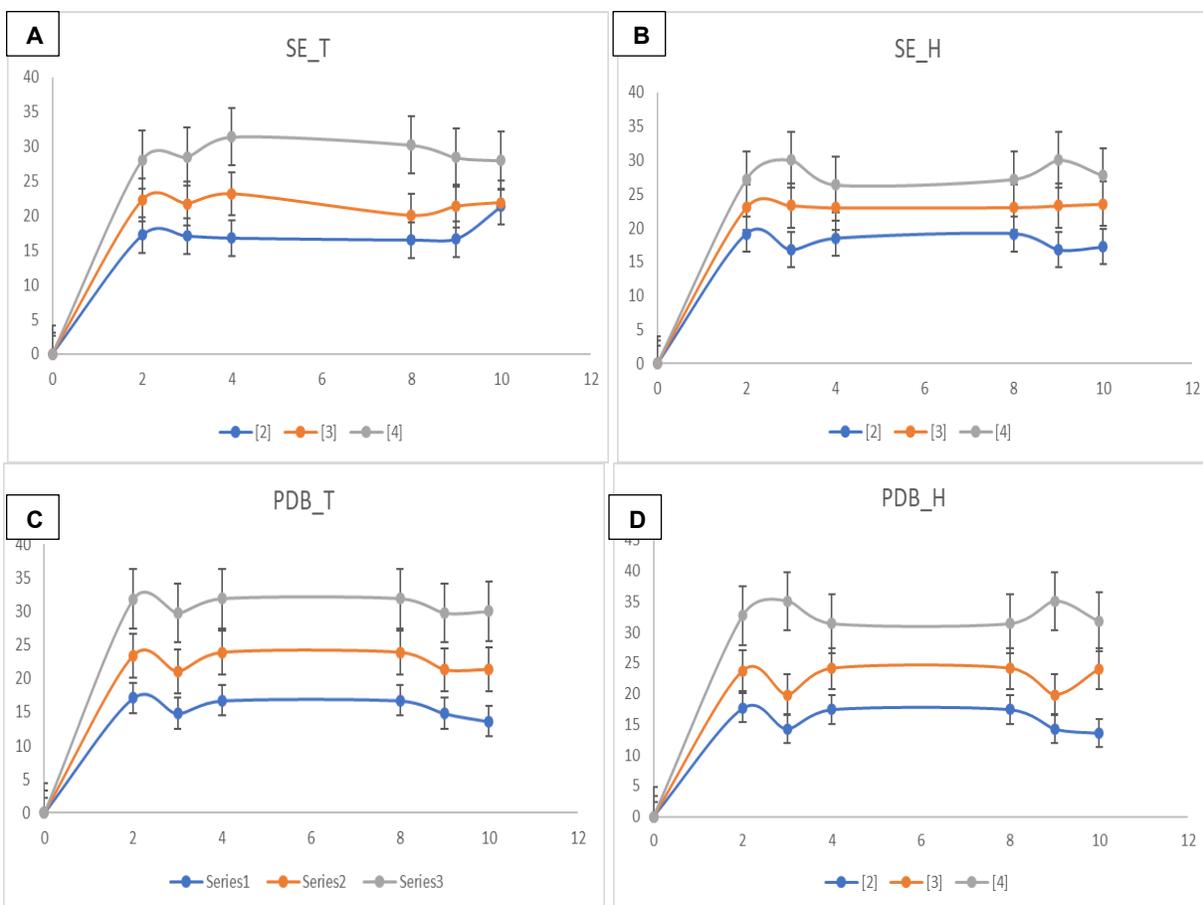
Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu₂O aplicadas en la morfología 18H



Nota. Se muestra el promedio del diámetro del halo de inhibición por parte de las NPs de Cu₂O en morfología 18H, durante 10 días, con las metodologías: 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 Cu₂O aplicadas 1,49M, 0,245 M, 0,123 M, respectivamente.

Figura 30.

Diámetro del halo de inhibición de NPs de Cu₂O aplicadas en la morfología 28H



Nota. Se muestra el promedio del diámetro del halo de inhibición por parte de las NPs de Cu₂O en morfología 28H, durante 10 días, con las metodologías: 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 Cu₂O aplicadas 1,49M, 0,245 M, 0,123 M, respectivamente.

Capítulo V: Discusión

Las nanopartículas sintetizadas por química verde en los últimos años se han considerado como una metodología eficiente, novedosa y sobre todo porque genera una baja toxicidad en el medio ambiente (Sharma et al., 2019). Para la obtención de diversas nanopartículas metálicas se han empleado diversos metales como el oro (Au), plata (Ag), cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe). El estudio de la oxidación de las NPs de cobre es importante porque posee múltiples estados de oxidación y generalmente forma óxidos estables como el CuO y el Cu₂O (Athira et al., 2021), es por ello que el cobre se ha utilizado por sus diversas características (catalíticas, ópticas y biológicas).

De acuerdo a Akintelu et al., (2020) para la síntesis de nanopartículas de cobre (NPsCu) u óxidos de cobre (NPs CuO/Cu₂O) mediante química verde se puede emplear el uso de las diversas sales de cobre como el sulfato de cobre, nitrato de cobre, cloruro de cobre y el acetato de cobre, pero hay que tener en cuenta que la eficacia de la formación de las nanopartículas de cobre radica en el potencial redox tanto del agente precursor como agente reductor (Rajeshkumar et al., 2019). Es de gran importancia tener en cuenta que la selección del precursor metálico puede generar cambios en la conformación fisicoquímica de la nanopartícula. En diversos estudios se ha reportado sobre la síntesis de nanopartículas de óxidos de cobre con características antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenos mediante el uso de Cu(NO₃)₂ como sal precursora (Hadis et al., 2020) (Meshkatalasadat y Momeni, 2023) (Emre, 2021).

Uno de los factores importantes para la síntesis de nanopartículas de óxido de cobre radica en catalizadores de reacción como la temperatura o el ajuste del pH (Fuku et al., 2020). En este contexto Athira et al., (2021), reportan que a temperatura ambiente algunos metales sufren una oxidación superficial, como por ejemplo el Fe, Al, Zn y entre ellos el Cu. Al modificar el pH permiten la formación de NPs Cu₂O a partir de pH ácidos, por otro lado, de acuerdo a

Najoua et al., (2016), el ajuste del pH se realiza debido a una actividad baja de las moléculas reductoras y por la acidez que se tiene al mezclar la sal precursora y el agente reductor. Además, reporta que a $\text{pH} \leq 6$ forman nanopartículas de Cu_2O cubicas con un tamaño promedio de 3 nm.

A partir de la espectrofotometría UV-Vis se obtuvo una absorbancia máxima en 455 nm de las NPs de Cu_2O sintetizadas mediante química verde, de acuerdo a un estudio realizado por Torres et al., (2022), el rango del plasmón de las nanopartículas de óxido de cobre va de 400 a 500 nm (Butte y Waghuley, 2020) lo que afirma la presencia de las nanopartículas de óxido de cobre mediante la observación del plasmón obtenido en el espectro UV-Vis.

La caracterización mediante la Difracción de Rayos-X (XRD), muestra que todos los picos obtenidos se encuentran indexados a el óxido de cobre (Cu_2O) de fase cubica con los siguientes parámetros de celda $a = 4.271 \text{ \AA}$, $b = 4.271 \text{ \AA}$ y $c = 7.271 \text{ \AA}$, lo cual coincide con el código de referencia (01-080-7711). Los picos obtenidos 2θ : 29.5440° , 36.3629° , 42.3142° , 61.4016° y 73.6604° corresponden a una estructura cristalina de Cu_2O , de acuerdo a Zayyoun et al., (2016), los picos obtenidos corresponden a los planos atómicos (111), (111), (200) y (211), respectivamente, estas intensidades máximas registradas implican que la muestra es muy cristalina.

Mediante el análisis del diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de óxido de cobre con el Dynamic Light Scattering DLS se obtuvo un valor de 9.8 nm, por otro lado, la caracterización mediante el microscopio electrónico de transmisión (TEM) a partir del análisis del tamaño en ImageJ – FIJI se obtuvo un valor de 8.45 nm y finalmente mediante el cálculo del tamaño de la nanopartícula a partir de la ecuación de Scherrer dio como resultado 9.1 nm, varían y difieren de forma considerable. De acuerdo a Campos *et al.*, (2023), el cambio en las mediciones del tamaño, puede deberse a factores de adhesión de los componentes presentes en el extracto. Además, Quester et al., (2013) menciona que el diámetro hidrodinámico de las

nanopartículas medido en el DLS permite conocer el valor aparente del núcleo de cobre y de la capa estabilizante adquirida. Por otro lado, Wang *et al.*, (2015), menciona que la cinética de estabilidad de las NPs de cobre es un paso muy difícil de obtener ya que estos están en dependencia de las biomoléculas (fenoles, flavonoides, proteínas) presentes en los extractos y estos actúan como agentes reductores o como agentes estabilizadores. En este punto Jastoria *et al.*, (2020), argumenta que la morfología y el tamaño puede estar influenciado por diversos factores como la concentración de los reactivos, calidad del extracto y condiciones de reacción para la síntesis.

Se obtuvo la composición elemental de las nanopartículas de óxido de cobre mediante un análisis SEM-EDS reflejada en un porcentaje de masa normalizada: Cu (62.03503%), y O₂ (32.26025%) y Na (5.714713%). En la investigación de Sudha *et al.*, (2021) el porcentaje de masa normalizado representa la relación específica de las concentraciones presente en la muestra de nanopartículas analizada corresponde al porcentaje atómico de cada elemento (Feng *et al.*, 2012)

La actividad antimicrobiana de las NPs Cu₂O se evaluó mediante el ensayo de inhibición del crecimiento microbiano con la metodología de difusión en pozo. De acuerdo a Cuong *et al.*, (2020) sugiere que el efecto antimicrobiano de las NPs de Cu₂O es que genera la muerte celular de los microorganismos debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Diversas investigaciones científicas buscan explicar el posible mecanismo de la actividad antifúngica de nanopartículas metálicas, en este contexto Khan *et al.*, (2020) considera que el mecanismo antifúngico se basa en la interacción que tiene los iones metálicos al ingresar dentro de la célula por los extremos apicales de las hifas con los grupos aminos, nucleófilos, tiol, provocando la inactivación de diversas enzimas por parte de los iones de cobre es decir se generan daños en la respiración celular, maquinaria replicativa de las células de los hongos, de esta forma generando la muerte celular.

Capítulo VI: Conclusiones

- Se logro sintetizar NPs mediante química verde utilizando Cu_2O con extracto de taxo, mediante la confirmación del cambio de color azul intenso a una coloración borgoña/amarillo al obtenerse los óxidos de cobre.
- Se confirmo 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 logro caracterizar la NPs mediante la técnica TEM obteniendo una gráfica de la misma a una escala nanométrica que mediante un análisis en FIJI-Image 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 confirmo la composición estructural de NPs de óxido de cobre de fase cubica con 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).
- Se realizo 3 muestreos a partir del hormigón de resistencia media ($f_c = 240 \text{ kg/cm}^2$) 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.

Capítulo VII: 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.

Capítulo VIII: Bibliografía

Adewale, D., Kolawole, A., Olugbeko, S., & Latona, D. (2021). Green chemistry approach towards the synthesis of copper nanoparticles and its potential applications as therapeutic agents and environmental control. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100176>

Akintelu, S. A., Folorunso, A. S., Folorunso, F. A., & Oyebamiji, A. K. (2020). Green synthesis of copper oxide nanoparticles for biomedical application and environmental remediation. *Heliyon*, 6(7). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04508>

Akintelu, S. A., Olugbeko, S. C., Folorunso, A. S., Oyebamiji, A. K., & Folorunso, A. F. (2021). Potentials of phytosynthesized silver nanoparticles in biomedical fields: a review. *Int Nano Lett*(11), 273–293. <https://doi.org/10.1007/s40089-021-00341-1>

Alireza, E., Magnus, N., Dahlström, C., & Edlund, H. (2018). Controlled Synthesis of Cu and Cu₂O NPs and Incorporation of Octahedral Cu₂O NPs in Cellulose II Films. *Nanomaterials*, 8(4), 238. <https://doi.org/10.3390/nano8040238>

Álvarez, A. I., Navarro, M., Robles, C., Plaza, J., Sáez, M. J., Muñoz, S., & Abadía, F. (2019). Microbial population changes and their relationship with human health and disease. *Microorganisms*, 7(3), 68. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030068>

Amjad, r., Mubeen, B., Ali, S. S., Imam, S. S., Alshehri, S., Ghoneim, M. M., . . . Kazmi, I. (2021). Green Synthesis and Characterization of Copper Nanoparticles Using *Fortunella margarita* Leaves. *Polymers*, 13(24), 4364. <https://doi.org/10.3390/polym13244364>

- Arreche, R., & Vázquez, P. (2020). Green biocides to control biodeterioration in materials science and the example of preserving World Heritage Monuments. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 100359. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100359>
- Athira, K., Gurralla, L., & Kumar, D. V. (2021). Biosurfactant-mediated biosynthesis of CuO nanoparticles and their antimicrobial activity. *Applied Nanoscience*, 11(4), 1447-1457. <https://doi.org/10.1007/s13204-021-01766-y>
- Barberia, L., Gámez-Espinosa, E., Viera, M., & Bellotti, N. (2019). Assessment of three plant extracts to obtain silver nanoparticles as alternative additives to control biodeterioration of coatings. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 141, 52-61.
- Barberia-Roque, L., Obidi, O. F., Gámez Espinosa, E., Viera, M., & Bellotti, N. (2019). Hygienic coatings with bioactive nano-additives from *Senna occidentalis*-mediated green synthesis. *NanoImpact*, 16, 100184. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100184>
- Barua, R. C., Kolman, M. A., Aguila, M. S., Zapata, P. D., & Alvarenga, A. E. (2021). Aislamiento e identificación de microorganismos amilolíticos y tolerantes a cianuro de efluentes de la industria almidonera. *Revista de Ciencia y Tecnología*(35), 1-10. https://doi.org/http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872021000100001&lng=es&tling=es.
- 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*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Biotecnología. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/36121>

- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bou, G., Fernandez, A., Gacria, G., Saez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bridier, A., Piard, J. C., Pandin, C., Labarthe, S., Dubois Brissonnet, F., & Briandet, R. (2017). Plasticidad de organización espacial como un impulsor adaptativo de comunidades microbianas de superficie. *Microbiol frontal*, 8(1364).
- Butte, S. M., & Waghuley, S. A. (2020). Optical properties of Cu₂O and CuO. *AIP Conference Proceedings*, 2220(1). <https://doi.org/10.1063/5.0001644>
- Campos, D. A., Montes de Oca, G., Rojas, J., Delfín, D., Juárez, L., Nazario, R., . . . Simbrón de la Cruz, M. (2023). Cu₂O nanoparticles synthesized by green and chemical routes, and evaluation of their antibacterial and antifungal effect on functionalized textiles. *Biotechnol Rep (Amsterdam, Netherlands)*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00785>
- Castelblanco, E. M., Martín, J. P., Morales, S. M., & Rodríguez, J. P. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 36-44.
- Cerchier, Pietrogiovanni, Dabalà, A., & Brunelli, K. (2017). "Green synthesis of copper nanoparticles with ultrasound assistance" . *Green Processing and Synthesis*, 6(3), 311-316. <https://doi.org/10.1515/gps-2016-0192>

Correa, M. V., Rastelli, S. E., López, A., Rosato, V. G., & Gómez de Saravia, G. F. (2020).

Tratamientos superficiales con potencial aplicación en construcciones de hormigón de importancia patrimonial.

Cuong, H. N., Pansambal, S., Ghotekar, S., Oza, R., Hai, N. T., Viet, N. M., & Nguyen, V. H.

(2022). New frontiers in the plant extract mediated biosynthesis of copper oxide (CuO) nanoparticles and their potential applications: A review. *Environmental Research*, 203, 111858. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111858>

Dongpeng, H., Fasi, W., Wenxia, M., JiDong, G., Ruihong, X., Junjian, H., . . . Shi-Weng, L.

(2022). Assessment of cleaning techniques and its effectiveness for controlling biodeterioration fungi on wall paintings of Maijishan Grottoes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2022.105406>

Dresler, C., Saladino, M. L., Demirbag, C., Caponetti, E., Chillura Martino, D. F., & Alduina, R.

(2017). Development of controlled release systems of biocides for the conservation of cultural heritage. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125, 150-156. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.09.007>

Emre, A. (2021). The Facile Synthesis of Cu₂O-Cu hybrid cubes as efficient visible-light-driven

photocatalysts for water remediation processes. *Powder Technology*, 394, 1111-1120. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.09.031>

Eyssautier, S., Franco, I., Misra, A., Hubert, J., Vaillant, N., Streb, C., & Mitchell, S. (2023).

Evaluating the durability and performance of polyoxometalate-ionic liquid coatings on calcareous stones: Preventing biocolonisation in outdoor environments. *Science of The Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163739>

Falkiewics-Dulik, M., Janda, K., & Wypych, G. (2015). *Handbook of Biodegradation*.

Biodeterioration and Biostabilization.

- Femilaa, V., Pachiappan, R., & Cornejo, L. (2020). Nano based technologies for antibacterial, antifungal, and antiviral coatings. *Antiviral and Antimicrobial Smart Coatings*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99291-6.00001-3>
- Feng, L., Zhang, C., Gao, G., & Daxiang, C. (2012). Facile synthesis of hollow Cu₂O octahedral and spherical nanocrystals and their morphology-dependent photocatalytic properties. *Nanoscale Res Lett*, 7, 276. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-276>
- Fidanza, M. R., & Caneva, G. (2019). Natural biocides for the conservation of stone cultural heritage: A review. *Journal of Cultural Heritage*, 38, 271-286.
<https://doi.org/10.1016/j.culher.2019.01.005>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biopelículas: una forma emergente de vida bacteriana. *Nat Rev Microbiol*, 14, 563-575.
- Fouda, A., Abdel Maksoud, G., Abdel Rahman, M. A., Eid, A. M., Barghoth, M. G., & El Sadany, M. A. (2019). Monitoring the effect of biosynthesized nanoparticles against biodeterioration of cellulose-based materials by *Aspergillus niger*. *Cellulose*, 26, 6583.
- Fuku, X., Modibedi, M., & Mathe, M. (2020). Green synthesis of Cu/Cu₂O/CuO nanostructures and the analysis of their electrochemical properties. *SN Appl. Sci*, 2, 902.
<https://doi.org/10.1007/s42452-020-2704-5>
- Galati, E., Tebbe, M., Querejeta Fernández, A., Xin, H. L., Gang, O., Zhulina, E. B., & Kumacheva, E. (2017). Shape-Specific Patterning of Polymer-Functionalized Nanoparticles. *ACS nano*, 11(5), 4995-5002. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01669>
6597

- Gámez Espinosa, E., Bellotti, N., Deyá, C., & Cabello, M. (2020). Mycological studies as a tool to improve the control of building materials biodeterioration. *Journal of Building Engineering*, 101738. <https://doi.org/10.1016/j.jobe.2020.101738>
- Grabek, D., Tekiela, A., & Kasprzyk, I. (2017). Risk of biodeterioration of cultural heritage objects, stored in the historical and modern repositories in the Regional Museum in Rzeszow. *Int. Biodeterior. Biodegrad*, 123, 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.05.028>
- Gulotta, D., Villa, F., Cappitelli, F., & Toniolo, L. (2018). Biofilm colonization of metamorphic lithotypes of a renaissance cathedral exposed to urban atmosphere. *Science of The Total Environment*, 639, 1480-1490. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.277>
- Hadis, D., Maryam, V., & Alireza, N. (2020). A comprehensive study on the enhanced photocatalytic activity of a double-shell mesoporous plasmonic Cu@ Cu₂O/SiO₂ as a visible-light driven nanophotocatalyst. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(22), 27582-27597. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08817-x>
- Haolan, X., Wenzhong, W., & Wei, Z. (2006). Shape Evolution and Size-Controllable Synthesis of Cu₂O Octahedra and Their Morphology-Dependent Photocatalytic Properties. *J. Phys. Chem. B*, 110(28), 13829–13834. <https://doi.org/10.1021/jp061934y>
- Hasan, N., Anjum, S., Khan, M., & Ilmi, R. (2023). Metallic nanoparticles for theranostic application. *Inorganic Nanosystems Theranostic Nanosystems* (2), 351-387. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85784-0.00008-X>
- Hernández, M., Quijada, N., Rodríguez, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>

- Indiarto, R., Indriana, L. P., Andoyo, R., Subroto, E., & Nurhadi, B. (2022). Bottom-up nanoparticle synthesis: a review of techniques, polyphenol-based core materials, and their properties. *Eur Food Res Technol*, 248, 1-24. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03867-y>
- Islam, F., Shohag, S., Uddin, M., Islam, M. R., Nafady, M. H., Akter, A., . . . Cavalu, S. (2022). Exploring the Journey of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) toward Biomedical Applications. *Materials*, 15(6), 2160. <https://doi.org/10.3390/ma15062160>
- Ituen, E., Ekemini, E., Yuanhua, L., Li, R., & Singh, A. (2020). Mitigation of microbial biodeterioration and acid corrosion of pipework steel using *Citrus reticulata* peels extract mediated copper nanoparticles composite. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 149, 104935.
- Jasrotia, T., Chaudhary, S., Kaushik, A., Kumar, R., & Chaudhary, G. R. (2020). Green chemistry-assisted synthesis of biocompatible Ag, Cu, and Fe₂O₃ nanoparticles. *Materials Today Chemistry*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2019.100214>
- Joseph, E. (2021). Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1>.
- Kakakhel, M. A., Wu, F., Gu, J. D., Feng, H., Shah, K., & Wang, W. (2019). Controlling biodeterioration of cultural heritage objects with biocides: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 143, 104721. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104721>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.

- Kooti, M., & Matouri, L. (2010). Fabrication of Nanosized Cuprous Oxide Using Fehling's Solution. *Transaction F: Nanotechnology*, 17(1), 73-78.
- Leung, Y. H., Ng, A. M., Xu, X., Shen, Z., Gethings, L. A., Wong, M. T., . . . Leung, F. C. (2014). Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards Escherichia coli. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 10(6), 1171–1183. <https://doi.org/10.1002/sml.201302434>
- Li, Q., Zhang, B., Yang, X., & Ge, Q. (2018). Deterioration-Associated Microbiome of Stone Monuments: Structure, Variation, and Assembly. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(7). <https://doi.org/10.1128/aem.02680-17>
- Liu, B., Mastalerz, M., & Schieber, J. (2022). SEM petrography of dispersed organic matter in black shales: A review. *Earth-Science Reviews*, 224, 103874.
- Liu, X., Koestler, R. J., Warscheid, T., Katayama, Y., & Gu, J. D. (2020). Microbial deterioration and sustainable conservation of stone monuments and buildings. *Nature Sustainability*. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-00602-5>
- Liu, X., Qian, Y., Wang, Y., Wu, F., Wang, W., & Dong Gu, J. (2022). Innovative approaches for the processes involved in microbial biodeterioration of cultural heritage materials. *Current Opinion in Biotechnology*. *ScienceDirect*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102716>
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18.
- Mallakpour, S., & Jarahiyan, A. (2017). Surface treatment of copper (II) oxide nanoparticles using citric acid and ascorbic acid as biocompatible molecules and their utilization for the

- preparation of poly(vinyl chloride) novel nanocomposite films. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 30(9), 1267-1284. <https://doi.org/10.1177/0892705716632857>
- Medici, S., Peana, M., Pelucelli, A., & Zoroddu, M. A. (2021). An updated overview on metal nanoparticles toxicity. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2021.06.020>
- Meshkatsadat, M., & Momeni, A. (2023). Facile Green Synthesis of Copper Nanoparticles (Cu NPs) utilizing *Passiflora caerulea* L. Leaves Extrac. *International Journal of New Chemistry*, 10(2), 106-115. <https://doi.org/10.22034/ijnc.2022.1972519.1316>
- Milazzo, G., Caroli, S., & Sharma, V. K. (1991). *Tables of standard electrode potentials*. UMI Out-of-Print Books on Demand y Ann Arbor, Mich.
- Mitra, S., Nguyen, L. N., Akter, M., Park, G., Choi, E. H., & Kaushik, N. K. (2019). Impact of ROS Generated by Chemical, Physical, and Plasma Techniques on Cancer Attenuation. *Cancers*, 11(7), 1030. <https://doi.org/10.3390/cancers11071030>
- Mohamed, E. A. (2020). Green synthesis of copper & copper oxide nanoparticles using the extract of seedless dates. *Heliyon*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03123>
- Moncayo, M. (2022). *Caracterización fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de diente de león (Taraxacum officinale)*. Universidad Estatal de Milagro.
- Murinzi, T. W., Adedibu Clement, T., Chitsa, V., & Mehlana, G. (2018). Copper Oxide Nanoparticles Encapsulated in HKUST-1 Metal-Organic Framework for Electr Oxidation of Citric Acid. *Journal of Solid State Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2018.09.003>
- Nabila, M. I., & Kannabiran, K. (2018). Biosynthesis, characterization and antibacterial activity of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) from actinomycetes. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 15, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.011>

- Nadeem, J., & Dirk, L. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20, 262. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
- Naikoo, G. A., Mustaqeem, M., Hassan, I. U., Awan, T., Arshad, F., Salim, H., & Qurashi, A. (2021). Bioinspired and green synthesis of nanoparticles from plant extracts with antiviral and antimicrobial properties: A critical review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 25(9), 101304. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101304>
- Najoua, Z., Lahoucine, B., Laanab, L., & Boujemaâ, J. (2016). The effect of pH on the synthesis of stable Cu₂O/CuO nanoparticles by sol–gel method in a glycolic medium. *Applied Physics A*, 122(5). <https://doi.org/10.1007/s00339-016-0024-9>
- Palit, S., & Hussain, C. (2018). Recent Advances in Green Nanotechnology and the Vision for the Future. Green Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Their Applications. 1-21. <https://doi.org/10.1002/9781119418900.ch1>
- Parashar, M., Shukla, V. K., & Singh, R. (2020). Metal oxides nanoparticles via sol–gel method: a review on synthesis, characterization and applications. *J Mater Sci: Mater Electron*, 31, 3729–3749. <https://doi.org/10.1007/s10854-020-02994-8>
- Pena, J., Ascaso, C., Sanz, M., Pérez Ortega, S., Oujja, M., Wierzchos, J., & García Heras, M. (2018). Effect of biological colonization on ceramic roofing tiles by lichens and a combined laser and biocide procedure for its removal. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.003>
- Pinna, D. (2021). Microbial Growth and its Effects on Inorganic Heritage Materials. In E. Joseph, *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage* (pp. 3-35). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1>

- Pinna, D., Galeotti, M., Perito, B., Daly, G., & Salvadori, B. (2018). In situ long-term monitoring of recolonization by fungi and lichens after innovative and traditional conservative treatments of archaeological stones in Fiesole (Italy). *Int Biodeterior Biodegradation*, 132, 49–58.
- Pyzik, A., Ciuchcinski, K., Dziurzynski, M., & Dziewit, L. (2021). The Bad and the Good- Microorganisms in Cultural Heritage Environments-An Update on Biodeterioration and Biotreatment Approaches. *Materials*, 14(1), 177. <https://doi.org/10.3390/ma14010177>
- Quester, K., Avalos-Borja, M., & Castro-Longoria, E. (2013). Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*, 54, 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>
- Rajeshkumar, S., Menon, S., Venkat Kumar, S., Tambuwala, M., Bakshi, H. A., Mehta, M., . . . Dua, K. (2019). Antibacterial and antioxidant potential of biosynthesized copper nanoparticles mediated through *Cissus amotiana* plant extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 192(5). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111531>
- Reyes Gasga, J. (2021). Estudio del esmalte dental humano por microscopía electrónica. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 9(2), 1-6.
- Romani, M., Adouane, E., Carrion, C., Veckerle, C., Lefevre, M., Intertaglia, L., . . . Lami, R. (2021). Diversity and activities of pioneer bacteria, algae, and fungi colonizing ceramic roof tiles during the first year of outdoor exposure. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 162, 105230. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105230>
- Romani, M., Warscheid, T., Nicole, L., Marcon, L., Di Martino, P., Suzuki, M., & 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.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149846>

Rosato, V., Lloro, F., & Traversa, L. (2016). *Deterioro biológico de materiales y técnicas para su limpieza y prevención*. Laboratorio de Entrenamiento Multidisciplinario para la Investigación Tecnológica, La Plata.

Roy, A., Elzaki, A., Tirth, V., Kajoak, S., Osman, H., Algahtani, A., . . . Bilal, M. (2021). Biological Synthesis of Nanocatalysts and Their Applications. *Catalysts*, 11(12), 1494.

<https://doi.org/10.3390/catal11121494>

Sadeghi, A., Soheil, S., Reza, M., Nedarifar, M., & Satarzadeh, N. (2023). Mentha pulegium as a source of green synthesis of nanoparticles with antibacterial, antifungal, anticancer, and antioxidant applications. *Scientia Horticulturae*.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112215>

Sandoval, C. A., & del Pilar Infante Luna, E. (2021). aplicaciones médicas de las nanopartículas: principios físicos y evolución de su implementacion/medical applications of nanoparticles: physical principles and evolution of their implementation.". *Góndola, enseñanza y aprendizaje de las ciencias*, 16(2), 455.

link.gale.com/apps/doc/A665459690/IFME?u=anon~72d3fea5&sid=googleScholar&xid=3f529786

Saravanakumar, A., Peng, M., Ganesh, M., Jayaprakash, J., Mohankumar, M., & Jang, H.

(2017). Low-cost and eco-friendly green synthesis of silver nanoparticles using Prunus japonica (Rosaceae) leaf extract and their antibacterial, antioxidant properties. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(6), 1165-1171.

<https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1203795>

- Sarwar, N., Humayoun, U. B., Kumar, M., Zaidi, S. F., Yoo, J. H., Ali, N., & Yoon, D. H. (2021). Citric acid mediated green synthesis of copper nanoparticles using cinnamon bark extract and its multifaceted applications. *Journal of Cleaner Production*, 292, 125974. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.125974>
- Sathiyavimal, S., Vasantharaj, S., Bharathi, D., Mythili, S., Manikandan, E., Kumar, S. S., & Pugazhendhi, A. (2018). Biogenesis of copper oxide nanoparticles (CuONPs) using *Sida acuta* and their incorporation over cotton fabrics to prevent the pathogenicity of Gram negative and Gram positive bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.09>
- Saurabh, S., Ramsha, K., & Achlesh, D. (2021). Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles, and their applications in wastewater treatment: A review. *Environmental Technology & Innovation*. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101924>
- Sharma, Prashansa, Pant, S., Dave, V., Tak, K., Sadhu, V., & Reddy, K. R. (2019). Green synthesis and characterization of copper nanoparticles by *Tinospora cardifolia* to produce nature-friendly copper nano-coated fabric and their antimicrobial evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 160(1), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.007>
- Sudha, V., Murugadoss, G., & Thangamuthu, R. (2021). Structural and morphological tuning of Cu-based metal oxide nanoparticles by a facile chemical method and highly electrochemical sensing of sulphite. *Sci Rep*, 11, 3413. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82741-z>
- Tao, H., Wu, T., Aldeghi, M., Wu, T., Aspuru, A., & Kumacheva, E. (2021). Nanoparticle synthesis assisted by machine learning. *Nat Rev Mater*, 6, 701–716. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00337-5>

- Torres, S., Aleman, J. L., Torres, L., Luevano, E., & Pathiyamattom, S. (2022). Co₂ Photoreduction on Cuprous Oxide (Cu₂O) Nanoparticles Synthesized Using Psidium Guajava Extract. *SSRN*, 28. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4225239>
- Tuama, A. N., Abbas, K. H., Hamzah, M. Q., Mezan, S. O., Jabbar, A. H., & Agam, M. A. (2020). An overview on characterization of silver/cuprous oxide nanometallic (Ag/Cu₂O) as visible light photocatalytic. *International Journal of Advanced Science and Technology*, 29(3), 5008-5018.
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International journal of nanomedicine*, 12, 1227–1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- Wang, S., Liu, H., Zhang, Y., & Xin, H. (2015). The effect of CuO NPs on reactive oxygen species and cell cycle gene expression in roots of rice. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(3), 554–561. <https://doi.org/10.1002/etc.2826>
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA Fingerprinting in Plants Principles Methods, and Applications* (Vol. 2). Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1201/9781420040043>
- Zaefferer, S. (2011). A critical review of orientation microscopy in SEM and TEM. *Crystal Research and Technology*, 46(6), 607–628. <https://doi.org/10.1002/crat.201100125>
- Zayyoun, N., Bahmad, L., Laânab, L., & Jaber, B. (2016). The effect of pH on the synthesis of stable Cu₂O/CuO nanoparticles by sol–gel method in a glycolic medium. *Appl. Phys. A*, 122(488). <https://doi.org/10.1007/s00339-016-0024-9>
- Zhgun, A., Avdanina, D., Shumikhin, K., Simonenko, N., Lyubavskaya, E., Volkov, I., & Ivanov, V. (2020). Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century

exhibits from State Tretyakov Gallery. *PLOS ONE*, 15(4), e0230591.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230591>