



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**SÍNTESIS VERDE Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE COMO POTENCIAL
BACTERICIDA PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA DEL RÍO
CHIBUNGA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: JULISSA MARÍA VILLAGOMEZ HERRERA

DIRECTORA: Bioq. Cl. MISHel CAROLINA MORENO SAMANIEGO MSc

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, **Julissa María Villagomez Herrera**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Julissa María Villagomez Herrera, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 04 de mayo del 2023

A handwritten signature in blue ink that reads "Julissa Villagomez". The signature is written in a cursive style and is enclosed within a hand-drawn oval shape.

Julissa María Villagomez Herrera
060440594-4

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: el Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, **SÍNTESIS VERDE Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE COMO POTENCIAL BACTERICIDA PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA DEL RÍO CHIBUNGA**, realizado por la señorita: **JULISSA MARÍA VILLAGOMEZ HERRERA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Bqf. Mónica Concha Guaila PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-05-04
Bq.Cl. Mishell Moreno Samaniego DIRECTOR(A) DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-05-04
Dra. Adriana Monserath Monge Moreno ASESOR(A) DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-05-04

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación se lo dedico con cariño a Dios, por haberme guiado y acompañado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y dotarme de sabiduría para finalizar con éxito mi meta anhelada. A mis padres: Pedro Villagomez y María Herrera, quienes, con sacrificio y amor, han sembrado en mi buenos principios, hábitos y valores, además, por su apoyo incondicional y por ser la fuente de inspiración para alcanzar mis metas y objetivos.

Julissa

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por guiar cada paso de mi vida y por todas las bendiciones recibidas, a mis queridos padres por ser un pilar fundamental en mi educación y por enseñarme que todos mis sueños se pueden cumplir con esfuerzo y dedicación. A mis hermanos por su cariño, apoyo incondicional y por incentivarne a cumplir mis objetivos. También quiero agradecer a todos mis docentes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por su vocación para compartirme sus conocimientos y formarme como profesional, de manera especial deseo expresar mis agradecimientos, a mi querida tutora Bq. Cl Mishell Moreno, quien con su experiencia, consejos y conocimientos fue mi guía y me ayudo a culminar con éxito este trabajo.

Julissa

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xv

ii

INTRODUCCIÓN	1
--------------------	---

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	2
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	4
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	4

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes de la investigación.....	5
2.2. Referencias teóricas.....	7
2.2.1. <i>Nanotecnología</i>	7
2.2.2. <i>Nanopartículas</i>	7
2.2.2.1. <i>Clasificación de nanopartículas</i>	8
2.2.3. <i>Nanopartículas de óxido de cobre</i>	8
2.2.3.1. <i>Nanopartículas de óxido de cobre como bactericida</i>	9
2.2.3.2. <i>Mecanismo de acción de las nanopartículas de óxido de cobre</i>	9
2.2.4. <i>Síntesis de nanopartículas</i>	10
2.2.4.1. <i>Síntesis verde</i>	11
2.2.5. <i>Eucalipto globulus (Eucalipto)</i>	12
2.2.6. <i>Factores que afectan la síntesis verde</i>	13
2.2.6.1. <i>Temperatura</i>	13

2.2.6.2.	<i>Tiempo</i>	13
2.2.6.3.	<i>Concentración del extracto vegetal</i>	14
2.2.6.4.	<i>pH</i>	14
2.2.7.	<i>Métodos de caracterización de nanopartículas de cobre</i>	14
2.2.7.1.	<i>Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis)</i>	15
2.2.7.2.	<i>Espectroscopia de infrarrojo</i>	15
2.2.7.3.	<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	15
2.2.8.	<i>Agua</i>	15
2.2.8.1.	<i>Demanda y uso del agua</i>	16
2.2.8.2.	<i>Calidad del agua</i>	16
2.2.9.	<i>Agua de río</i>	17
2.2.9.1.	<i>Río Chibunga</i>	17
2.2.10.	<i>Principales contaminantes del agua</i>	18
2.2.10.1.	<i>Agentes patógenos</i>	18
2.2.10.2.	<i>Desechos orgánicos</i>	18
2.2.10.3.	<i>Sustancias químicas orgánicas</i>	18
2.2.10.4.	<i>Sustancias químicas inorgánicas</i>	18
2.2.10.5.	<i>Nutrientes inorgánicos</i>	19
2.2.10.6.	<i>Contaminantes emergentes</i>	19
2.2.11.	<i>Aguas residuales</i>	19
2.2.11.1.	<i>Clasificación de las aguas residuales según su procedencia</i>	20
2.2.11.2.	<i>Tratamiento de aguas residuales</i>	21
2.2.12.	<i>Bacterias</i>	21
2.2.12.1.	<i>Morfología</i>	22
2.2.13.	<i>Medios de cultivo</i>	23
2.2.13.1.	<i>Tipos de los medios de cultivo según su utilidad</i>	24
2.2.14.	<i>Siembra</i>	25
2.2.14.1.	<i>Técnicas de siembra de cultivos puros</i>	25
2.2.15.	<i>Tinción Gram</i>	25
2.2.16.	<i>Bacterias más prevalentes en fuentes de agua</i>	26
2.2.17.	<i>Bacterias bioindicadores de la calidad del agua</i>	27
2.2.17.1.	<i>Coliformes totales</i>	28
2.2.17.2.	<i>Coliformes fecales y Escherichia coli</i>	28
2.2.17.3.	<i>Streptococos fecales</i>	29
2.2.17.4.	<i>Clostridium</i>	29
2.2.17.5.	<i>Pseudomonas</i>	30

2.2.18.	<i>Resistencia bacteriana</i>	30
2.2.18.1.	<i>Bacterias resistentes a los antibióticos</i>	31
2.2.19.	<i>Tipos de resistencia bacteriana</i>	32
2.2.19.1.	<i>Resistencia bacteriana natural o intrínseca</i>	33
2.2.19.2.	<i>Resistencia bacteriana adquirida</i>	33

CAPITULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	34
3.1.	Lugar de investigación	34
3.2.	Descripción de los procesos	34
3.2.1.	<i>Unidad de análisis</i>	34
3.2.2.	<i>Selección de la muestra</i>	34
3.2.2.1.	<i>Muestreo</i>	34
3.2.2.2.	<i>Toma de muestras</i>	35
3.2.2.3.	<i>Transporte de las muestras</i>	35
3.3.	Materiales, equipos y reactivos	36
3.3.1.	<i>Materiales</i>	36
3.3.2.	<i>Equipos</i>	36
3.3.3.	<i>Reactivos</i>	37
3.4.	Normas	37
3.5.	Enfoque de la investigación	37
3.6.	Alcance de la investigación	37
3.7.	Diseño de la investigación	38
3.7.1.	<i>Según la manipulación de las variables</i>	38
3.8.	Diseño experimental	38
3.8.1.	<i>Cálculo del coeficiente de Correlación de Pearson en Microsoft Excel</i>	40
3.8.2.	<i>Consideraciones de la Correlación de Pearson según el valor que toma r</i>	40
3.8.3.	<i>Hipótesis</i>	40
3.9.	Población de estudio	41
3.10.	Muestra	41
3.11.	Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	41
3.11.1.	<i>Síntesis de nanopartículas</i>	41
3.11.1.1.	<i>Obtención del extracto acuoso de Eucalyptus globulus (Eucalipto)</i>	42
3.11.1.2.	<i>Preparación de la solución de la sal precursora</i>	42
3.11.1.3.	<i>Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre.</i>	42

3.12. Caracterización de nanopartículas de óxido de cobre	43
3.12.1. Técnicas de recolección de datos	43
3.12.1.1. <i>Espectroscopia UV- vis.</i>	43
3.12.1.2. <i>Espectroscopia de infrarrojo IR</i>	44
3.12.1.3. <i>Microscopía electrónica de barrido</i>	45
3.12.2. Evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de cobre	45
3.12.2.1. <i>Preparación del medio de cultivo (Agar nutritivo)</i>	45
3.12.2.2. <i>Preparación de diluciones de las muestras de agua</i>	46
3.12.2.3. <i>Siembra en placas</i>	46
3.12.2.4. <i>Siembra por extensión en placa.</i>	46
3.12.2.5. <i>Siembra por estrías</i>	47
3.12.2.6. <i>Identificación de bacterias mediante Tinción Gram</i>	47
3.12.2.7. <i>Pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana</i>	47

CAPITULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	49
4.1. Obtención del extracto acuoso de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	49
4.1.1. <i>Análisis del extracto acuoso de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)</i>	50
4.1.1.1. <i>Test con cloruro férrico</i>	50
4.1.1.2. <i>Análisis por Espectrometría infrarroja (IR)</i>	51
4.2. Síntesis de nanopartículas de óxido de cobre	52
4.2.1. <i>Experimentos para la obtención de nanopartículas de óxido de cobre</i>	52
4.2.1.1. <i>Variando la concentración de la sal.</i>	52
4.3. Resultados de la síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre 0.05 M	57
4.4. Resultados de la caracterización de nanopartículas de óxido de cobre	58
4.4.1. <i>Espectroscopia Uv-vis</i>	58
4.4.2. <i>Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR)</i>	60
4.4.3. <i>Microscopia electrónica de barrido</i>	61
4.5. Resultados de la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de cobre ..	62
4.5.1. <i>Determinación del número de colonias formadas en Agar nutritivo.</i>	63
4.5.2. <i>Caracterización morfológica de bacterias mediante la técnica de Tinción Gram.</i> ...	64
4.6. Pruebas microbiológicas	66
4.6.1 <i>Determinación del número de colonias en Agar Nutritivo</i>	66
4.6.1.1. <i>Determinación del número de colonias bacterianas de las muestras de agua con nanopartículas de óxido de cobre cada 1, 2 y 4 horas expuestas a la luz solar.</i>	66

4.6.1.2.	<i>Determinación del crecimiento bacteriano en agar nutritivo de las muestras de agua sin nanopartículas de óxido de cobre cada 1, 2 y 4 horas.</i>	68
4.6.1.3.	<i>Determinación del número de colonias bacterianas formadas con y sin nanopartículas de óxido de cobre en estado puro.</i>	69
4.6.2.	<i>Análisis del estudio estadístico experimental</i>	69
4.6.3.	<i>Influencia de las variables</i>	70
4.6.3.1.	<i>Evaluación de efecto bactericida de las nanopartículas de CuO frente a bacterias</i>	70
4.6.3.2.	<i>Evaluación del efecto del tiempo de exposición de las muestras de agua de río a las nanopartículas de CuO.</i>	73
4.6.3.3.	<i>Evaluación del efecto de la luz solar sobre las muestras de agua de río con nanopartículas de CuO.</i>	74
CONCLUSIONES		75
RECOMENDACIONES		76
BIBLIOGRAFÍA		
ANÉXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1: Variables independientes	38
Tabla 3-2: Recuento de colonias bacterianas sector Cemento Chimborazo.	39
Tabla 3-3: Recuento de colonias bacterianas sector parque Ecológico.	39
Tabla 3-4: Recuento de colonias bacterianas sector Puente del cantón Guano.	39
Tabla 4-1: Lectura del análisis de la Espectrometría infrarroja (IR) del extracto de eucalipto.	52
Tabla 4-2: Condiciones de síntesis de CuONPs experimento 1.....	53
Tabla 4-3: Condiciones de síntesis de CuONPs, experimento 2.....	54
Tabla 4-4: Condiciones de síntesis de CuONPs, experimento 2.....	55
Tabla 4-5: Rendimiento experimental de la síntesis de nanopartículas de CuO.....	58
Tabla 4-6: Resultado del análisis por espectroscopía UV-vis.....	59
Tabla 4-7: Especies bacterianas presentes en las muestras de agua del río Chibunga.	66
Tabla 4-8: Recuento de colonias bacterianas sector Cemento Chimborazo.	67
Tabla 4-9: Recuento de colonias bacterianas sector parque Ecológico.....	67
Tabla 4-10: Recuento de colonias bacterianas sector Puente del cantón Guano.	67
Tabla 4-11: Recuento de colonias bacterianas sin nanopartículas de CuO.	68
Tabla 4-12: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de CuO.....	69
Tabla 4-13: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de CuO.....	69
Tabla 4-14: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de CuO.....	70
Tabla 4-15: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de CuO.....	70

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1:	Escala nanométrica donde se indica el tamaño de las nanopartículas.....	8
Ilustración 2-2:	Nanopartículas de CuO (SEM).....	8
Ilustración 2-3:	Mecanismo bacteriano de las nanopartículas de CuO.....	10
Ilustración 2-4:	Métodos de síntesis de nanopartículas.	11
Ilustración 2-5:	Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre.....	11
Ilustración 2-6:	Especie vegetal <i>Eucalyptus globulus</i>	12
Ilustración 2-7:	Composición química del agua residual de tipo urbana.....	20
Ilustración 2-8:	Formas y agrupación de las bacterias.....	22
Ilustración 2-9:	Crecimiento de todo tipo de colonias bacterianas en agar nutritivo.....	24
Ilustración 2-10:	Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.	26
Ilustración 3-1:	Localización de los laboratorios de la facultad de ciencias, ESPOCH.	34
Ilustración 3-2:	Puntos de toma de muestras de agua del río Chibunga.	35
Ilustración 3-3:	Calculo coeficiente de correlación de Pearson Excel.....	40
Ilustración 3-4:	Coefficiente de correlación de Pearson.	40
Ilustración 3-5:	Proceso para realizar diluciones seriadas de las muestras de agua.	46
Ilustración 4-1:	Hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> . (A) Lavado; (B) Secado.....	49
Ilustración 4-2:	Extracto acuoso de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto).....	49
Ilustración 4-3:	Presencia de compuestos fenólicos (A) Extracto; (B) Extracto mas FeCl	50
Ilustración 4-4:	Espectrometría infrarroja (IR) del extracto acuoso de <i>Eucalyptus globulus</i> .	51
Ilustración 4-5:	Durante la síntesis.....	53
Ilustración 4-6:	Después de la síntesis.....	53
Ilustración 4-7:	Durante la síntesis.....	54
Ilustración 4-8:	Después de la síntesis.....	54
Ilustración 4-9:	Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.25 M.	55
Ilustración 4-10:	Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.05M.	56
Ilustración 4-11:	Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.025 M.....	56
Ilustración 4-12:	Síntesis de CuO NPs: (A) solución de CuSO ₄ .5H ₂ O, (B) sal precursora más extracto, (C) CuO NPs.....	57
Ilustración 4-13:	Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.05 M.	59
Ilustración 4-14:	Espectroscopia de infrarrojo de nanopartículas de CuO 0.05 M.	60
Ilustración 4-15:	Microscopia electrónica de barrido de nanopartículas de óxido de cobre a 500x (izq.) y 5000X (der).....	61
Ilustración 4-16:	Toma de muestras de agua del río Chibunga.....	62

Ilustración 4-17: Diluciones de las muestras de agua del río Chibunga.....	62
Ilustración 4-18: Siembra de muestras de agua usando la cámara de flujo laminar.....	63
Ilustración 4-19: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo	63
Ilustración 4-20: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo	64
Ilustración 4-21: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo	64
Ilustración 4-22: (A) Preparación de la placa; (B) Proceso de Tinción Gram (B); (C) Vista al microscopio binocular.	65
Ilustración 4-23: (A) Bacilos Gram Negativos, (B) Cocos Gram positivos lente de 100X.....	65
Ilustración 4-24: (A) Crecimiento bacteriano sin nanopartículas; (B) Disminución de colonias 1h de exposición; (C) Disminución total de la carga bacteriana.	71
Ilustración 4-25: (A) Crecimiento de colonias Gram positivas sin NPs; (B) Placa con CuO NPs sin crecimiento.	71
Ilustración 4-26: (A) Crecimiento de colonias Gram negativas sin NPs; (B) Placa con CuO NPs sin crecimiento.	72

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** CÁLCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- ANEXO B:** RESULTADOS DE ESPECTROSCOPIA UV-VIS EXPERIMENTO 1
- ANEXO C:** RESULTADOS DE ESPECTROSCOPIA UV-VIS EXPERIMENTO 2
- ANEXO D:** RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE AGUA DEL RIO CHIBUNGA
- ANEXO E:** REPORTE URKUND

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

NPs	Nanopartículas
CuONPs	Nanopartículas de óxido de cobre
Cu	Cobre
CuO	Óxido de cobre
CuSO₄.5H₂O	Sulfato de cobre pentahidratado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
UV-Vis	Espectroscopía Ultravioleta Visible
FTIR	Espectroscopía de Infrarrojo
SEM	Microscopía de Barrido Electrónico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
λ	Longitud de onda

RESUMEN

El uso irracional de antibióticos ha generado que las bacterias desarrollen mecanismos de resistencia antibiótica. El agua, especialmente de aquellos ríos contaminados, influye considerablemente en la propagación de este fenómeno, por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue realizar la síntesis verde y caracterización de nanopartículas de óxido de cobre como potencial bactericida para el tratamiento de agua del río Chibunga. Para obtener las nanopartículas de óxido de cobre, se empleó extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) como agente reductor y sulfato de cobre como sal precursora; su caracterización se efectuó mediante Espectroscópica Uv-vis, Espectroscopia de infrarrojo (IR) y Microscopía electrónica de barrido (SEM), mientras que su actividad bactericida, se evaluó mediante pruebas de inhibición bacteriana, realizando siembras en agar nutritivo cada hora de exposición de las muestras de agua a las nanopartículas. Para el análisis estadístico se empleó la Correlación de Pearson, con el cual se logró establecer que existe una correlación inversa entre el número de colonias y el tiempo de exposición puesto a que se redujo considerablemente la carga bacteriana desde la primera hora en que las muestras de agua entraron en contacto con las nanopartículas. Además, se determinó que las mejores condiciones para la formación de las nanopartículas fueron empleando una baja concentración de sal precursora (0.05 M) y una temperatura de 80°C, obteniendo así CuONPs de forma ovalada y tamaño entre 23-39 nm según el análisis de microscopía electrónica de barrido, dichas características permitieron que las nanopartículas ejerzan su efecto bactericida. En base a estos resultados se concluye que las CuONPs sí presentan actividad bactericida frente a cepas bacterianas Grampositivas y Gramnegativas resistentes a antibióticos presentes en las muestras de agua de río y por lo tanto son una buena alternativa para la purificación del agua.

Palabras clave: <RESISTENCIA BACTERIANA>, <SINTESIS VERDE>, <NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE (CuONPs)>, <BACTERICIDA>, <BACTERIAS GRANPOSITIVAS>, <BACTERIAS GRAMNEGATIVAS>, <RÍO CHIBUNGA>.

0867-DBRA-UPT-2023



ABSTRACT

The irrational use of antibiotics has caused bacteria to develop antibiotic-resistance mechanisms. The water, especially from those polluted rivers, considerably influences the propagation of this phenomenon, therefore, the objective of this research was to perform the green synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles as a bactericidal potential for the water treatment of the Chibunga River. To obtain the copper oxide nanoparticles, an aqueous extract of *Eucalyptus globulus* (eucalyptus) was used as a reducing agent and copper sulfate as a precursor salt; its characterization was carried out by Uv-vis spectroscopy, infrared (IR) spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM), while its bactericidal activity was evaluated by bacterial inhibition tests, performing seedings in nutritive agar, every hour of exposure of water samples to nanoparticles. For the statistical analysis, the Pearson Correlation was used, and it was possible to establish an inverse correlation between the number of colonies and the exposure time since the bacterial load was considerably reduced from the first hour the water samples came into contact with the nanoparticles. In addition, it was determined that the best conditions for the formation of nanoparticles were using a low concentration of precursor salt (0.05 M) and a temperature of 80 ° C, thus obtaining CuONPs of oval shape and size between 23-39 nm according to the analysis of scanning electron microscopy, these characteristics allowed the nanoparticles to exert their bactericidal effect. Based on these results, it is concluded that CuONPs do have bactericidal activity against Gram-positive and Gram-negative antibiotic-resistant bacterial strains present in river water samples and therefore are a good alternative for water purification.

Keywords: <BACTERIAL RESISTANCE>, <GREEN SYNTHESIS>, <COPPER OXIDE NANOPARTICLES (CuONPs)>, <BACTERICIDE>, <GRAMN-POSITIVE BACTERIA>, <GRAM-NEGATIVE BACTERIA>, <CHIBUNGA RIVER>.



Lic. Edison Renato Ruiz López

C.I. 0603957044

INTRODUCCIÓN

Las bacterias a lo largo de la línea evolutiva, han desarrollado mecanismos específicos para evadir de forma natural el efecto de los antibióticos. Hoy en día este fenómeno es considerado como uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial que se origina por el uso inadecuado e irracional de los antibióticos y sus consecuencias se ve reflejado en el aumento de la tasa de morbilidad y mortalidad de las enfermedades infecciosas (Pérez, 2021, pp. 8-9).

Generalmente, el término de resistencia a los antibióticos se lo relaciona principalmente al ámbito hospitalario; sin embargo, según estudios realizados, se ha demostrado el papel que juegan las fuentes hídricas para la propagación de este fenómeno. El agua, sobre el cual se vierten aguas residuales de origen industrial o doméstico sin previo tratamiento, se vuelve un ambiente propicio para la supervivencia de estos microorganismos y permite la interacción directamente con otros para lograr transferir genes de resistencia o simplemente adquirir nuevos mecanismos de resistencia (Chiriboga, 2019, pp.5-6). Por este motivo, se buscan nuevas alternativas que ayuden a la purificación del agua de manera que quede exenta de microorganismos patógenos y sobre todo de aquellas bacterias resistentes a los antibióticos.

La nanotecnología es una de las alternativas prometedoras para frenar esta problemática, puesto a que permite sintetizar materiales de tamaño nanométrico con propiedades antibacterianas como son las nanopartículas de óxido de cobre, las cuales presentan propiedades ópticas, eléctricas, catalítica, pero principalmente un gran espectro antibacteriano. Varios estudios han demostrado que las nanopartículas de óxido de cobre debido a su tamaño, tienen el paso libre por los poros de la célula bacteriana para que puedan ejercer su efecto supresor del crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que han generado resistencia como es el caso de *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Proteus sp*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyrogenes* (Adewale et al., 2020: pp. 3-7).

La síntesis de CuO NPs tiene un enfoque de síntesis verde cuya metodología ha mostrado ser una técnica de bajo costo, fácil de realizar y rentable con el medio ambiente. Tomando en cuenta la gran diversidad de especies vegetales que se desarrollan en Ecuador, el presente trabajo de investigación pretende realizar la síntesis verde y caracterización de nanopartículas de óxido de cobre con potencial bactericida a partir del extracto obtenido de las hojas de *Eucalipto globulus* (eucalipto) las cuales presentan gran actividad antioxidante y antibacteriana, y además poseen una gran cantidad de metabolitos especialmente compuestos fenólicos que permitirán que el extracto actúe como un agente reductor de la sal precursora de las nanopartículas facilitando así la síntesis verde de las CuONPs (Letchumanan et al., 2021: pp.13-14).

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La era antibiótica inició en el año de 1928, con el descubrimiento de la penicilina y desde entonces, se ha sintetizado una gran cantidad de antibióticos. El uso irracional de estos medicamentos, debido a la mala prescripción e incorrecta administración, ha generado que las bacterias desarrollen mecanismos de resistencia que inhiben la acción antibiótica (Barrantes et al, 2020, pp. 2-5). Este hecho representa una amenaza a nivel mundial, puesto a que infecciones comunes que antes eran fáciles de tratar, hoy en día ya no lo son debido a la poca efectividad que tiene la farmacoterapia sobre estos microorganismos (Venegas et al., 2020: p. 3).

Esta resistencia bacteriana ha sido estudiada desde el punto de vista sanitario, pero las últimas investigaciones han demostrado la influencia que tienen los ecosistemas acuáticos para la propagación de este fenómeno. Los ecosistemas acuáticos, especialmente los ríos que cruzan grandes ciudades, albergan un gran porcentaje de bacterias potencialmente patógenas que están adquiriendo resistencia a los antibióticos. Los recursos hídricos, se encuentran constantemente contaminados por las principales actividades humanas, como la agricultura, la eliminación de medicamentos, desechos hospitalarios y por la eliminación de aguas residuales (Fernández et al., 2019: pp. 2-18).

En Ecuador, el río Chibunga que cruza por la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo, es considerado como uno de los ríos más contaminados del país, pues en este, a lo largo de su recorrido se vierten aguas servidas sin ningún tipo de tratamiento, fertilizantes, detergentes y también se arroja animales muertos (Chela, 2020, p. 1). Por esta característica, el agua del río, es considerado como un reservorio directo de bacterias que han generado cierta resistencia, muchos de ellos causantes de enfermedades infecciosas para el ser humano (Atiaja y Ramírez, 2019: pp. 14-15).

Indudablemente, el uso indiscriminado de medicamentos a nivel global no puede ser controlado totalmente por el hombre; sin embargo, eliminando, mejorando o reduciendo la contaminación del agua se podría disminuir la carga de bacterias resistentes a antibióticos y con ello los efectos de la resistencia bacteriana sobre la salud humana. Por lo tanto, es de gran importancia que se tomen medidas para ayudar a la descontaminación del agua y para mejorar su calidad a nivel microbiológico (Fernández et al., 2019: pp. 2-18).

1.2 Justificación

El agua es un recurso natural y necesario para el desarrollo y mantenimiento de todas las formas de vida en el planeta. La calidad de este recurso hídrico es un factor determinante que incide sobre la salud humana, puesto a que al estar contaminado por algún tipo de sustancia o agente potencialmente patógeno se convierte en un vehículo que favorece la transmisión de una gran cantidad de enfermedades. Como respuesta a esta problemática, ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas que ayuden a la limpieza y mitigación de los contaminantes de este recurso, mediante la eliminación o inhibición del crecimiento bacteriano.

La nanotecnología es una de las alternativas más prometedoras para dar solución a esta problemática. En los últimos años, esta disciplina ha permitido sintetizar nanopartículas con potencial efecto bactericida (Barrantes et al., 2020: pp. 1-3). Por lo ya expuesto, esta investigación tiene la finalidad de sintetizar nanopartículas de óxido de cobre mediante síntesis verde, utilizando como agente reductor el extracto de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y CuSO_4 como sal precursora de las nanopartículas. La caracterización de las nanopartículas se realizará por espectroscopía de UV-vis, espectroscopía de infrarrojo y microscopía electrónica de barrido, y para determinar la actividad antibacteriana se realizarán pruebas de inhibición con las nanopartículas.

El interés sobre las nanopartículas de óxido de cobre, es principalmente por su acción bactericida. El mecanismo de acción se fundamenta en que estas nanopartículas al ser afines a la membrana celular tienden a acumular los cationes de CuO en la pared y membrana celular de la bacteria, causando daño sobre estas partes celulares y posteriormente la muerte de estos microorganismos. También, se ha demostrado que la diferencia de tamaño entre los poros de la membrana y las nanopartículas, permite el fácil acceso de los cationes CuO hacia el citosol en donde se liberan los iones Cu^{2+} que inducen daño oxidativo en el ADN y las mitocondrias, ocasionando la muerte bacteriana (Letchumanan et al., 2021: pp.13-14).

Con el desarrollo de esta investigación, se contribuirá al conocimiento sobre los procesos de biorremediación del agua, mediante una nueva metodología, ya que se pretende probar la acción bactericida que ejercen las nanopartículas de óxido de cobre sobre bacterias resistentes a antibióticos que se encuentran presentes en muestras de agua del río Chibunga.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Realizar la síntesis verde y caracterización de nanopartículas de óxido de cobre como potencial bactericida para el tratamiento de agua del río Chibunga.

1.3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de óxido de cobre empleando extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) como agente reductor y sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) como sal precursora.
- Caracterizar las nanopartículas de óxido de cobre obtenidas por síntesis verde mediante las técnicas de Espectroscopía ultravioleta visible (Uv-vis), Espectroscopía de infrarrojo (IR) y Microscopia electrónica de barrido (SEM).
- Evaluar la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de cobre frente a bacterias presentes en las muestras de agua tomadas del río Chibunga mediante pruebas de inhibición bacteriana

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

La resistencia bacteriana, constituye uno de los problemas de salud más grandes en el mundo, el crecimiento constante de este fenómeno está ligado a la contaminación de fuentes hídricas, por lo que hoy en día, muchos investigadores se han enfocado en el uso de la nanotecnología para obtener nanopartículas que ayuden a la remediación del agua mediante la eliminación de bacterias resistentes a los antibióticos (Ali et al., 2019: pp. 2-9).

En China, en el año 2020, en el Instituto de Tecnología de Beijing, se llevó a cabo la investigación titulada “Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre para la aplicación biomédica y remediación ambiental”. Este trabajo tuvo como objetivo recopilar información sobre los desarrollos de la síntesis y aplicación de las nanopartículas de óxido de cobre. Tras la revisión bibliográfica se determinó la actividad bactericida que presentan las CuONPs sintetizadas a partir del extracto *Eucalyptus globulus* (eucalipto) contra bacterias grampositivas y gramnegativas. Al no haber crecimiento bacteriano en las pruebas de inhibición, determinaron que las nanopartículas inhiben el crecimiento de cepas bacterianas grampositivas (*Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*) y gramnegativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*). Por lo tanto, se concluyó que las nanopartículas de óxido de cobre si presentan un alto potencial bactericida y que su eficacia está relacionada con su capacidad de producir especies reactivas de oxígeno intracelularmente que generan un estrés oxidativo y posteriormente la muerte del microorganismo. De este modo, estas nanopartículas si pueden ser aplicadas tanto en la biomedicina como en la remediación de fuentes hídricas (Adewale et al., 2020: pp. 3-7).

En Malasia, en el año 2021, en la Universidad de Malaya, también se realizó una revisión bibliográfica sobre la síntesis de nanopartículas de óxido de cobre a partir de extractos de diferentes plantas como *Allium sativum* (ajo), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y otras especies que presentan una gran cantidad de metabolitos como fenoles, terpenos y flavonoides que tienen potencial reductor. El objetivo planteado en esta investigación fue describir el mecanismo de acción de las CuO NPs con potencial bactericida. Se estableció que, el mecanismo de inhibición y eliminación bacteriana se da cuando las nanopartículas de óxido de cobre, por su tamaño, logran atravesar fácilmente los poros de la membrana. Una vez incorporados en el citosol, liberan los

iones Cu^{2+} , los cuales son responsables de inducir daño oxidativo en el ADN y las mitocondrias, provocando así la muerte bacteriana (Letchumanan et al., 2021: pp. 2-21).

En México, en el año 2021, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, se realizó el tema de tesis “Síntesis de nanopartículas de cobre y óxido de cobre mediante el uso del extracto de *Larrea tridentata* y su potencial actividad antimicrobiana”. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial efecto antibacteriano de las nanopartículas de óxido de cobre para el control de bacterias patógenas en el tratamiento de aguas. Al realizarse la síntesis verde de nanopartículas y las posteriores pruebas de inhibición, se obtuvo como resultado que, las nanopartículas de CuO de forma esférica aglomerada de 100 nm presentan actividad antibacteriana sobre cepas de *Pseudomonas fluorescens*, mientras que, aquellas nanopartículas de forma esféricas mono dispersa de 10 nm tienen actividad antibacteriana sobre cepas de *Erwinia amylovora*. Sin embargo, también se determinó que las nanopartículas de cobre cuyo tamaño es de 590 nm y exhiben una forma cuasi-esférica aglomerada no presentan actividad antibacteriana al igual que aquellas nanopartículas de forma poliédrica aglomerada cuyo tamaño es de 378 nm. Por lo tanto, una vez más se concluyó que el potencial efecto antimicrobiano de las nanopartículas depende netamente su morfología, puesto a que son estas características las cuales les permitirán el paso libre por los poros de la membrana celular de las bacterias para que puedan producir la muerte celular bacteria (Sánchez, 2021, pp. 75-78).

En otro estudio desarrollado en Argentina, en el año 2019, en la Universidad Nacional de la Plata, se realizó una revisión bibliográfica sobre los diferentes métodos para la síntesis de nanopartículas de óxido de cobre. El trabajo tuvo como objetivo determinar las ventajas que tiene la síntesis de nanopartículas, mediante el uso de extractos de diferentes especies de *Eucalyptus* sobre otros métodos de síntesis. Determinaron que existen métodos físicos, químicos y biológicos. Dentro de los métodos físicos, se encuentra la molienda, la condensación de gas inerte, pirólisis, etc.; mientras que los métodos químicos, son el método sol-gel, micro emulsión, entre otros. Tanto los métodos físicos como los químicos, presentan inconvenientes; uno de ellos es que los métodos físicos son costosos mientras que los métodos químicos involucran el uso y la producción de sustancias contaminantes que representan una amenaza para el medio ambiente, por lo tanto, la aplicación de estos métodos es limitado. Dentro de los métodos biológicos está la síntesis verde, esta técnica se basa en el uso de extractos de plantas como agentes reductores y no involucra el uso de sustancias nocivas tanto para el ser humano como para el medio ambiente. Por lo tanto, con este estudio se concluyó que la síntesis verde es un método de mayor aplicabilidad y menos contaminante que los otros métodos (Salgado et al., 2019: pp. 1-19).

En cuanto se refiere a Ecuador, en nuestro país aún no se han realizado la síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre, sin embargo, si se ha desarrollado la síntesis de nanopartículas de otros metales y óxidos metálicos los cuales has demostrado tener efectos bactericidas.

2.2 Referencias teóricas

2.2.1 Nanotecnología

La nanotecnología es la ciencia que se encarga de la síntesis, caracterización y aplicación de la materia biológica y no biológica cuyo tamaño se encuentra a una escala nanométrica o a una dimensión de átomos y moléculas. Estas nanoestructuras son empleadas en el área ingeniería ambiental, para el desarrollo de materiales nanométricos que ayuden a la purificación del agua; en ingeniería energética para la obtención de dispositivo que ayuden a la generación de energía limpia; En biología permite tener herramientas tecnológicas que ayuden a la investigación y transformación de sistemas biológicos; Mientras que en medicina se aplica para el seguimiento, diagnóstico, prevención y tratamiento de diferentes enfermedades mediante el uso de, nanotubos o nanosensores capaces de ingresar en el organismo (Ruiz y Salazar, 2018: p.2). Se ha señalado que, la nanotecnología, es una herramienta revolucionaria que generará grandes cambios en todas las áreas en las que se aplique para dar soluciones a los diferentes problemas sociales y ambientales, por lo tanto, esta ciencia debe considerarse como una prioridad en el futuro (Gómez et al., 2020: pp. 2-11).

2.2.2 Nanopartículas

La palabra nanopartícula hace referencia a todas aquellas estructuras moleculares cuyas dimensiones están en un rango de 1 a 100 nanómetros, presentan características únicas y diferentes a los materiales de los cuales derivan (Ruiz y Salazar, 2018: p.1). Cada propiedad que presenten dependerá netamente del tamaño, de la forma y sobre todo de su composición química (Aguilar et al., 2021: p. 1). De este modo al exhibir propiedades únicas podrán ser empleadas en campos como la industria alimenticia, la industria química, en el campo de la electrónica y en el campo de remediación ambiental (Letchumanan et al., 2021: p. 1).

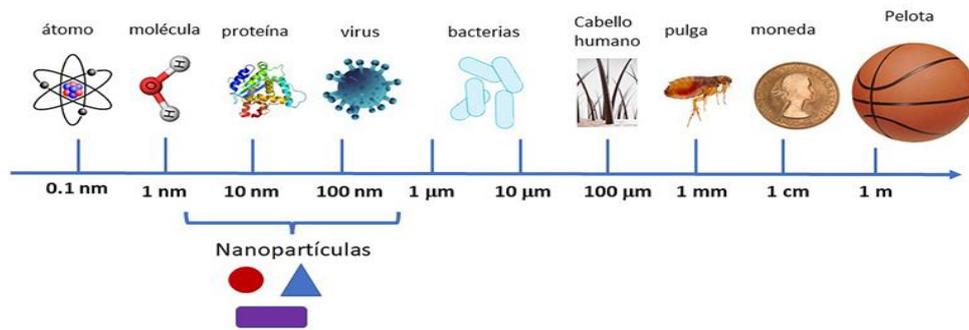


Ilustración 2-1: Escala nanométrica donde se indica el tamaño de las nanopartículas.

Fuente: Aguilar et al., 2021

2.2.2.1 Clasificación de nanopartículas

Las nanopartículas pueden ser clasificadas de acuerdo a la forma, tamaño u origen. A continuación, se presenta la clasificación más general y mayormente empleada.

- **Nanopartículas a base de carbón:** Son aquellas que se encuentran formadas en su gran mayoría por carbono, suelen tomar formas esféricas, huecas, elipsoidales o tubos (Barrantes et al., 2020: pp. 2-8).
- **Nanopartículas inorgánicas:** Dentro de este grupo se encuentran las nanopartículas metálicas, estas son de gran interés científico ya que poseen actividad antimicrobianas, fototérmicas, fotoeléctricas y ópticas. Las principales nanopartículas son las de plata, hierro, cobre y oro, o bien aquellas que se obtienen a base de óxidos de plata, cobre, titanio, hierro y aluminio (Barrantes et al., 2020: pp. 2-8).
- **Nanopartículas orgánicas:** En esta categoría esta los dendrímeros, micelas, liposomas y nanopartículas poliméricas (Barrantes et al., 2020: pp. 2-8).

2.2.3 Nanopartículas de óxido de cobre

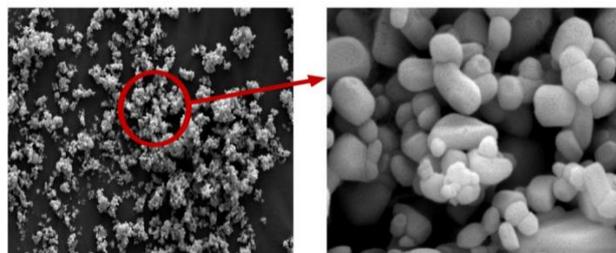


Ilustración 2-2: Nanopartículas de CuO (SEM)

Fuente: Alhalili, 2022

Las nanopartículas de óxido de cobre pertenecen a la clasificación de nanopartículas inorgánicas metálicas.

El óxido de cobre es un elemento que presenta estructura cristalina centrada en las caras, alta conductividad y alta estabilidad. Específicamente el CuO a escala nanométrica, es de gran importancia, puesto a que muestra ser un agente antimicrobiano y antifúngico. Además, exhiben actividad óptica, fototérmica y fotoeléctrica. Así también la síntesis de nanopartículas de CuO son de particular interés en el área de la investigación por su aplicabilidad como agente antibacteriano, por este motivo son consideradas como una alternativa para combatir a aquellas bacterias que han generado resistencia a la acción de los antibióticos (Sánchez, 2021, p. 38).

2.2.3.1 *Nanopartículas de óxido de cobre como bactericida*

El potencial efecto bactericida de las nanopartículas de CuO está relacionado con las propiedades únicas que muestran, cómo es la razón superficie-volumen; la morfología como su forma esférica, y su tamaño que varía entre 1-100 nm. Específicamente, el tamaño nanométrico que presentan estos materiales les permite el paso libre por los poros de la célula bacteriana para que puedan ejercer su efecto (Adwale et al., 2020: pp. 8-10).

Dada estas características, las CuO NPs muestran un efecto supresor del crecimiento de bacterias Gram-negativas causantes de infecciones, como *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Proteus sp*, *Klebsiella sp* y *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* y también muestran un potencial efecto bactericida contra bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pyogenes* (Letchumanan et al., 2021, p. 9)

Por lo tanto, las nanopartículas son de gran interés en el campo de biorremediación ambiental, puesto que pueden ser ideales para la purificación de aquellas aguas que alojan organismos bacterianos que son patógenos para el ser humano y sobre todo resistentes a los antibióticos.

2.2.3.2 *Mecanismo de acción de las nanopartículas de óxido de cobre*

El mecanismo de acción de las NPs de óxido de cobre no ha sido totalmente dilucidado pues se han encontrado diferentes mecanismos de inhibición bacteriana:

- **Daño en pared y membrana celular por interacción electrostática y acumulación de CuO:** La acción se genera por la diferencia de carga entre las nanopartículas de CuO, y la membrana y la pared bacteriana. La pared y membrana celular poseen grupos

electronegativos que atraen a los cationes metálicos positivos de las nanopartículas, dando así una atracción electrostática y, la acumulación de CuO en la superficie de la pared y membrana. Las bacterias Gram negativas presentan una mayor carga negativa por lo tanto la interacción electrostática será más fuerte que en las bacterias Gram positivas (Vázquez et al., 2018: p. 3). Esta interacción produce una alteración en la permeabilidad de la membrana y daños en la pared celular, estas alteraciones en la célula conducen a una lisis y muerte bacteriana (Letchumanan et al., 2021: pp.13-14).

- **Penetración de CuO NPs:** El tamaño de las nanopartículas comparado con los poros de la membrana favorece al ingreso de la nanopartícula sin ningún tipo de interferencia, así como también la ruptura de la membrana celular favorece la entrada de los cationes CuO. Una vez que ingresan los cationes, se da la liberación de iones Cu^{2+} en el citosol. La presencia de estos iones, genera la producción de especies reactivas de oxígeno que genera un daño oxidativo en el ADN y en las mitocondrias, provocando que la bacteria pierda su capacidad para realizar el proceso de división celular (Adwale et al., 2020: p. 8).

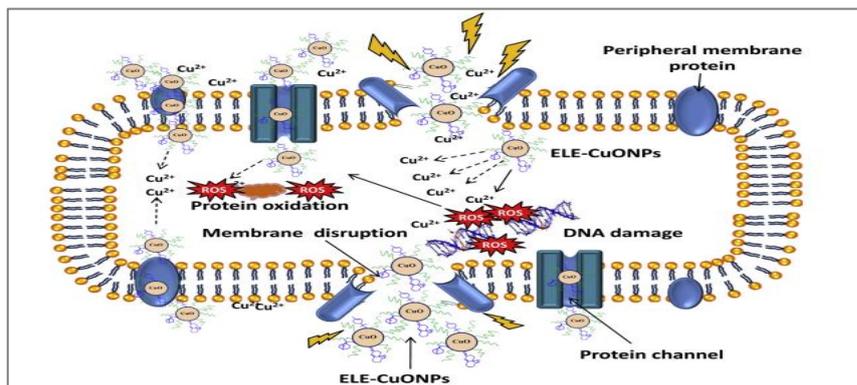


Ilustración 2-3: Mecanismo bacteriano de las nanopartículas de CuO

Fuente: Ali et al., 2019

2.2.4 Síntesis de nanopartículas

Hay diferentes métodos para la síntesis de nanopartículas, sin embargo, el método que se elija dependerá netamente de los objetivos de la investigación y del enfoque aplicativo de las nanopartículas. Uno de los métodos para la síntesis es la aproximación de “arriba hacia abajo” llamados “Top down” y las de “abajo hacia arriba” llamadas “Bottom up” (López y Gutiérrez, 2018: p. 2).

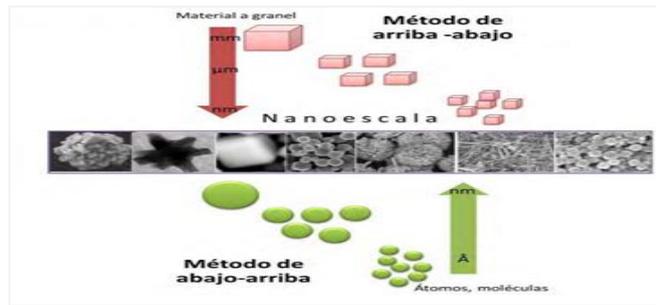


Ilustración 2-4: Métodos de síntesis de nanopartículas

Fuente: Aguilar, 2019

- **Bottom up:** Reduce sólidos grandes hasta que éste llegue a un tamaño nanométrico, dentro de esta categoría se encuentra: Molienda o desgaste mecánico, ablación laser, volatilización de un sólido seguido por la condensación y el método litográfico (López y Gutiérrez, 2018: p. 2).
- **Top down:** Sintetiza nanopartículas a partir de sustancias más pequeñas en el que se aprovechan su estado de agregación y autoorganización. En esta categoría se encuentran los métodos de: precipitación química, deposición química de vapor, procesos Sol-gel, procesos plasma y la síntesis verde (López y Gutiérrez, 2018: p. 2).

2.2.4.1 Síntesis verde

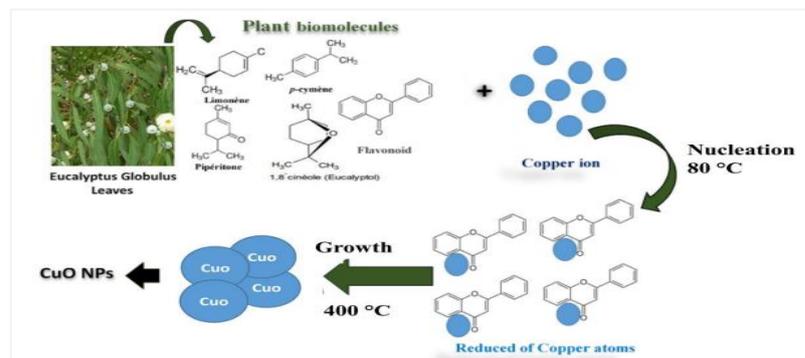


Ilustración 2-5: Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre

Fuente: Alhalili, 2022

La síntesis verde es un método biológico y alternativo que permite sintetizar nanopartículas junto con material metálico como oro, plata, hierro y óxidos metálicos. Abarca la utilización de organismos o recursos naturales (bacterias, levaduras, algas, células humanas y extractos de plantas) que poseen en su estructura una gran diversidad de metabolitos o compuestos químicos capaces de actuar como agentes antioxidantes, estabilizadores y reductores de los iones metálicos (Gómez, 2018, p. 4).

En estos últimos años, se ha establecido que la síntesis verde además de ser un método amigable con el medio ambiente, es fácil de realizar, de bajo costo y no es tóxica, por lo tanto, esta técnica de síntesis puede reemplazar a métodos convencionales tanto físicos o químicos puesto a que los sistemas biológicos al tener la propiedad reductora, pueden reemplazar sin ningún problema a los agentes químicos-físicos reductores (Salahuddin y Husen. 2020: pp. 1-2).

Específicamente la síntesis verde mediada por el uso de extracto de plantas, es más ventajosa que la síntesis química, física o microbiológica, en vista de que es sencilla, no ocupa mucho tiempo, no emplea productos tóxicos, no deja subproductos peligrosos para la salud y el ambiente y, sobre todo, permite obtener nanopartículas a gran escala. Otro hecho importante es que permite obtener nanopartículas más estables debido a que las biomoléculas (fenoles, taninos, flavonoides, etc) recubren las nanopartículas ejerciendo un efecto protector, mejorando así su estabilidad al evita que sufran procesos de oxidación por interacción directamente con el ambiente, de este modo se pueden mantener por más tiempo y sin cambiar sus propiedades (Salahuddin y Husen. 2020: p. 2).

2.2.5 *Eucalypto globulus* (Eucalipto)

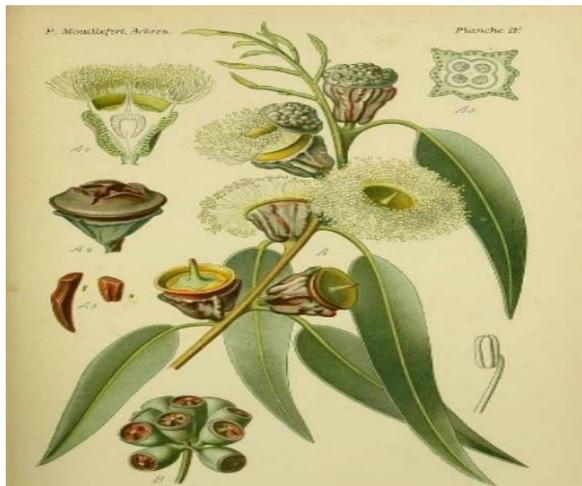


Ilustración 2-6: *Eucalyptus globulus* (Eucalipto)

Fuente: Mauillefert, 2022

Eucalyptus globulus es originario del sudeste de Australia y Tasmania, pertenece a la familia *Myrtaceae* y al género *Eucalyptus*. En Ecuador, la especie fue introducida en el año de 1869 y actualmente se encuentra formando bosques y bosquetes, principalmente en la cordillera de los Andes de la sierra ecuatoriana (Guaraca, 2022, pp. 53-58). Los principales metabolitos secundarios que posee esta planta son: alcaloides, fenoles, taninos, triterpenos y flavonoides, especialmente la presencia de compuestos fenólicos mayoritariamente en las hojas, además de terpenos, han sido asociadas a la actividad antioxidante, misma que está asociada al efecto antifúngico y

antimicrobiano de los extractos de esta planta. Los extractos etanólicos que se obtienen a partir de las diferentes partes de la planta como raíces, ramas, hojas y cáliz presenta en mayor proporción quinonas, lactonas y cumarinas y, en menor cantidad, triterpenos y esteroides (Alhalili, 2022, p. 7).

Los extractos obtenidos de esta especie vegetal son los más estudiados para llevar a cabo la síntesis verde de nanopartículas, posiblemente debido que existen alrededor de 20 millones de hectáreas de plantaciones de eucalipto que se encuentran distribuidas en todo el mundo, además de poseer elevada cantidad de biomoléculas reductoras y antioxidantes que protegen a las nanopartículas dándoles más estabilidad y mayor poder antibacteriano (Salgado et al., 2019: p. 4).

2.2.6 Factores que afectan la síntesis verde

Los parámetros que juegan un papel crucial a la hora de determinar las características y propiedades de las nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas a partir de una síntesis verde son: la naturaleza de la planta, la concentración del extracto y de la sal precursora de la nanopartícula metálica, el pH, el tiempo y la temperatura de reacción. Por lo tanto, es importante controlar todos estos factores para obtener nanopartículas de características únicas de forma rápida y sobre todo que si tengan aplicaciones prometedoras en los diferentes campos de la investigación (Salahuddin y Husen. 2020: p. 2).

2.2.6.1 Temperatura

La temperatura es un factor determinante de la morfología de las nanopartículas, cuando esta aumenta también se aumenta la velocidad de reacción haciendo que se consuman los iones metálicos, se formen los núcleos de las nanopartículas y se obtengan nanopartículas de menor tamaño. Por lo general la síntesis verde se lleva a cabo a una temperatura ambiente o menores a 100 °C para que las biomoléculas y los componentes activos del extracto vegetal tiendan a degradarse con mayor facilidad a altas temperaturas (Letchumanan et al., 2021: p. 7).

2.2.6.2 Tiempo

El tiempo es otro factor que determina la morfología de las nanopartículas (NPs), esto se debe a que las NPs según el periodo de almacenamiento tienden a acumularse, reducirse o aumentar su tamaño, así también determina la vida útil y por lo tanto el potencial que ejercen. Sin embargo, este factor no influye tanto sobre el tamaño y forma de las NP puesto a que los factores como la

concentración del extracto vegetal, la sal precursora y la temperatura influyen mayormente sobre la morfología que presentan las nanopartículas (Letchumanan et al., 2021: p. 8).

2.2.6.3 Concentración del extracto vegetal

La especie de la planta es un determinante crucial en la caracterización de las nanopartículas, debido a que la gran diversidad de biomoléculas presentes en el extracto actuara como agentes reductores y protectores de las NPs. En consecuencia, tanto la cantidad del extracto y de las biomoléculas puede afectar la síntesis de las nanopartículas debido a la disponibilidad de las moléculas necesarias para que se lleve a cabo la reducción de iones metálicos y la estabilidad de las mismas (Letchumanan et al., 2021: p. 8)

2.2.6.4 pH

Según investigaciones realizadas se ha reportado que el efecto de pH del medio determina el aumento de la actividad reductora de los grupos funcionales en los extractos vegetales, de modo que esto influye directamente sobre el tamaño, la forma, el proceso de reducción y la estabilidad de las nanopartículas (Salgado et al., 2019: p. 4).

Cuando la biosíntesis se produce a pH mayores a 8 se obtiene nanopartículas de menor tamaño de 20 a 32 nm, a pH mayor a 10 se obtienen nanopartículas sueltas y aglomeradas cuyo tamaño es aproximadamente de 28,2 nm, mientras que la síntesis en condiciones acidad a pH menores a 7 se obtiene nanopartículas más grandes cuyo tamaño podría alcanzar los 153 nm y a pH neutro se obtienen nanopartículas de CuO mayormente aglomeradas y de tamaño es de 66.3 nm. Por lo tanto, se ha llegado a concluir que los pH alcalinos entre 7 y 9 son pH óptimo para la reacción de síntesis (Letchumanan et al., 2021: p. 9).

2.2.7 Métodos de caracterización de nanopartículas de cobre

Existen varias técnicas fisicoquímicas para realizar la caracterización y estudio de las propiedades de las nanopartículas de óxido de cobre entre las cuales tenemos:

- Espectroscopía ultravioleta visible (*UV-Vis*)
- Espectroscopía de infrarrojo
- Microscopía de barrido electrónico

2.2.7.1 Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis)

Es una técnica instrumental que se basa en la absorción de la radiación electromagnética del analito en los espectros UV-vis, cuando la radiación en esta zona incide con el compuesto analizado, será absorbida por el mismo y la molécula pasará a un estado excitado de máxima energía. La excitación de los electrones que se logra al aplicar la radiación UV, permite obtener resultados expresados como picos de absorción a una determinada longitud de onda, donde cada pico formado determina un grupo funcional de la molécula y por lo tanto esto ayuda a caracterización las muestras analizadas (Colcha, 2021, p.23).

2.2.7.2 Espectroscopia de infrarrojo

Permite la caracterización de varios tipos de materiales realizando un análisis cualitativo y otro cuantitativo, de modo que al permitir identificar los grupos funcionales de las muestras analizadas se puede conocer a la sustancia con la que se está trabajando. Esta técnica analítica se encarga de estudiar y analiza la absorción y la emisión de energía radiante que surge de la interacción entre la radiación electromagnética y el material analizado. Dado a que las moléculas tienen los medios suficientes para poder moverse y generar ciertas vibraciones a diferentes frecuencias, serán visible el movimiento vibracional de rotación de cada partícula (Álvares, 2021, p. 39).

2.2.7.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Técnica instrumental que ayuda a determinar la morfología y la composición de las nanopartículas a partir de un detector de rayos X. En el microscopio electrónico emite imágenes en 3D mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales que son producto de la interacción entre el haz de electrones de alta energía con la superficie de la nanopartícula. Dichas interacciones resultantes a su vez son las que permiten obtener información específica sobre el tamaño a partir de 10 nm, la estructura cristalográfica y la composición química a fin de obtener una caracterización con un excelente detalle de las nanopartículas analizadas (Yanchapanta, 2022, p. 36).

2.2.8 Agua

El agua es un recurso esencial para el mantenimiento y desarrollo de todas las formas de vida. Se estima que el planeta contiene alrededor de 1 400 millones de Km^3 de agua, de los cuales, el 2.5% corresponde a agua dulce que se encuentra distribuido en lagos, glaciales, ríos y acuíferos. Esta

agua dulce es usada por el ser humano para su desarrollo, consumo doméstico y para realizar actividades agrícolas, ganaderas e industriales (Atiaja y Ramírez, 2019: p. 17).

2.2.8.1 Demanda y uso del agua

La demanda y uso de agua a nivel global incrementa aproximadamente en un 1% cada año, su incremento se debe principalmente al crecimiento poblacional, el desarrollo socioeconómico de países en vía de desarrollo y a las nuevas formas de consumo (Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos, 2018: p. 2). Las principales actividades consumidoras de este líquido vital son la ganadería, la agricultura y la acuicultura, las cuales representan el 69% de extracción de agua, seguido de las actividades industriales con el 19% y las actividades domésticas con el 12% (Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos, 2019: p. 14).

Para el año 2050 se espera que la demanda de agua siga creciendo entre un 20 y 30% por encima del nivel actual de consumo (Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos, 2019: p. 2). Aunque estas proyecciones pueden variar con el tiempo, el análisis realizado actualmente sugiere que el crecimiento acelerado de la demanda y uso de agua se atribuirá al aumento de la tasa de natalidad, al aumento de las actividades del sector industrial y, que es probable que el uso de agua en estas actividades disminuya en comparación con las otras actividades, sin embargo, la agricultura será el sector con un mayor porcentaje de consumo (Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos, 2018: p. 2).

2.2.8.2 Calidad del agua

La calidad del agua es considerada, como un factor determinante que incide directamente sobre la salud y el desarrollo de los seres vivos, según las condiciones en las que se encuentre, esta podría o no contribuir a la transmisión de contaminantes o agentes patógenos causantes de enfermedades para el ser humano (Atiaja y Ramírez, 2019: p. 15). La calidad del agua no se juzga por la pureza del recurso hídrico, sino más bien por ser idónea para el uso en las diferentes actividades del hombre, por lo tanto, el término “calidad del agua” se refiere a aquellas características físicas, químicas y biológicas que presenta este fluido, de tal forma que reúna todos los criterios de aceptabilidad para su empleo en las distintas actividades humanas (Parrales, 2020, p. 25).

2.2.9 Agua de río

El río juega un papel importante en el ciclo global del agua; al igual que los acuíferos subterráneos precipita y se escurre hacia el mar permitiendo regresar la humedad a la tierra a través de la atmósfera. Este ciclo del agua renueva de forma constante una cantidad considerable de agua en los continentes, por ende, permite el sustento y desarrollo de la vida. Durante toda la evolución de la vida humana, los ríos han sido considerados como una fuente de agua para realizar actividades domésticas, industriales, agrícolas y generar energía eléctrica especialmente en aquellos lugares donde no cuentan con un sistema de agua potable o sistema eléctrico (Cadme., et al, 2018: p. 2).

El agua de río mantiene una variación constante de su calidad debido a que durante todo su recorrido arrastra gran cantidad de materia de distinto origen y tamaño. Se encuentra íntimamente relacionado con todos los ecosistemas que lo rodean, en sus orillas se forma ambientes húmedos que permite mantener su cauce y por ende ayuda a que haya una correcta circulación para mantener la vida animal y vegetal. Este líquido vital en los últimos años se ha visto bajo presión constante, debido a la disminución de la disponibilidad de este recurso hídrico y el aumento de contaminación lo cual conlleva a la disminución de su calidad (Cadme., et al, 2018: p. 2).

2.2.9.1 Río Chibunga

La microcuenca del Río Chibunga nace del volcán Chimborazo, desde este punto bajo el nombre del Río Chimborazo, atraviesa los páramos de El Arenal hasta llegar a las comunidades agrícolas de San Juan, Chimborazo, Shobol Llinllin y otras, en estas zonas el agua se mantiene en óptimas condiciones de calidad. Más adelante a 3.238 msnm específicamente en la zona de San Juan, se une al río Cajabamba, el cual según investigaciones realizadas presenta una gran cantidad de desechos por recoger aguas residuales de la comunidad de su mismo nombre Cajabamba y adopta el nombre de Río Chibunga. Desde aquel punto, su cauce se extiende a 38 Km y se convierte en el primordial afluente del Río Chambo, mismo que es confluente del Río Pastaza. El cauce del Río Chibunga continua por la ciudad de Riobamba y la parroquia de San Luis, a partir de este punto a lo largo de todo su recorrido, recibe una gran cantidad de desechos contaminantes de diferentes orígenes debido a que su agua se emplea para la agricultura, ganadería, actividades industriales y domésticas, a más de ello también se arroja basura y animales muertos lo cual genera que se deteriore su calidad y se convierta en uno de los ríos más contaminados del Ecuador (Salgado, 2018, p. 24).

2.2.10 Principales contaminantes del agua

La contaminación de los recursos hídricos generalmente se produce cuando se incorpora en ellos diferentes tipos de materiales o sustancias ya sea de origen físico, químico o biológico. De este modo el agua pierde su calidad y se vuelve inapropiada para su consumo. Entre los principales contaminantes se encuentra los agentes patógenos, los desechos orgánicos, las sustancias químicas inorgánicas y los contaminantes emergentes (Grijalva et al., 2020: pp. 88-89).

2.2.10.1 Agentes patógenos

Son aquellos microorganismos como bacterias, virus y parásitos que, al estar presentes en el agua, favorecen la transmisión de enfermedades como gastroenteritis, hepatitis A, cólera, fiebre tifoidea, disentería y poliomielitis. Estos agentes patógenos derivan de desechos orgánicos o llegan al agua a través de los excrementos que generan los animales o humanos infectados y que son depositados directamente sobre ríos, lagos o reservorios de agua (Álvarez, 2021: pp. 17-18.).

2.2.10.2 Desechos orgánicos

Son todos aquellos residuos producidos por el hombre y los animales. Incluyen el material fecal y otros desechos que pueden ser biodegradados por bacterias aeróbicas mediante procesos biológicos que requieren el consumo de oxígeno. Cuando hay una gran cantidad de restos orgánicos aumenta la proliferación de colonias bacterianas ocasionando el agotamiento de la demanda de oxígeno del medio, por esta razón, al no haber oxígeno, será imposible la supervivencia de animales y plantas acuáticas (Álvarez, 2021, pp. 17-18).

2.2.10.3 Sustancias químicas orgánicas

Lo conforman las moléculas orgánicas sintetizadas por el hombre (petróleo, plásticos, combustible, plaguicidas, detergentes). Todos estos compuestos una vez presentes en el agua son difíciles de retirar, tienden a acumularse con el pasar del tiempo y al encontrarse en grandes cantidades, imposibilitan la supervivencia de la vida acuática (Álvarez, 2021, pp. 17-18.).

2.2.10.4 Sustancias químicas inorgánicas

Este grupo de contaminantes lo conforma los ácidos, las sales y los metales tóxicos como el plomo, el mercurio y el níquel. Estas sustancias al encontrarse en cantidades elevadas en el agua

de consumo, terminan ocasionando problemas en la salud de las personas y de los animales (Álvarez, 2021: pp. 17-18).

2.2.10.5 Nutrientes inorgánicos

Lo conforman los nitratos y fosfatos, generalmente estas dos sustancias son fundamentales para el desarrollo de las plantas, sin embargo, cuando se encuentra una alta demanda de estos nutrientes se genera el crecimiento desmedido de algas y organismos responsables de la contaminación del agua. Cuando estas plantas acuáticas mueren los microorganismos proceden a degradarlos agotando la mayor cantidad de oxígeno, dando como resultado aguas muertas de mal olor y sin vida (Álvarez, 2021, pp. 17-18).

2.2.10.6 Contaminantes emergentes

Son aquellos compuestos de distinta naturaleza química que suelen pasar inadvertidos por incorporarse en el agua de forma lenta y continua a partir de aguas residuales, efluentes hospitalarios y actividades agrícolas. Dentro de este grupo de contaminantes, se encuentran principalmente los componentes de consumo excesivo y creciente que presentan diferentes estructura como son: los fármacos y productos farmaceuticos, sustancias que alteran el sistema hormonal del ser humano, aditivos alimenticios, sustancias tensoactivas y productos de cuidado personal (Madera y Viloría, 2020: p. 15).

Estos compuestos no suelen degradarse ni de forma parcial ni completa durante el proceso de tratamiento de aguas, esto se debe a que son moléculas complejas y de gran tamaño (antibióticos) y las plantas de tratamiento han sido diseñadas para eliminar moléculas de baja complejidad química (Madera y Viloría, 2020: p. 15).

2.2.11 Aguas residuales

Las aguas residuales son aquellas que resultan después de haber sido utilizada en las actividades del ser humano. Contienen una gran cantidad de contaminantes tanto sólidos como líquidos como grasas, detergentes, materia orgánica, residuos industriales, sustancias químicas como herbicidas y plaguicidas, y en ocasiones sustancias tóxicas. Aquellas aguas que no han recibido ningún tipo de tratamiento se acumulan generando malos olores y terminan siendo reservorio de microorganismos, especialmente aquellos que son patógenos para el ser humano (Arciniega y Salazar, 2021: p. 28).

2.2.11.1 Clasificación de las aguas residuales según su procedencia

Las aguas residuales de acuerdo a su origen o procedencia se clasifican en aguas residuales domésticas, aguas residuales blancas, aguas residuales industriales y aguas residuales agrícolas.

- **Aguas residuales domésticas o urbanas:** Son aquellas que proceden del aseo de las personas y animales, de la cocina, la limpieza de las viviendas y sobre todo de sanitarios (Ramis, 2019, pp. 14-20).

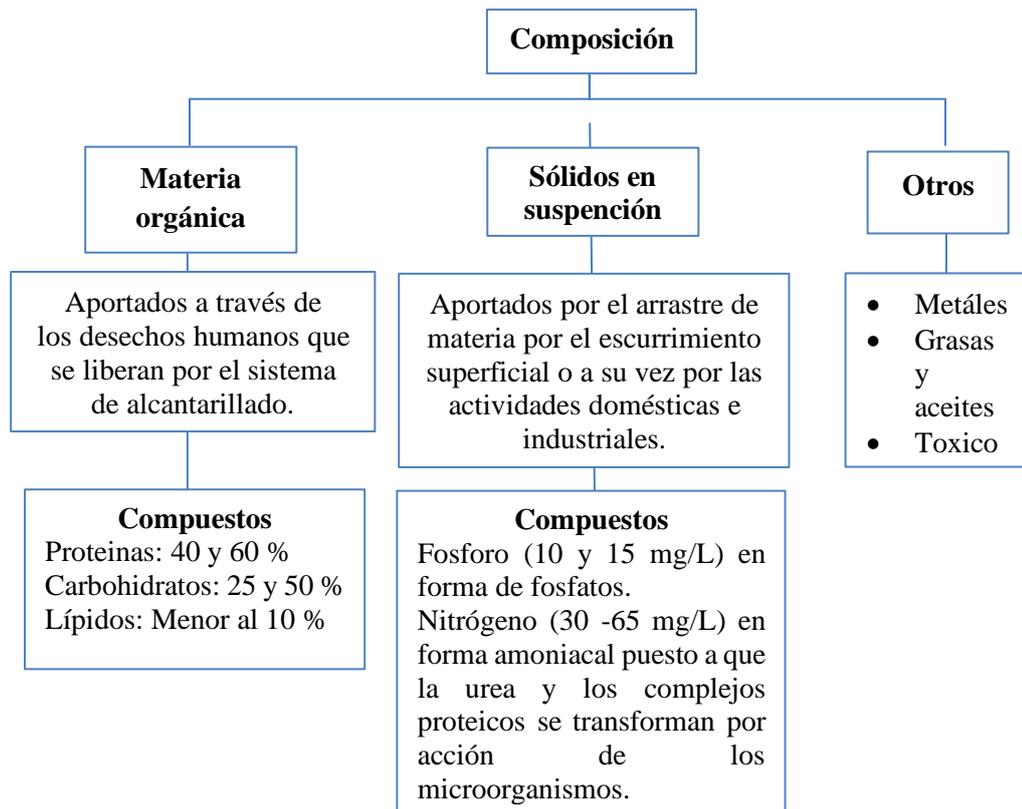


Ilustración 2-7: Composición química del agua residual de tipo urbana

Fuente: Ramis, 2019

Realizado por: Villagomez J., 2023

- **Aguas blancas:** Pueden proceder de forma natural a través de la atmósfera, es decir, derivan de la lluvia, la nieve o el hielo, o también a partir del riego y la limpieza de las ciudades (Yanchapanta, 2022, p. 24).
- **Aguas residuales industriales:** Proceden de actividades realizadas en industrias o fábricas, por lo que su composición es muy variable. Contienen aceites, medicamentos, ácidos, productos y subproductos de origen químico, vegetal, animal y/o mineral (Arciniega y Salazar, 2021: p. 29).
- **Aguas residuales agrícolas:** como su nombre mismo lo indica son aquellas que derivan de las actividades agrícolas. La contaminación del agua se debe principalmente a que las

sustancias como pesticidas, plaguicidas y abonos naturales o químicos son arrastradas a través de la lluvia o de las aguas de riego hacia los ríos o aguas subterráneas generando así un proceso de contaminación (Lizana, 2018, p. 66).

2.2.11.2 Tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de aguas residuales es un proceso complejo y requiere de un gran número de procedimientos para su depuración. Hay cuatro etapas o niveles para el tratamiento y son: pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario (Arciniega y Salazar, 2021: p. 29).

A continuación, se describe cada una de las etapas:

- **Pretratamiento:** Tiene como objetivo retener los sólidos finos cuya densidad es mayor a la del agua y los sólidos flotantes como grasas y aceites. Además de ello en esta etapa también se remueve todos los sólidos gruesos y de gran tamaño lo cual evita que se genere problemas por el paso de estos materiales en las siguientes fases (Ramis, 2019, p. 37).
- **Tratamiento primario:** Se consigue eliminar el 30% de la demanda bioquímica de oxígeno y entre el 60 y 70% de la materia en suspensión, excluyendo toda la materia coloidal y las sustancias que se encuentran disueltas mediante procesos físicos como frotación, sedimentación y coagulación (Arciniega y Salazar, 2021: p. 40).
- **Tratamiento secundario:** Se utiliza un tanque de aireación para eliminar cerca del 90% de la materia orgánica coloidal o disuelta que no han sido removidos en el tratamiento primario. Este tanque de aireación aporta un gran porcentaje de oxígeno al agua el cual sirve para acelerar el crecimiento de microorganismos que son los encargados del consumo y degradación de la materia orgánica (Tratamiento de aguas residuales, 2019: pp. 3-4).
- **Tratamiento terciario:** Se aplica para remover compuestos orgánicos, nutrientes (fosforo y nitrógeno), minerales y metales con el fin de evitar que el agua residual ya tratada, genere el crecimiento de algas en los cuerpos de agua de baja circulación o en los lagos (Tratamiento de aguas residuales, 2019: pp. 3-4).
- **Desinfección:** Es la última etapa del tratamiento y generalmente se suele aplicar el proceso de cloración para eliminar los microorganismos causantes de enfermedades (Arciniega y Salazar, 2021: p. 42).

2.2.12 Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares y procariontes, poseen una estructura celular sencilla y se reproducen mediante fisión binaria. Son los organismos evolutivamente más antiguos

y los más abundantes en el planeta. Se encuentran distribuidos en el agua, en el suelo, en la atmósfera y hasta en el ser humano por lo que pueden ser patógenos o comensales (Macias et al., 2019: p. 13).

Su tamaño oscila entre 0.5 y 5 μm , la gran mayoría poseen una pared celular compuesta por peptidoglicanos, sus órganos de locomoción son cilios o flagelos, no presentan mitocondria ni cloroplastos y carece de núcleo diferenciado por lo que su material genético se encuentra en una zona llamada nucleoide (Macias et al., 2019: pp. 13-21).

2.2.12.1 Morfología

La morfología de las bacterias depende netamente de la pared celular, pues es esta estructura la que les proporciona cierta rigidez o elasticidad a las células. Básicamente las bacterias vistas al microscopio pueden presentar una forma esférica (cocos), una forma cilíndrica (bacilos) o una forma helicoidal (espirilos) (Macias et al., 2019: pp. 42-43).

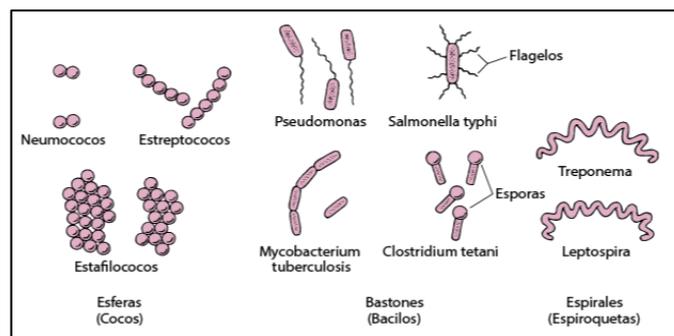


Ilustración 2-8: Formas y agrupación de las bacterias

Fuente: Bush, 2021

A continuación, se describe a cada morfología bacteriana:

- **Cocos**

Células esféricas. Suelen agruparse adoptando distintas formas según su tendencia a mantenerse unidas luego de la división celular o según los planos del espacio en los que se genere el mismo proceso. De acuerdo a esto, los cocos se agrupan en diplococos (pares) y su división celular se lleva a cabo en un solo plano; Estreptococos cuando forman cadenas compuestas desde 5 hasta 100 elementos semejante a un rosario y su división se da de forma sucesiva en un mismo plano; Tetracocos cuando tienden a organizarse en grupos pequeños conformados cada uno por 4 elementos y la división se realiza en dos planos; Sarcinas, cuando adoptan formas de cubos compuestas por 8 o más elementos y cuya división celular se produce en tres planos del espacio; finalmente se denominan estafilococos cuando las células se agrupan en forma de racimos de uva presentando una división celular en tres planos del espacio (Acosta et al., 2018: pp. 23-24).

- **Bacilos**

Células que exhiben forma cilíndrica o de bastón. Su manera de agrupación es diferente a los de los cocos, pues los bacilos muy raras veces se agrupan, sin embargo, algunas especies presentan una tendencia de orden que depende netamente de las etapas de su desarrollo o de las condiciones del medio de cultivo, por tal motivo los bacilos forman agrupaciones al azar (Acosta et al., 2018: p. 24).

Los bacilos agrupados en cadenas se denominan estreptobacilos y cuando se encuentran unidos uno al lado de otro se denomina agrupación empalizada. En otras ocasiones adoptan formas similares a las letras L, T, V, X y Y (Macias et al., 2019: pp. 68-69).

- **Helicoidal**

Son aquellas células que no muestran un orden específico puesto a que por lo general se encuentran aisladas presentando una o varias curvaturas. Entre las formas que adoptan estas células están:

- a) **Vibriones:** Bacterias que presentan una sola curvatura adoptando una forma semejante a una coma gramatical (Macias et al., 2019: p. 83).
- b) **Espirilos:** Bacterias que presentan forma helicoidal y cuyo movimiento es a través de sus flagelos externos los cuales les permiten dar varias vueltas en torno a de su propio eje (Acosta et al., 2018: p. 24).
- c) **Espiroquetas:** Células de forma alargada con muchas curvaturas similar a un tirabuzón (Acosta et al., 2018: p. 24).

2.2.13 Medios de cultivo

Un medio de cultivo es aquel medio que brinda todas las condiciones físicas y químicas óptimas para el desarrollo, metabolismo y reproducción de un microorganismo. Por lo general, en los laboratorios de microbiología se emplean placas de Petri o tubos sobre los cuales se coloca agar para evidenciar zonas de crecimiento de colonias bacterianas que se originan a partir de una célula original (Caycedo et al., 2021: pp. 2-5).

Hay que considerar que no todos los microorganismos pueden ser cultivables, sin embargo, en la mayoría de los casos especialmente si se habla de cultivos bacteriológicos y cultivos de hongos si pueden ser cultivados, debido a que exhiben una gran diversidad metabólica (Caycedo et al., 2021: pp. 2-5).

2.2.13.1 Tipos de los medios de cultivo según su utilidad

Actualmente existe una gran cantidad de medios de cultivo que se han desarrollado con base a la utilidad o propósito para la cual estén destinados, unos ayudan a aislar un determinado tipo de agente bacteriano, mientras que otros facilitar la identificación de algún tipo microorganismo o simplemente ayudan a mantener a un agente microbiano que sea de interés investigativo. De acuerdo a su uso los medios de cultivo se clasifican en: medios selectivos, medios nutritivos, medios de enriquecimiento y medios diferenciales (Caycedo et al., 2021: p. 21).

- **Nutritivos:** Son aquellos medios que contienen gran cantidad de nutrientes simples y básicos que permiten el desarrollo óptimo de la mayoría de bacterias y hongos cuyos requerimientos nutricionales son escasos. Por ejemplo, el agar Nutritivo, este es un medio empleado para realizar el análisis o control microbiológico de alimentos, muestras de agua de cualquier tipo y materiales que son de importancia sanitaria (Caycedo et al., 2021: p. 21).



Ilustración 2-9: Crecimiento de todo tipo de colonias bacterianas en agar nutritivo

Fuente: Caycedo et al., 2021

- **De enriquecimiento:** Son aquellos medios que contienen gran cantidad de componentes que son diferentes a los básicos para ayudar al desarrollo de aquellos microorganismos que son exigentes y que se les dificulta desarrollarse en medios generales. Por ejemplo, el agar chocolate, este es un medio que contiene glóbulos rojos lisados que proveen nutrientes como la hemoglobina, hemina y factor V que son esenciales para el desarrollo de bacterias exigentes como *Neisseria gonorrhoeae* (Caycedo et al., 2021: p. 20).
- **Selectivos:** Medios que están formados por ciertas sustancias que facilitan el crecimiento de un determinado tipo de bacteria e inhibe el crecimiento de otras. Por ejemplo, el agar MacConkey que contiene cristal violeta para el óptimo desarrollo de bacterias Gram negativas e impide la proliferación de bacterianas Gram positivas y de hongos (Caycedo et al., 2021: p. 23).
- **Diferenciales:** Medios que tienen incorporado sustancias que pone de manifiesto alguna característica metabólica de la bacteria que esté sujeta a investigación. El agar MacConkey es un medio que se empleado para la identificación de enterobacterias, contiene lactosa y un

indicado acido-base (rojo neutro). La bacteria que sean fermentadora de lactosa formara colonias de color rosa intenso, mientras que aquellas bacterias que no son fermentadoras formaran colonias incoloras por ejemplo *Salmonella* (Caycedo et al., 2021: p. 30).

2.2.14 Siembra

El proceso de siembra permite proveer al microorganismo un ambiente artificial adecuado para que aquel agente pueda realizar sin problema su metabolismos, crecimiento y reproducción, sin embargo, hay que considerar que la técnica que se emplee dependerá netamente de las necesidades de los microorganismos. Uno de los parámetros que se deberá cuidar a la hora de realizar siembras microbiológicas es la temperatura de incubación, pese a que la mayoría de los microorganismos se desarrollan a temperaturas de 35 °C existen otros como *Enterococcus faecalis* que crecen a altas temperaturas de 60°C y *Escherichia coli* a 44 °C, mientras que otros como *Listeria* que se desarrollan en bajas temperaturas de aproximadamente 4°C (Serrano y Gutiérrez, 2018: pp. 49-55).

2.2.14.1 Técnicas de siembra de cultivos puros

Las tecnica de siembra en placas se emplean para transferir los microorganismos de un ambiente a otro con el fin de ayudar a su crecimiento y desarrollo. La eleccion de la tecnica de siembra dependera de los resultados que se quiere obtener en este proceso, generalmente las tecnicas de siembra se emplean para aislar colonias bacterianas puras que posteriormente puedan ser identificadas (Serrano y Gutiérrez, 2018: pp. 59-60). Las tecnicas de siembra en placa son:

- **Siembra por estrías:** Es un metodo sencillo y rápido de agotamiento continuo del inculo que se realiza sobre el medio de cultivo. Conforme a lo que se realicen las estrías, las bacterias se pasaran de un número elevado a uno muy reducido encontrándose distribuidas de forma individual a lo largo de la superficie del agar, de tal forma que cada una formaran colonias bacterianas puras (Serrano y Gutiérrez, 2018: pp. 59-60).
- **Aislamiento en placa por diluciones sucesivas:** La técnica consiste en realizar diluciones sucesivas de un inculo para luego realizar siembras por extensión en placa de una cantidad conocida de la muestra en una serie paralela de placas petri. De este modo, las diluciones al ser distribuidas en la superficie de la placa, daran paso a la formacion de colonias bacterianas separadas que podran ser facilmente contadas (Serrano y Gutiérrez, 2018: p. 69).

2.2.15 Tinción Gram

La técnica de Tinción Gram permite clasificar a las bacterias en dos grupos taxonómicos: las bacterias Gram positivas y las Gram negativas dependiendo de su capacidad para retener o no el colorante cristal violeta empleado en la tinción. La distinta coloración que presentan estos dos grupos bacterianos, se debe a la composición química de su pared celular. Las bacterias Gram Positivas poseen una capa gruesa de mureína o peptidoglicano conformando su pared celular por lo que se tiñen de color azul o violeta mientras que las bacterias Gram negativas por poseer una pared celular conformada por capa fina de peptidoglicano y una membrana externa formada de lipopolisacáridos, lípidos y lipoproteínas se tiñen de coloración rosa o rojiza (González et al, 2020: pp. 83-85).

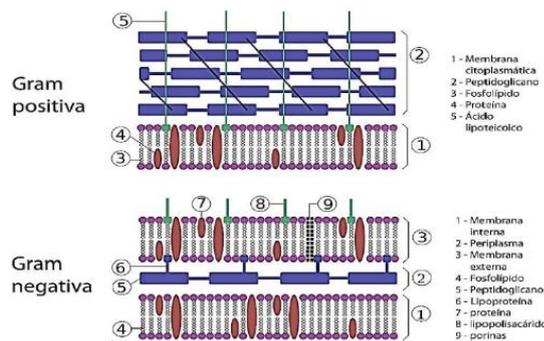


Ilustración 2-10: Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas

Fuente: González et al, 2020

Par llevar a cabo la tinción Gram se necesita 4 soluciones: un tinte básico (Cristal violeta), un mordiente (Lugol), un decolorante (alcohol cetona) y un segundo tinte de contraste (safranina). Tras la adición del primer colorante se genera una decoloración con alcohol cetona el cual arrastrara al colorante básico solo en aquellas bacterias Gram Negativas, mientras que, en aquellas bacterias Gram Positivas el tinte queda retenido por lo cual permanecerán teñidas azules. En el caso de las bacterias Gram Negativas, estas se tiñen después tras la adición del último colorante (González et al, 2020: pp. 83-85).

2.2.16 Bacterias más prevalentes en fuentes de agua

Las fuentes de agua albergan bacterias naturales y no patogénicas que actúan como una barrera biológica que evita el asentamiento de microorganismos patógenos en estos ecosistemas, generalmente en los lagos o ríos se encuentran adheridas a rocas formando biopelículas, las bacterias más prevalentes en el agua son bacterias Gram negativas, en su mayoría, pertenecen al género: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter* (Balboa y Vergara, 2021: p. 4).

La presencia de enterobacterias y bacterias anaerobias facultativas del género *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, que habitan en el intestino de humanos y animales, está asociada a la contaminación de agua por materia fecal por lo que son de importancia sanitaria, mientras que el género *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, y *Citrobacter* se encuentran en grandes cantidades en fuentes de agua, cultivos y suelos, por lo que no siempre están asociados a la contaminación fecal y no representan necesariamente un riesgo para la salud humana. Así también el género *Legionella* no siempre está asociada a una contaminación fecal puesto a que esta bacteria tiene como habitat natural el agua dulce, pero suele multiplicarse en las redes de distribución de agua representando así un riesgo para la salud (Pinzón, 2021, p. 14-34).

En el caso de *Micrococcus*, *Acromobacter*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Streptococcus lacti*, *Flavobacterium*, *Mycocacterium*, *Nocardia* y *Shippomonas* son las bacterias más comunes empleados en el proceso de biorremediación del agua puesto a que tienen la capacidad de catalizar las reacciones bioquímicas de los agentes contaminantes de tal manera que facilitan la degradación y remoción de sustancias toxicas ayudando de esta manera a la remediación de los recursos hídricos (Balboa y Vergara, 2021: p. 4).

2.2.17 Bacterias bioindicadores de la calidad del agua

Las bacterias indicadoras son elementos esenciales que permiten efectuar un control de contaminación por la descarga de material fecal o a determinar la calidad e inocuidad del agua debido a que su presencia es un indicativo de que existe alguna alteración en la composición del agua (Marín, 2019, p. 126).

Para que las bacterias sean consideradas como indicadoras de contaminación debe reunir las siguientes características establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Marín, 2019, p. 127).

- a) Deberán estar presente en grandes cantidades en el material fecal, aguas residuales y estar ausente en fuentes de agua potable para el consumo humano (Marín, 2019, p. 127).
- b) El tiempo de vida de las bacterias indicadoras debe ser similar o igual a la de las bacterias patógenas, además de ello deben mostrar cierta resistencia a los procesos de depuración y desinfección, así como lo muestran los organismos patógenos (Marín, 2019, p. 127).
- c) Deben ser detectadas mediante la aplicación de técnicas microbiológicas rápidas, sencillas, seguras y económicas (Marín, 2019, p. 127).

Generalmente las bacterias que han sido establecidas como bioindicadores de calidad, son aquellas que se encuentran en el microbiota normal del intestino humano o animales domésticos. Estas bacterias entéricas cumplen correctamente con estos requisitos por lo que se las emplea de forma rutinaria y universal para realizar el control de la inocuidad del agua destinada al consumo. Entre los indicadores típicos de calidad se encuentra a los Coliformes totales y coliformes fecales dentro de este grupo bacteriano concretamente *Escherichia coli* y estreptococos fecales. Otros microorganismos que también se les considera como indicadores de calidad son los *Clostridium* los cuales tienden a acumularse en los sedimentos y lodos y géneros de bacterias como *Pseudomonas* y *estafilococos* (Marín, 2019, p. 126).

Sin embargo, pese a que estos géneros de bacterias se suelen usar de forma general no se debe eximir el estudio de otros tipos de bacterias que estén sujetas a contaminación del agua (Marín, 2019, p. 127).

2.2.17.1 Coliformes totales

Son un grupo de microorganismos conformados por varias bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que forman parte de la flora normal del intestino de los seres humanos y animales, mientras que otras se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Los coliformes totales son bacilos Gram negativos, los principales géneros bacterianos son: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*, *Serratia* y *Edwardsiella*. Otros géneros de bacterias que forman parte de las enterobacterias son *Salmonella* y *Shigella* las cuales son causantes de infecciones intestinales (Marín, 2019, p. 126).

2.2.17.2 Coliformes fecales y *Escherichia coli*

Los coliformes fecales también son denominados coliformes termotolerantes debido a que alcanzan un óptimo desarrollo a altas temperaturas de aproximadamente 45 °C de incubación. Dentro de este grupo se encuentran las bacterias pertenecientes al género de *Escherichia* y *Klipseilla* (Palacios, 2019, p. 28).

El género de *Escherichia* está conformado por el 80 % de cepas entérica no patógenas y por el 20 % de cepas patógenas. Las cepas patógenas se suelen transmitir a partir de agua y alimentos contaminados y son causantes de enfermedades como: meningitis, infecciones del tracto urinario, bacteriemias y enfermedades diarreicas. Las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarreas agudas y graves son: *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Escherichia coli* enteropatógena,

Escherichiacoli enterotoxigénica, *Escherichia coli* enteroinvasiva, *Escherichia coli* enteroagresiva y *Escherichia coli* de adherencia difusa (Palacios, 2019, pp. 29-30).

Según investigaciones se ha demostrado que *Escherichia coli* constituyendo alrededor del 95 % de los coliformes presentes en el material fecal de los seres humano, algunos animales domésticos. Generalmente su tiempo de supervivencia fuera del medio entérico es corta o limitada por lo que su presencia en fuentes de agua indica que existe una contaminación por materia fecal reciente. Por esta razón el género *Escherichia* es considerado como un microorganismo indicador de contaminación fecal e indispensable para realizar el control de la calidad del agua destinada al consumo humano (Prada et al., 2019: pp. 70-75).

2.2.17.3 *Estreptococos fecales*

Incluye especies bacterianas Gram positivas como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, que se caracterizan por mostrar una capacidad de crecimiento en un medio que presente alrededor del 6,5 % de NaCl, pH básicos de 9,6 y a temperaturas que bordean entre los 10 y 45 °C. Cuando se realiza el control de calidad y en este proceso el agua está exenta de coliformes y *Escherichia coli*, pero presenta un número considerable de *Estreptococos*, se suele llegar a concluir que la contaminación es antigua, dado a que este género de bacterias muestra un periodo de vida en agua mayor que los coliformes (Marín, 2019, p. 132).

Otro dato importante a considerar es que los *Estreptococos* fecales ayudan a determinar el origen de la contaminación del agua, para ello se establece una relación entre el resultado del cociente coliformes/estreptococos, de este modo, cuando existe un rango superior a 4 es indicativo de una contaminación por materia fecal humana, mientras que un rango menor a 1 sugiere que la contaminación es por otras fuentes diferentes a la humana (Marín, 2019, p. 132).

2.2.17.4 *Clostridium*

El género *Clostridium* son bacilos Gram positivos, anaerobios y que tienen la capacidad de formar esporas. Se encuentran distribuidos en el ambiente pero principalmente están en el suelo y formando parte de la flora normal del intestino de los animales y del ser humano, por lo que tienen la capacidad de generar infecciones tanto endógenas como exógenas. Dentro de este grupo de bacterias patógenas se encuentra principalmente a *Clostridium botulinum* causante de bolidismo, *Clostridium perfringens* causante de intoxicaciones alimentarias y *Clostridium tetanii* causante del tetano (Marín, 2019, p. 133).

En cuanto se refiere a su presencia en el agua, los *Clostridium* suelen estar presentes en la materia fecal en un porcentaje menor que los *Coliformes* y *Streptococos*. Sus esporas tienen la capacidad de resistir más tiempo que las bacterias coliformes y, además, son más resistentes a los procesos de desinfección del agua, sin embargo, el proceso de filtración es eficaz para eliminarlos. De este hecho se deriva su importancia para ayudar a detectar errores en el proceso de desinfección del agua (Marín, 2019, p. 133).

2.2.17.5 *Pseudomonas*

Bacilo gram negativo patógeno y oportunista causante de infecciones en personas cuyo sistema inmunológico está deprimido. Se encuentra distribuido naturalmente en el suelo y agua de zonas tropicales pero también forma parte de la microbiota intestinal normal del ser humano (Marín, 2019, p. 133).

El género *Pseudomonas aeruginosa* ha sido aislada en cisternas, tuberías y redes de distribución de agua potable, demostrando así una gran supervivencia en aquellas aguas que ya han pasado por un sistema de desinfección. Básicamente su resistencia a procesos de tratamiento se debe a que su estructura celular está formada por una capa gruesa de polisacáridos la cual actúa como una barrera fisicoquímica que le protege de desinfectantes como el cloro (Marín, 2019, p. 133).

La característica más sobresaliente de estas bacterias es que tiene la capacidad de inhibir a bacterias coliformes, por lo que se corre el riesgo del consumo de agua potable con un índice de coliformes cero (Rodríguez et al., 2018: p. 4).

2.2.18 *Resistencia bacteriana*

Se denomina resistencia bacteriana a la capacidad que tiene una bacteria para tolerar y sobrevivir ante la exposición de la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico que inhibe/mata células bacterianas, mientras que multiresistencia bacteriana se define como la capacidad que tienen las bacterias para resistir a la exposición de las dosis terapéuticas de tres o más antibióticos de diferentes grupos. La resistencia bacteriana se desarrolla de forma natural como un mecanismo de supervivencia y evolución de estos microorganismos. No obstante, en los últimos años este proceso ha ido en aumento en diferentes géneros bacterianos principalmente por el uso indiscriminado e incorrecto de los antibióticos, pero también por la exposición constante a sustancias contaminantes y uso de desinfectantes (Pérez, 2021, pp. 15-20).

2.2.18.1 Bacterias resistentes a los antibióticos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un listado que incluye 12 familias bacterianas que son las más peligrosas para la salud y que han generado gran resistencia a los antibióticos. Esta lista consta de tres clasificaciones o categorías y son: prioridad crítica, prioridad alta y mediana urgencia (OMS, 2021).

Las bacterias fueron clasificadas en cada categoría de acuerdo al grado de letalidad de las enfermedades infecciosas que causan, según el tratamiento que requieran, según la facilidad de transmisión entre personas, animales y persona-animal, si pueden o no prevenirse las enfermedades infecciosas mediante normas higiénico sanitarias y vacunación, según las opciones terapéuticas y de acuerdo a si existen investigaciones prometedoras para encontrar nuevos antibióticos para contrarrestar las infecciones que causan (OMS, 2021).

2.2.18.1.1 Prioridad 1: Crítica

Incluye bacterias multirresistentes que representan un mayor peligro en la salud dado a que causan infecciones peligrosas y letales a pacientes hospitalizados cuyo sistema inmunológico se encuentra deprimido. Este grupo está conformado por: *Acinetobacter* causante de infecciones pulmonares, sanguíneas y posquirúrgicas; *Pseudomona* bacteria responsable de desencadenar infecciones con elevada tasa de mortalidad como infecciones sanguíneas, pulmonares, urinarias y de heridas quirúrgicas; bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceas* (*Escherichia coli*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomona*, *Klebsiella* y *Proteus*) son bacterias que más causan infecciones en pacientes remitidos al área de cuidados intensivos (OMS, 2021).

Todos estos grupos de bacterias han adquirido resistencia a los carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación que han sido empleadas ampliamente por exhibir un buen mecanismo para contrarrestar a estos microorganismos. Sin embargo, bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella spp* a más de ser resistentes a los carbapenémicos son resistentes a otros antibióticos como b-lactamasas y antibióticos de primera línea como gentamicina, tetraciclina, ampicilina, penicilina y novomicina (Fernández et al., 2019: pp. 3-12).

2.2.18.1.2 Prioridad 2: Elevada

Incluye bacterias causantes de infecciones que se adquieren en la comunidad como intoxicaciones alimentarias. Dentro de este grupo se encuentra:

- *Enterococcus faecium*: Bacteria responsable de causar endocarditis, peritonitis e infecciones de vías urinarias. Es resistente a la Vancomicina (OMS, 2021).
- *Staphylococcus aureus*: Bacteria asociada a infecciones dérmicas y tejidos blandos, osteomielitis, neumonías y endocarditis (OMS, 2021). Según estudios realizados, se ha demostrado que las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, que hace varios años eran sensibles a la penicilina, actualmente la mayoría ha generado resistencia frente a la acción de la bencilpenicilina y en menor proporción a la meticilina y gentamicina, por lo que, solo pueden ser combatidas por la vancomicina (Fernández et al., 2019: p. 3).
- *Helicobacter pylori*: Causante de úlceras gástricas, gastritis crónica linfomas y cáncer gástrico. Es resistente a la claritromicina (OMS, 2021).
- *Campylobacter spp*: Se asocia a diarreas del viajero e infecciones gástricas invasivas, su diagnóstico es complejo y muestra resistente a las fluoroquinolonas (OMS, 2021).
- *Salmonella spp*: Causa infecciones alimentarias que se adquieren por el consumo de agua y alimentos contaminados, es resistente a las fluoroquinolonas y su resistencia va cada vez más en aumento en países de Latinoamérica. (OMS, 2021).
- *Neisseria gonorrhoeae*: Bacteria causante de una de las principales infecciones de transmisión sexual la gonorrea. Es resistente al grupo de las cefalosporinas como la ceftriaxona y a las fluoroquinolonas (OMS, 2021).

2.2.18.1.3 Prioridad 3: Media

- *Streptococcus pneumoniae*: Agente causal de infecciones respiratorias como otitis media aguda, sinusitis, neumonía y meningitis. Es resistente a las cefalosporinas y carbapenémicos además muestra cierta susceptibilidad disminuida a la acción de la penicilina (OMS, 2021).
- *Haemophilus influenzae*: Agente resistente a la acción de la ampicilina y está asociado a infecciones como otitis, sinusitis, meningitis y neumonías (OMS, 2021).
- *Shigella spp*: Causante de infecciones intestinales con alta mortalidad en la comunidad pediátrica. Es resistente a las fluoroquinolonas, específicamente especies como *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* han mostrado una gran resistencia a la ciprofloxacina (OMS, 2021).

2.2.19 Tipos de resistencia bacteriana

La resistencia que han generado las bacterias contra una gran cantidad de antibióticos, tiene una base genética intrínseca y una adquirida.

2.2.19.1 Resistencia bacteriana natural o intrínseca

La resistencia bacteriana intrínseca, es un proceso constante y natural que ocurre entre las cepas bacterianas de una misma especie. Es un mecanismo determinado genéticamente y no está correlacionado con el uso de antibióticos, más bien las bacterias generan como un mecanismo de defensa. Este tipo de resistencia se desarrolla en *Klebsiella pneumoniae* que es resistente a la acción de las penicilinas, esto ocurre de forma natural puesto que dicha bacteria tiene la capacidad de producir naturalmente betalactamasas, por lo tanto, es resistente a antibióticos como la ampicilina y la amoxicilina, otro ejemplo es la resistencia de los bacilos Gram negativos aerobios hacia la acción de la clindamicina, esto se debe a que este antibiótico no tiene un sitio blanco para ejercer su efecto (Pérez, 2021, p. 20-21).

2.2.19.2 Resistencia bacteriana adquirida

La resistencia bacteriana adquirida, es un proceso que ocurre cuando una determinada cepa bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico, ha generado una resistencia por medio de la modificación genética, ya sea por mutación de los genes o por la adquisición de genes de resistencia por medio del intercambio de genes entre bacterias. Estas resistencias están ligadas al uso indiscriminado de los antibióticos. Los mecanismos involucrados en el intercambio de material genético son la conjugación, transformación y transducción.

- **Transducción:** Es la transferencia de pequeños segmentos de ADN extra cromosómico denominados plásmidos entre bacterias. Los plásmidos están presentes en casi todas las células bacterianas y algunos de ellos, presentan genes asociados a procesos de resistencia a los antibióticos que pueden ser transmitidos entre bacterias (Fernández et al., 2019: pp. 3-4).
- **Transferencia:** Es un mecanismo que ocurre entre un bacteriófago y una bacteria. Se llama proceso de transducción puesto a que los fagos inyectan su material genético en las células bacterianas y luego las bacterias tienen la capacidad de captar e incorporar el ADN foráneo en su ADN; en algunos casos el material genético transferido podría contener genes de resistencia bacteriana (Fernández et al., 2019: pp. 3-4).
- **Conjugación:** También denominado proceso de transferencia horizontal de genes. Es un mecanismo mediante el cual a partir del contacto directo de dos bacterias una donante de genes y la otra receptora, se produce el intercambio del material genético sin importar la especie a la cual pertenecen e independientemente de cómo realizan el proceso de replicación celular (Fernández et al., 2019: pp. 3-4).

CAPITULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Lugar de investigación

El presente trabajo de investigación, se llevó a cabo en los laboratorios de investigación, análisis instrumental, productos naturales y de microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, misma que se encuentra ubicada en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo.

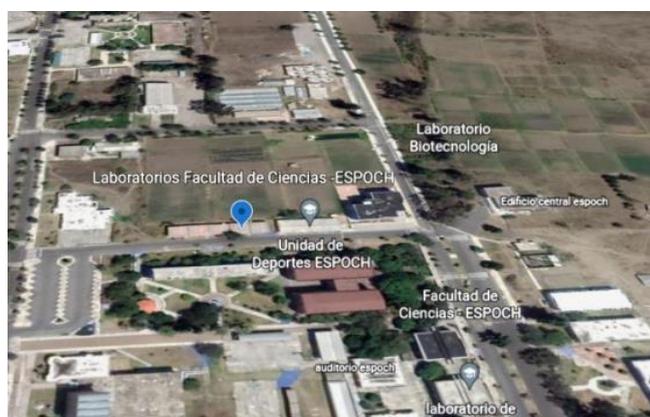


Ilustración 3-1: Localización de los laboratorios de la facultad de ciencias, ESPOCH

Realizado por: Villagomez J., 2023

3.2 Descripción de los procesos

3.2.1 *Unidad de análisis*

Actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de cobre sobre bacterias resistentes a antibióticos presentes en las muestras de agua del río Chibunga recolectadas en 3 puntos diferentes y por duplicado en dos fechas diferentes.

3.2.2 *Selección de la muestra*

3.2.2.1 *Muestreo*

El muestreo es el primer procedimiento que se debe llevar a cabo para determinar la calidad de una fuente de agua. Por lo tanto, la muestra debe ser representativa evitando su contaminación en el transcurso de su llegada al laboratorio para su posterior análisis (INEN, 2013, p. 8).

Las muestras de agua se recolectaron en tres puntos referenciales del río Chibunga y por duplicado en las dos fechas diferentes, aplicando la técnica de muestreo aleatorio simple. Los sitios de muestreo fueron: Sector de la empresa Cemento Chimborazo, Parque ecológico y puente de la entrada al cantón Chambo (**Figura 3-2**).

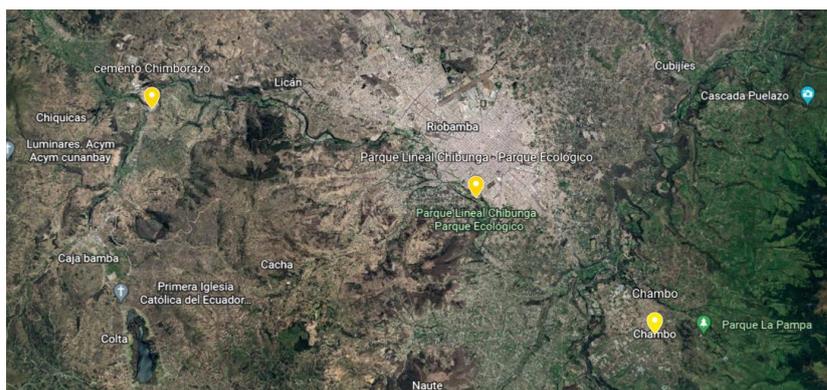


Ilustración 3-2: Puntos de toma de muestras de agua del río Chibunga

Realizado por: Villagomez J., 2023

3.2.2.2 Toma de muestras

La cantidad de muestra necesaria para determinar la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de cobre sobre bacterias resistentes a antibióticos presentes en las muestras de agua del río Chibunga fue de aproximadamente de 1000 ml como mínimo López et al (2019, p.20). La toma de muestra se desarrolló en dos etapas, las primeras muestras se tomaron el día 26 de enero de 2023 y la segunda tanda de muestras se recolectó el día 8 de febrero del 2023. En ambas fechas se inició rotulando los envases con el nombre de los tres puntos establecidos para la toma de muestras, posteriormente en cada punto se enjuago el envase 3 veces con la misma agua a muestrear, de este modo se recolecto la muestra sin dejar aire en el interior de los recipientes para evitar tomar volúmenes diferentes y finalmente se cerraron los envases.

3.2.2.3 Transporte de las muestras

Las tres muestras recolectadas en los y tres puntos específicos del río Chibunga, se etiquetaron y se almacenaron en una nevera portátil para conservar las muestras en perfecto estado a una temperatura de refrigeración, de este modo se evitó la alteración microbiológica o fisicoquímica del agua hasta llegar al laboratorio para su posterior análisis.

3.3 Materiales, equipos y reactivos

3.3.1 *Materiales*

- Vasos de precipitación 250 ml
- Pipetas graduadas
- Tubos de centrifuga
- Espátulas
- Papel filtro
- Fundas plásticas con cierre hermético
- Cajas Petri
- Asas
- Embudo
- Vidrio reloj
- Porta y cubre objetos
- Erlenmeyer
- Botellas ámbar
- Probetas
- Termómetro
- Varillas de agitación
- Piseta
- Pera
- Gradilla

3.3.2 *Equipos*

- Estufa
- Centrifuga
- Balanza analítica
- Reverbero
- Agitador magnético
- pHmetro
- Auto clave
- Espectrofotómetro Uv-vis
- Microscopio electrónico de barrido

- Espectrómetro de infrarrojo.

3.3.3 Reactivos

- Agua destilada
- Sulfato de cobre (CuSO₄)
- Agar nutritivo
- Extracto de *Eucalyptus globulu*

3.4 Normas

La toma de las muestras de agua del río Chibunga, se desarrolló en base a la Norma Técnica Ecuatoria NTE INEN 2 226;2013 y debido a que las muestras de agua de río son muy susceptibles a sufrir diferentes cambios durante el momento del muestreo, transporte y análisis, fue necesario recolectar las muestras de agua siguiendo la norma NTE INEN 2169. Según López et al (2019, p.19), los envases que se deben emplear para la toma de muestra deben ser de vidrio o plástico de preferencia nuevos y, para iniciar con el muestreo, estos deben ser enjuagados mínimo tres veces con el agua a muestrear y ser almacenados a bajas temperaturas de refrigeración para su posterior análisis.

3.5 Enfoque de la investigación

El presente trabajo de investigación tiene un enfoque cuantitativo dado a que las variables pueden ser medibles, como son: la cantidad de las nanopartículas de óxido de cobre que se determina mediante el uso de una balanza analítica; el tamaño y morfología de las nanopartículas a partir de la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM); la longitud de onda que presentan las nanopartículas empleando un espectrofotómetro de UV-Vis; los grupos funcionales se identifican a partir de la espectrofotometría de infrarrojo; finalmente la actividad antibacteriana que presentan las nanopartículas de óxido de cobre se determina mediante pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana en un medio de cultivo.

3.6 Alcance de la investigación

El presente trabajo experimental es de tipo correlacional puesto a que en él se determina si existe una relación entre las variables dependientes e independientes, es decir entre el tiempo de

exposición del agua a las nanopartículas de óxido de cobre versus el número de colonias bacterianas que crecen en los diferentes periodos de tiempo establecidos.

Además, es de tipo explicativo puesto a que se aplican los conocimientos sobre las CuONPs sintetizadas mediante una ruta verde como agente bactericida frente a bacterias resistentes a los antibióticos presentes en el agua del río Chibunga.

3.7 Diseño de la investigación

3.7.1 Según la manipulación de las variables

Este trabajo de investigación es de tipo experimental, puesto a que, para la síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre se empleó el método de síntesis verde más efectivo que permitan tener las características de nanopartículas deseadas, mientras que, para determinar la acción bactericida de las nanopartículas de óxido de cobre, se realizaron pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana en distintos periodos de tiempo y frente a la exposición a la luz solar.

Tabla 3-1: Variables independientes

Nanopartículas de CuO (g)	Tiempo (horas)
0.05	1
0.05	2
0.05	4

Realizado por: Villagomez J., 2023

Se considera como variables independientes a las nanopartículas de óxido de cobre y el tiempo de exposición a la luz solar (Tabla 1-3) porque son éstas las variables que nos ayudaron a conocer la variación en el número de colonias formadas dentro de las pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana.

3.8 Diseño experimental

Para determinar el efecto que presenta la variable independiente (tiempo de exposición de las muestras de agua con nanopartículas de óxido de cobre a la luz solar) sobre el número de colonias bacterianas formadas en los tiempos establecidos (variable dependiente), se empleó el método estadístico de Correlación de *Pearson*.

El coeficiente de Correlación de *Pearson* nos permite conocer el grado de relación que existe entre las dos variables aleatorias cuantitativas que son la variable dependiente e independiente.

De esta forma, a partir del programa Excel se crearon tres tablas con los resultados obtenidos en la parte experimental de las siembras microbiológicas en Agar Nutritivo de los tres puntos de muestreo: Empresa Cemento Chimborazo tabla 2-3; Parque ecológico tabla 3-3; Puente del cantón Chambo tabla 4-3. Cada siembra se realizó por duplicado de los tres puntos de muestreo y en las dos fechas diferentes, posteriormente se calculó el coeficiente de correlación de *Pearson*.

Tabla 3-2: Recuento de colonias bacterianas sector Cemento Chimborazo

Cemento Chimborazo				
n	Tiempo (hrs)	# Colonias bacterianas	Promedio	UFC/ml
0	0	25	25	25×10^5
1	1h	2	3	3×10^5
2	1h	3		
3	2h	1	0	0
4	2h	0		
5	4h	0	0	0
6	4h	0		

Realizado por: Villagomez J., 2023

Tabla 3-3: Recuento de colonias bacterianas sector parque Ecológico

Parque Ecológico				
n	Tiempo (hrs)	# Colonias bacterianas	Promedio	UFC/ml
0	0	31	31	31×10^5
1	1h	9	9	9×10^5
2	1h	8		
3	2h	1	0	0
4	2h	0		
5	4h	0	0	0
6	4h	0		

Realizado por: Villagomez J., 2023

Tabla 3-4: Recuento de colonias bacterianas sector Puente del cantón Guano.

Puente de Chambo				
n	Tiempo (hrs)	# Colonias bacterianas	Promedio	UFC/ml
0	0	27	27	27×10^5
1	1h	4	5	5×10^5
2	1h	5		
3	2h	1	0	0
4	2h	1		
5	4h	0	0	0
6	4h	0		

Realizado por: Villagomez J., 2023

3.8.1 Cálculo del coeficiente de Correlación de Pearson en Microsoft Excel

$$r_{xy} = \frac{\sum Z_x Z_y}{N}$$

Donde: **X:** Es la primera variable; **Y:** Es la segunda variable; **Zx:** Es la desviación estándar de la primera variable; **Zy:** Es la desviación estándar de la segunda variable; **N:** Es el número de datos.

Puente de entrada a Chambo		
n	Tiempo (hrs)	Nº Colonias
1	0	27
2	1	5
3	2	0
4	4	0
Coef.Pear		=COEF.DE.CORREL(C14:C17;D14:D17)
		COEF.DE.CORREL(matriz1; matriz2)

Ilustración 3-3: Calculo coeficiente de correlación de Pearson Excel

Fuente: Villagomez J., 2023

3.8.2 Consideraciones de la Correlación de Pearson según el valor que toma r

r = 1	correlación perfecta.
0'8 < r < 1	correlación muy alta
0'6 < r < 0'8	correlación alta
0'4 < r < 0'6	correlación moderada
0'2 < r < 0'4	correlación baja
0 < r < 0'2	correlación muy baja
r = 0	correlación nula

Ilustración 3-4: Coeficiente de correlación de Pearson

Fuente: Villagomez J., 2023

3.8.3 Hipótesis

Ho: Las nanopartículas de óxido de cobre no presentan una potencial actividad bactericida frente a colonias bacterianas resistentes a los antibióticos procedentes de las muestras de agua del Río Chibunga.

Ha: Las nanopartículas de óxido de cobre presentan una potencial actividad bactericida frente a colonias bacterianas resistentes a los antibióticos procedentes de las muestras de agua del Río Chibunga.

3.9 Población de estudio

Colonias bacterianas presentes en las muestras de agua recolectadas en 3 puntos diferentes del río Chibunga y por duplicado en dos fechas diferentes.

Para la recolección del material vegetal, se tomarán en cuenta los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

Colonias bacterianas presentes en las muestras de agua tomadas en cinco puntos diferentes y por duplicado en dos fechas diferentes del río Chibunga.

Criterios de exclusión:

Microorganismos diferentes a las bacterias presentes en las muestras de agua.

3.10 Muestra

La muestra corresponde a 200 ml de muestra de agua recolectada en 3 puntos distintos del río Chibunga y por duplicado en dos fechas diferentes el 26 de enero y 8 de febrero del 2023.

3.11 Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

3.11.1 Síntesis de nanopartículas

Para obtener las nanopartículas de óxido de cobre se empleó el método de síntesis verde, este método de síntesis consiste en usar un extracto de la planta *Eucalyptus globulus* (eucalipto) el cual actúa como agente reductor y estabilizantes de las NPs además de promover un buen control del tamaño y forma de las mismas, y una sal precursora. Este hecho se debe a que la planta posee metabolitos primarios y secundarios como por ejemplo los compuestos fenólicos que son los principales responsables de la quelación y reducción de los iones metálicos, mientras que la solución de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) actúa como sal precursora de la nanopartícula, produciendo así las nanopartículas de óxido de cobre.

La síntesis de las nanopartículas de CuO se subdivide en dos etapas: la obtención del extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* así como de la solución de la sal precursora y la síntesis de las nanopartículas como tal.

3.11.1.1 Obtención del extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (Eucalipto).

Se recolectó las hojas de *Eucalyptus globulus* que estén en mejor estado físico y se lavó con agua destilada para eliminar las impurezas. Posterior a ello, se llevó a secar en la estufa a 40 °C por 24 horas, una vez finalizado el secado, se procedió a triturar con la ayuda de un molino. El polvo resultante del material vegetal se guardó en un sobre de papel y este en una funda con cierre hermético para un mejor almacenamiento.

Posterior a ello, con la ayuda de una espátula y un vidrio reloj se pesó 10 gramos de hojas secas de eucalipto. En un vaso de precipitación se colocó 100 ml de agua destilada y con la ayuda de un reverbero se calentó hasta llegar a ebullición, una vez alcanzado este punto se procede a colocar los 10 gramos de hoja previamente pesados y se apagó el reverbero, se dejó enfriar y se filtró al vacío la solución. Finalmente, se colocó el extracto acuoso en una botella ámbar y se conservó a 4 °C para su posterior uso.

3.11.1.2 Preparación de la solución de la sal precursora

Para la obtención de la solución de 0.050 M se empleó la siguiente técnica:

Cálculos

- **0.05 M**

$$100 \text{ ml } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{0.05 \text{ mmol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{\text{L sol}} * \frac{249.6 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} = 1,248 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$$

Procedimiento

Con la ayuda de una espátula y un vidrio reloj se pesó una muestra de 1.248 g de sulfato de cobre, ésta se colocó en un vaso de precipitación, se diluyó y se aforó a 100 ml con agua destilada con la ayuda de un balón de aforo.

3.11.1.3 Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre.

El procedimiento seguido para la obtención de las nanopartículas de óxido de cobre fue el establecido por Martin (2018, p. 38). Este es el siguiente:

- Se preparó la solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a la molaridad deseada, pesando las cantidades de la sal precursora previamente calculadas. Los cálculos se detallan en el **ANEXO A**.

- Se colocó en un Erlenmeyer de 250ml las cantidades de cada reactivo en el siguiente orden: solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y extracto. El orden es importante puesto a que cuando se mezcla la solución de la sal precursora con el extracto inicia la reacción de síntesis. Las cantidades de cada reactivo varían de acuerdo a cada prueba realizada.
- Con la ayuda de un agitador magnético, se agitó la solución a 700 rpm por 2 horas para que se genere la reacción de síntesis a temperatura ambiente. En aquellos casos, donde se requirió una temperatura más elevada para llevar a cabo la síntesis, se empleó un agitador magnético con calefacción para calentar la solución.
- Transcurridas las 2 horas de síntesis, se evidencia la síntesis de las nanopartículas de CuO cuando hay una solución de coloración marrón, luego se deja reposar el coloide hasta enfriar y posterior se trasvasa a los tubos Fálcon
- Se colocó la solución resultante en tubos Fálcon y se lleva a centrifugar por 30 minutos a 500 rpm para separar el sedimento. Posteriormente, se lavó 3 veces el precipitado con agua destilada. Cada lavada se centrifuga a 500 rpm/10 min, evitando la pérdida del precipitado.
- Secado: Se colocó los tubos falcón que contienen las muestras en una estufa a 50 °C por 12 horas.
- Transcurrido este tiempo las nanopartículas de óxido cobren perfectamente secadas y pesadas se pulverizaron con la ayuda de un mortero hasta obtener un polvo fino y finalmente se almacenaron en una placa de Petri para su posterior uso.

3.12 Caracterización de nanopartículas de óxido de cobre

3.12.1 Técnicas de recolección de datos

Los datos de la caracterización de las nanopartículas de óxido de cobre fueron recolectados mediante las técnicas de Espectroscopía ultravioleta visible (*UV-Vis*), Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) y Microscopía de barrido electrónico (SEM).

3.12.1.1 Espectroscopia UV- vis.

a) Fundamento

La espectroscopia UV-Vis es una técnica instrumental que se fundamenta en determinar la cantidad de radiación UV que es absorbida por una determinada muestra a una longitud de onda UV comprendida en un rango de 160 a 780nm. Dicha absorción de radiación se produce cuando el haz de luz o energía es absorbido por la molécula generando un salto de un electrón desde el estado energético basal hasta el estado de mayor energía o también denominado estado de

excitación, por lo tanto, solo será absorbida aquella energía que permita pasar al estado de excitación. Estos electrones que entran a un estado de excitación, son todos aquellos que muestran un enlace entre moléculas, por lo tanto, los picos de absorción que se forman se relacionan con los diferentes tipos de enlace que conforman un compuesto como tal. Por este hecho la espectroscopia UV-Vis se emplea ampliamente para poder identificar los grupos funcionales de las moléculas, Finalmente, cuando el electrón se encuentra en estado excitado tiende a liberar toda la energía absorbida hasta regresar a su estado natural o basal (Pumacota, 2018, p. 57).

b) Procedimiento

- Se tomó 0,002 gr de CuO NPs (muestra) y se diluyó en 20 ml de agua destilada, luego se llevó al sonicador durante 30 minutos para que sus agregados se dispersen.
- Medición de la longitud de onda: Se colocó la muestra diluida en la celda de cuarzo y se llevó al espectrofotómetro ultravioleta- vis para efectuar la medición.

3.12.1.2 Espectroscopia de infrarrojo IR

Se emplea la técnica de espectroscopia de infrarrojo IR para determinar los diferentes grupos funcionales que posee la muestra.

a) Fundamento

La técnica instrumental de espectroscopía de infrarrojo se fundamenta en la capacidad que tiene una molécula en estado vibracional para absorber una determinada cantidad de radiación IR, dicho de otro modo, la molécula absorberá aquella radiación IR solo cuando la energía en forma de luz infrarroja sea igual a la necesaria para producir su transición vibracional.

Dentro de esta técnica analítica se estudia dos categorías de vibraciones, las cuales son, la vibración de tensión y la vibración de flexión. La vibración de tensión se refiere a los cambios que se producen en la distancia interatómica que existe en el eje de los enlaces que se encuentran uniendo a dos átomos, mientras que las vibraciones de flexión se originan cuando hay un cambio en el ángulo que forman 2 tipos de enlaces (Pumacota, 2018, p. 60).

b) Procedimiento

- De las nanopartículas pulverizadas se tomó una muestra de CuONPs y se colocó en el porta muestras del espectrofotómetro FT-IR, finalmente se cerró el equipo y se realizó el análisis.
- Spectra Analysis: En el software del equipo se debe corregir la escala del espectro. Una vez

ya obtenido el espectro de las nanopartículas se identificó y se etiquetó los picos más representativos y se guardó la imagen para realizar las comparaciones respectivas con otras bibliografías.

3.12.1.3 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido permite determinar el tamaño y la morfología de una muestra a través del uso del microscopio electrónico de barrido el cual a través de su alta resolución identifica la estructura, dimensión superficial, porosidad y la composición química de la muestra analizada (Yanchapanta, 2022, p. 36).

Procedimiento

- Tomar una pequeña cantidad de las nanopartículas ya lavadas y trituradas anteriormente y con la ayuda de una cinta de carbón depositarlas en el porta muestras del microscopio electrónico de barrido y finalmente observar los resultados en la pantalla.

3.12.2 Evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de cobre

Para evaluar la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de cobre, se empleó muestras de agua tomadas de tres puntos diferentes del río Chibunga y debido a que el agua de río aloja un gran número de bacterias fue necesario trabajar con un medio de cultivo que permita el crecimiento de todo tipo de bacterias como es el agar nutritivo.

3.12.2.1 Preparación del medio de cultivo (Agar nutritivo)

- Se pesó una cantidad adecuada de agar nutritivo y se colocó en un matraz, luego se procedió a rehidratar con agua destilada.
- Se llevó el matraz previamente tapado con una gasa a la autoclave por 30 minutos a una temperatura de 121°C al igual que todos los materiales para siembra de manera que queden estériles.
- Transcurrido el tiempo establecido se retiró el matraz de la autoclave y se llevó a otro lugar para que adquiriera una temperatura de 40° C aproximadamente.
- Una vez que las cajas de Petri fueron esterilizadas, se procedió a distribuir sobre ellas 15 ml del medio de cultivo dentro de la cámara de flujo laminar.

- Finalmente se esperó a que se solidifique el medio en las placas parcialmente destapadas para luego realizar las siembras posteriores.

3.12.2.2 Preparación de diluciones de las muestras de agua

Para este análisis, se inició realizando una dilución hasta 1×10^{-4} de las muestras iniciales de agua tomadas en los tres puntos del Río Chibunga (inoculo) con la finalidad de que al momento de realizar las siembras microbiológicas se pueda llevar a cabo un conteo adecuado del número de colonias formadas. Es importante mencionar que cuando las muestras de agua son colocadas directamente en el medio de cultivo, el crecimiento aglomerado de las colonias hará casi imposible su análisis.

A continuación, el procedimiento para realizar las diluciones de las muestras de agua se resume en el grafico 3-3.

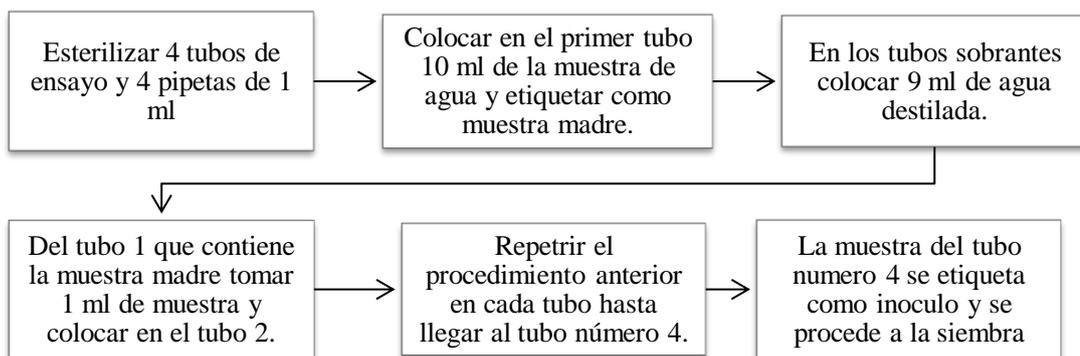


Ilustración 3-5: Proceso para realizar diluciones seriadas de las muestras de agua

Fuente: Yanchapanta, 2022

Realizado por: Villagomez J., 2022

3.12.2.3 Siembra en placas

Se empleó dos técnicas de siembra en placa. La primera técnica de siembra por extensión en placa, se utilizó para verter las diluciones obtenidas de las tres muestras de agua de río, mientras que, la técnica de siembra por estrías se empleó para aislar las cepas bacterianas obtenidas en la primera siembra por extensión en placa.

3.12.2.4 Siembra por extensión en placa.

- Prueba control: Se tomó 0.100 ml del inóculo y se realizó una siembra por extensión en placa

con ayuda de la espátula de Drigalsky la cual permite distribuir la muestra de manera uniforme por toda la superficie del medio de cultivo. Finalmente se dejó incubar a 37°C por 48 horas.

- De esta manera se tiene 3 siembras que corresponden a cada muestra tomada en un punto del río Chibunga: Sector de la empresa Cemento Chimborazo, Parque ecológico y puente de la entrada al cantón Chambo.

3.12.2.5 *Siembra por estrías*

- Una vez obtenidas las colonias bacterianas de la primera siembra realizada, se contabilizó las colonias bacterianas formadas y se identificó aquellas que presenten distinta morfología.
- De aquellas colonias bacterianas de distinta morfología con la ayuda de un aza de platino estéril se tomó una pequeña cantidad de muestra y mediante una siembra por estrías se repartió por toda la superficie del medio de cultivo.
- Finalmente, se procedió a incubar por 48 horas a 37 °C.

3.12.2.6 *Identificación de bacterias mediante Tinción Gram*

De las placas Petri que presentan las colonias bacterianas aisladas, se tomó una cepa con la ayuda de un aza y se extendió en un porta objetos para tener un frotis bacteriano, posterior a ello se fijó la muestra. Una vez ya fijada se colocó el primer colorante cristal violeta durante 1 minuto, pasado este tiempo se eliminó el exceso de colorante y se añadió Lugol durante 1 minuto, después se añadió alcohol cetona al 95% durante 20 segundos y se lavó la placa con agua destilada. Finalmente se añadió el colorante de contraste, safranina durante 1 minuto y posteriormente se realizó el ultimo lavado de la placa. Una vez seca la placa se procedió a observar en el microscopio con el lente de 100Xy aceite de inmersión e identificar y clasificar a las bacterias según la forma y según la tinción de su pared celular en dos grupos respectivamente cocos Gram Positivos y bacilos en Gram negativos.

3.12.2.7 *Pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana*

3.12.2.7.1 Determinación del número de colonias bacterianas de las muestras de agua con nanopartículas de óxido de cobre cada 1, 2 y 4 horas expuestas a la luz solar.

- En 4 tubos de ensayo se colocó 0,05g de CuONPs y 1 ml del inculo y se expuso a la luz solar por el lapso de tiempo de 1, 2 y 4 horas.

- Del tubo 1 expuesto durante 1 hora a la luz solar se tomó una alícuota de 0.100 µl y se procedió a realizar la siembra por extensión en el medio de cultivo.
- Los tubos de ensayos restantes previamente preparados y expuesto a la luz solar en las horas establecidas se realizó el mismo procedimiento de siembra, tal como se realizó anteriormente teniendo un total de 5 siembras en cajas Petri.
- Incubación: Las cajas Petri se incuban a 37°C por 48 horas para que se evidencie el crecimiento bacteriano.
- Una vez concluidas las 48 horas de incubación se evidencia el crecimiento bacteriano.
- Posteriormente se realiza el recuento de las colonias formadas (UFC/mL).

3.12.2.7.2 Determinación del número de colonias bacterianas de las muestras de agua con nanopartículas de óxido de cobre en estado puro.

- Tomamos dos cajas Petri que contengan las cepas bacterianas aisladas y que hayan sido identificadas como Bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos.
- Colocamos en cada caja 0.1 g de CuONPs y dejamos en incubación por 48 horas a 37°C.
- Finalmente se determinó si existe o no crecimiento bacteriano.

CAPITULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Obtención del extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (eucalipto)

El extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) se obtuvo a partir de las hojas recolectadas del árbol de eucalipto, las cuales se lavaron con agua destilada para eliminar materiales extraños como muestra la Figura 1-3 y posteriormente se llevaron a secar en la estufa por 24 horas a 40°C. Una vez que el material vegetal se encontraba totalmente secas, se trituran tal como se indica en la Figura 1-4 y se procedió a obtener el extracto acuoso de eucalipto. Para ello se tomó 100 ml de agua destilada y se colocó en un vaso de precipitación de 250 ml, este se llevó a un reverbero y se calentó hasta que llegue a ebullición, una vez alcanzada la temperatura, se añadió 10 g de material vegetal, se tapó con un vidrio reloj y se apagó el reverbero. Finalmente, el extracto obtenido (Figura 2-4) se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró al vacío y se almaceno en una botella ámbar para su posterior uso.



Ilustración 4-1: Hojas de *Eucalyptus globulus*. (A) Lavado; (B) Secado

Realizado por: Villagomez J., 2023



Ilustración 4-2: Extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (eucalipto)

Realizado por: Villagomez J., 2023

4.1.1 Análisis del extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (eucalipto)

4.1.1.1 Test con cloruro férrico

El extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) se caracterizó mediante un análisis cualitativo con cloruro férrico para determinar la presencia de compuestos fenólicos los cuales son agentes reductores y estabilizantes esenciales que permiten la síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre.

De acuerdo con Kuklinski (2003, p.97), una de las propiedades de los compuestos fenólicos y ácidos fenólicos es la capacidad de formar complejos por lo que dan positivo al test de cloruro férrico (FeCl_3). El ensayo se basa en que al reaccionar el FeCl_3 con un compuesto fenólico da como resultado la formación de complejos de hierro, lo cual se evidencia cuando la solución analizada toma una coloración verde, violeta o negra, cuya intensidad de coloración depende de la cantidad de los compuestos fenólicos presente en la solución. En la Figura 3-3, se observa un cambio de coloración, de amarillo pálido característico del extracto vegetal a negro intenso, de esta manera se confirma que el extracto de eucalipto si posee grupos fenólicos que faciliten posteriormente la síntesis de las nanopartículas.



Ilustración 4-3: Presencia de compuestos fenólicos (A)

Extracto puro; (B) Extracto más FeCl_3

Realizado por: Villagomez J., 2023

4.1.1.2 Análisis por Espectrometría infrarroja (IR)

A continuación, se presenta los espectros FT-IR del extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (eucalipto).

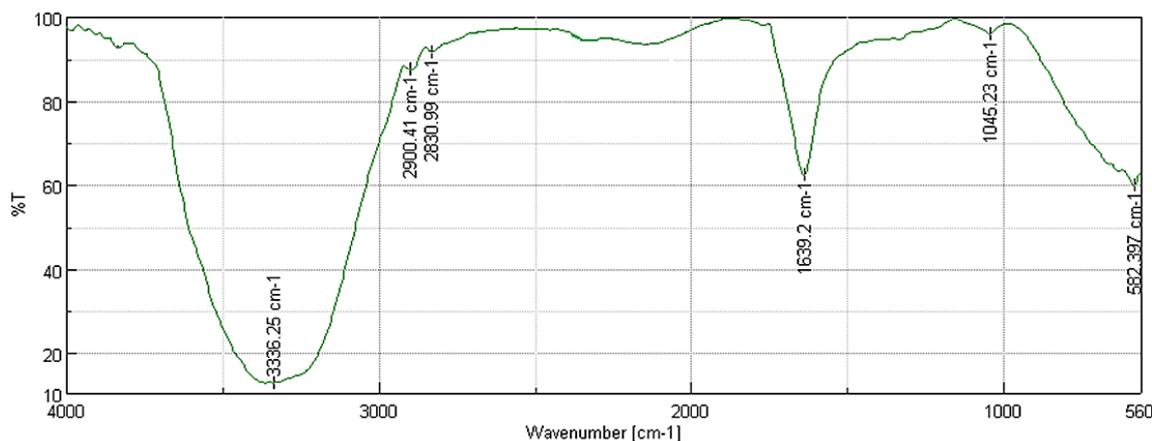


Ilustración 4-4: Espectrometría infrarroja (IR) del extracto acuoso de *Eucalyptus globulus*

Realizado por: Villagomez J., 2023

La Figura 4-4 muestra los espectros FT-IR del extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (eucalipto), en el que se evidencia bandas de absorción características de los grupos funcionales de compuestos orgánicos e inorgánicos. El primer pico ancho e intenso se detecta a una longitud de onda de 3336.25 cm^{-1} . Esta señal de absorción, que se forma en un rango de $3550 - 3300\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la vibración característica del grupo hidroxilo (-OH) presente en los compuestos fenólicos (Mondragón, 2017, pp.7-10).

El segundo pico que se forma a 2900.41 cm^{-1} es propio del enlace C-H del grupo aldehído mientras que el tercer pico formado a 1639.2 cm^{-1} es propia de los alquenos. El cuarto y quinto pico que aparecen a una longitud de onda de 2830.99 cm^{-1} y 582.397 cm^{-1} corresponden a los enlaces O-H, y C-OH. Finalmente, la banda de absorción registrada a 1045.23 cm^{-1} se asocia al estiramiento del grupo funcional de aminas alifáticas primarias y la banda de absorción a 582.397 cm^{-1} es característica del grupo alcohol C-OH (Mondragón, 2017, pp.7-10).

A continuación, en la Tabla 1-4, se presenta las señales observadas en la Figura 4-4 de los enlaces y grupos funcionales a los que corresponde.

Tabla 4-1: Lectura del análisis de la Espectrometría infrarroja (IR) del extracto de eucalipto

Numero de onda cm^{-1}	Rango cm^{-1}	Tipo de vibración	Grupo funcional
3336.25	3550-3300	Estiramiento O-H	Fenoles
2900.41	2900-2700	Estiramiento C-H	Aldehídos
2830.99	3000-2500	Estiramiento O-H	Ácidos carboxílicos
1639.2	1600-1675	Estiramientos C=C	Alquenos
1045.23	1000-1300	Estiramientos C-N	Aminas
582.397	250-650	Estiramientos C-O-H	fuera del plano

Fuente: Mondragón, 2017

Realizado por: Villagomez J., 2023

Estas bandas de absorción son similares a las presentadas en el estudio realizado por Torres (2022, pp. 39-40), donde el extracto acuoso de eucalipto caracterizado por FR-IT registra la presencia del grupo hidroxilo (-OH) en la región de 3336 cm^{-1} confirmando así la existencia de grupos fenólicos en el material vegetal. Así también se reportan bandas de 2974 cm^{-1} , 1653 cm^{-1} y 1378 cm^{-1} que corresponden a vibraciones simétricas y asimétricas del grupo C-H, vibración del esqueleto aromático -C=C- y absorción de los grupos funcionales de ácido carboxílicos (COOH), igualmente se encontraron bandas de absorción entre 1088 y 1045 cm^{-1} que corresponde a enlaces C-N correspondientes del grupo amina alifática de compuestos fenólicos.

Al ser nuestros resultados similares a los encontrados por los autores ya mencionados podemos afirmar que el extracto acuoso de eucalipto si presenta grupos fenólicos los cuales facilitarán la síntesis eficiente de las nanopartículas de óxido de cobre dado a que estos grupos actuarán como agentes reductores de los iones metálicos de la sal precursora y estabilizantes de las nanopartículas.

4.2 Síntesis de nanopartículas de óxido de cobre

4.2.1 Experimentos para la obtención de nanopartículas de óxido de cobre

4.2.1.1 Variando la concentración de la sal.

Experimentación 1

A partir de los resultados obtenidos en el estudio realizado por Cedano (2018, p. 49), se planteó la primera síntesis en las condiciones que se detalla en la tabla 1-4 a temperatura ambiente. El tiempo de agitación, el volumen del extracto y de la sal precursora se mantuvo constante, mientras que

para el proceso de centrifugación en vista de que no se pudo acceder a una centrifuga de 1500 rpm se procedió a centrifugar a 500 rpm (revolución máxima del equipo) respectivamente.

Tabla 4-2: Condiciones de síntesis de CuONPs experimento 1

Muestra	Concentración de la sal (mol/L)	Temperatura °C	Volumen del extracto (ml)	Volumen de la sal (ml)
M1	0.5	25	10	50
M2	1	25	10	50
M3	1.5	25	10	50

Realizado por: Villagomez J., 2023

En la Figura 5-4 y la Figura 6-4, se puede observar las soluciones de las muestras durante la síntesis y al final de la síntesis. Como se observa, no se aprecia grandes cambios en la coloración, lo que hace ilusión a que no se ha producido grandes cambios, sin embargo, en la figura 6-4 se puede apreciar la formación de un precipitado color gris al final de los tubos Fálcon.

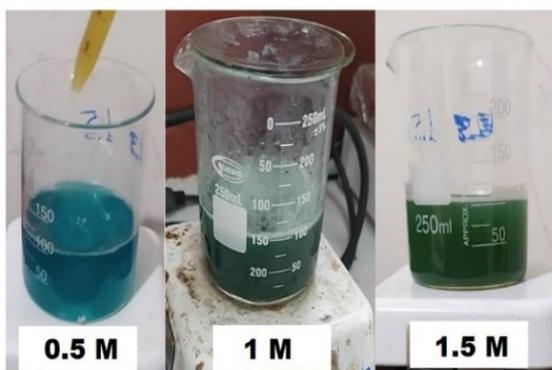


Ilustración 4-5: Durante la síntesis

Realizado por: Villagomez J., 2023



Ilustración 4-6: Después de la síntesis

Realizado por: Villagomez J., 2023

Al día siguiente se realizó el análisis de las muestras en el espectro UV-Vis donde se confirmó que no se habían formado CuONPs debido a que no se evidencia ninguna señal en el equipo, además, al realizar el proceso de secado del precipitado se observaba la formación de gran cantidad de cristales de sal en las paredes de los tubos de concentración 1 M y 1.5 M y baja cantidad de cristales en el tubo de concentración 0.5 M por lo que se supone que no reaccionó todo el reactivo con el volumen de extracto empleado.

Experimentación 2:

Debido a que se observó que la sal precursora de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ no reaccionaba completamente, se dedujo que probablemente era debido a que la cantidad de extracto empleada como reactivo no era suficiente para que reacciones con el cobre de la solución, por lo tanto, se propuso realizar nuevamente la síntesis en las condiciones que se muestra en la Tabla 3-4. Se optó por disminuir la concentración de la solución de la sal precursora de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de 0.5 M, 1 M y 1.5 M hasta 0.25 M y 0.5 M y aumentando el volumen del extracto y disminuyendo el volumen de la sal, así también se elevó la temperatura de 25 °C a 80 °C, respectivamente. Se escogió una temperatura de 80°C puesto a que se quería saber si la reacción de síntesis de nanopartículas de óxido de cobre aparte de tener lugar a temperatura ambiente que según fuentes bibliográficas es la condición más favorable, también podría tener lugar a una elevada temperatura.

Tabla 4-3: Condiciones de síntesis de CuONPs, experimento 2

Muestra	Concentración de la sal (mol/L)	Temperatura °C	Volumen del extracto (ml)	Volumen de la sal (ml)
M1	0.25	80	20	40
M2	0.5	80	20	40

Realizado por: Villagomez J., 2023

La figura 7-4 y figura 8-4 muestran el cambio producido en las muestras durante la síntesis y finalizada la síntesis.

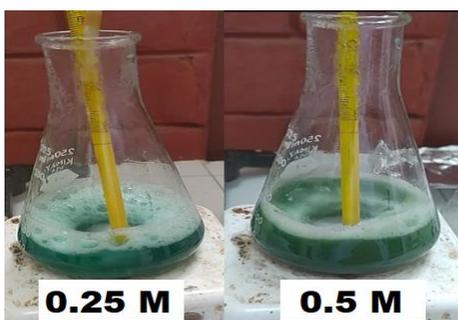


Ilustración 4-7: Durante la síntesis

Realizado por: Villagomez J., 2023

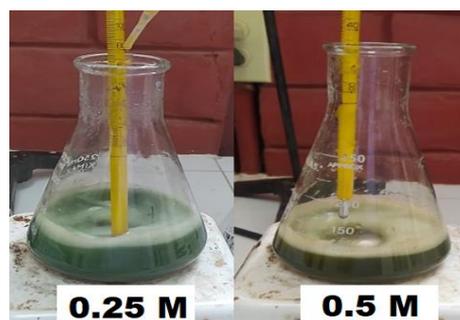


Ilustración 4-8: Después de la síntesis

Realizado por: Villagomez J., 2023

Como se observa en la Figura 7-4 y Figura 8-4, no se identifica ningún cambio significativo en el color de las muestras, pero si se puede observar la formación de un precipitado de color café. Al analizar las muestras en el equipo UV-Vis, se determinó que a una concentración de 0.25 M se

produjo un pico de absorción, pero a bajas longitudes de onda, mientras que a una concentración de 0.5 M no se produjo ningún pico de absorción, lo cual indica que no se han formado nanopartículas de CuO (Figura 9-4).

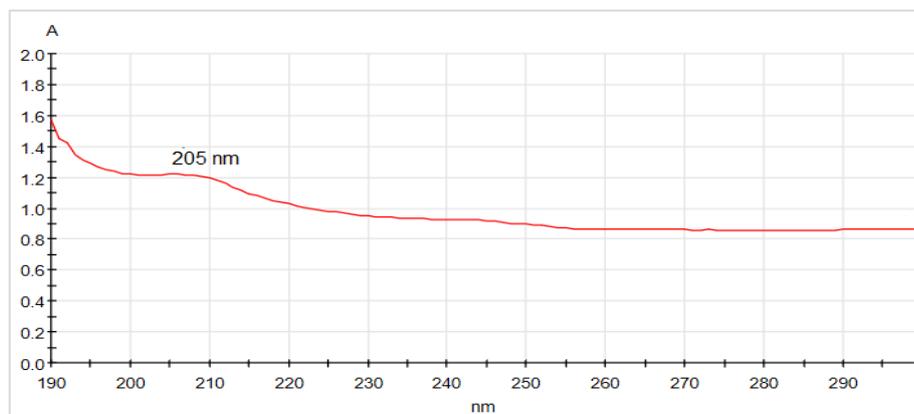


Ilustración 4-9: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.25 M

Realizado por: Villagomez J., 2023

Experimentación 3

En vista de que los experimentos anteriores demostraron que la concentración de la sal precursora en disolución estaba en exceso puesto a que existía la presencia de residuos de sal y en vista de que la obtención de nanopartículas está enfocada en una metodología de síntesis verde, se optó por llevar a cabo un nuevo experimento con una concentración mucho menor de disolución stock de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de 0.05 M y 0.025M manteniendo constante la cantidad de volumen tanto del extracto como de la sal precursora.

Tabla 4-4: Condiciones de síntesis de CuONPs, experimento 2

Muestra	Concentración de la sal (mol/L)	Temperatura °C	Volumen del extracto (ml)	Volumen de la sal (ml)
M1	0.05	80	20	40
M2	0.025	80	20	40

Realizado por: Villagomez J., 2023

Al ser analizadas las muestras M1 y M2 mediante la espectroscopia UV-Vis, se obtuvo como resultado que, el espectro de la muestra M1 se forma a una longitud de onda de 327 nm, formando una curva bien definida y pronunciada, tal como se evidencia en la Figura 10-4, mientras que para

la muestra M2 el pico de absorción también se forma a una longitud de onda de 327 nm sin embargo tal como muestra la Figura 11-4, no se evidencia una curva definida como en M1.

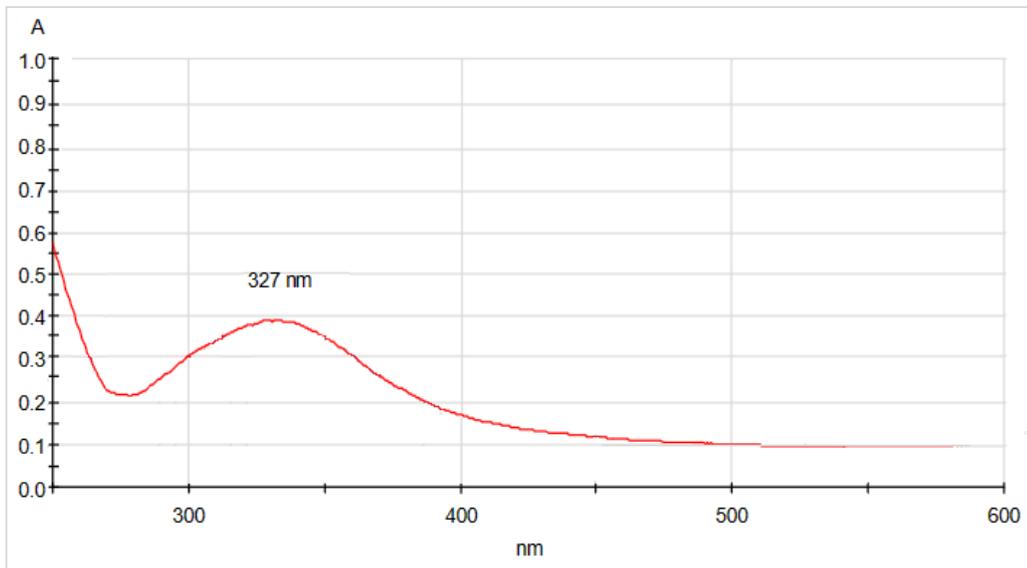


Ilustración 4-10: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.05M

Realizado por: Villagomez J., 2023

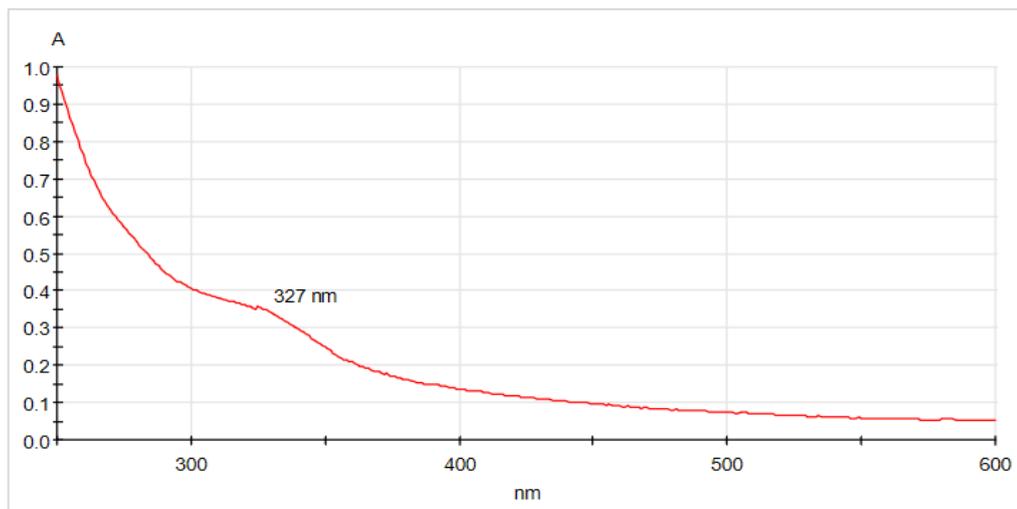


Ilustración 4-11: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.025 M

Realizado por: Villagomez J., 2023

De acuerdo a estos resultados obtenidos, se tomó a la muestra M1 de este último experimento como la mejor muestra para realizar la caracterización de las nanopartículas de óxido de cobre, así como también para realizar las pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana y probar si las nanopartículas de óxido de cobre presentan o no un potencial efecto bactericida.

4.3 Resultados de la síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre 0.05 M

Las nanopartículas de óxido de cobre M1 sintetizadas en la experimentación 3, se analizaron en primera instancia de forma cualitativa, es decir, se observó el cambio de coloración de la solución de la sal precursora $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de celeste pálido a marrón oscuro (Figura 5-3). Según Martin (2018, p. 97), el color de la solución que evidencia la formación de nanopartículas de CuO debe ser de un color casi negro o marrón obscuro.

En nuestra investigación, el color marrón de la solución que se visualiza tras la adición del extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y transcurridas 2 horas de reacción a 80 °C y 700 rpm de agitación, demuestra la formación correspondiente de nanopartículas de óxido de cobre, así también la formación de un precipitado sólido de color marrón obscuro, tal como se evidenció en las investigaciones desarrolladas por Adwale et al (2020, p. 3), quien dedujo que se ha formado nanopartículas de CuO puesto a que la solución concentrada de sulfato de cobre tomo una coloración marrón obscura luego de 2 horas de agitación a temperatura ambiente. Mientras que Salahuddin y Husen (2020, p. 5), observaron que la solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se volvía negra después de añadir extracto acuoso de *Lawsonia inermis* (henna) y transcurrir una hora de agitación a 75°C llegando a concluir que se ha formado CuO NPs.

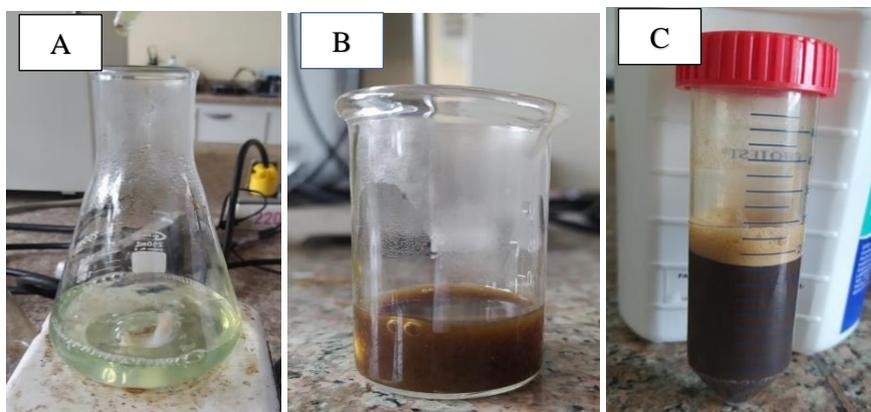


Ilustración 4-12. Síntesis de CuO NPs: (A) solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, (B) sal precursora más extracto, (C) CuO NPs

Realizado por: Villagomez J., 2023

La síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre se produce mediante una reacción de óxido-reducción, sin embargo, hasta el momento no se conoce con certeza como se genera la reacción química debido a que el extracto de eucalipto posee varios metabolitos secundarios especialmente grupos fenólicos que tienen la capacidad de actuar como agentes reductores y estabilizantes de las nanopartículas.

Según el estudio realizado por Alhalili (2022, p.8), la síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre se basa en que los compuestos fenólicos (flavonoides) presentes en el extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) se unen a los iones Cu^{2+} que se forman tras la disolución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua, de esta manera se forman complejos metálicos los cuales se van a reducir a partículas de CuO . Estas partículas denominadas semillas sufren un proceso de agregación y posteriormente de nucleación dando paso a la formación de nanopartículas de óxido de cobre llegando así al final de la reacción química. En la Tabla 5-4 se detalla el rendimiento experimental de CuONPs.

Tabla 4-5: Rendimiento experimental de la síntesis de NPs CuO

Concentración CuONPs (M)	Peso/Masa obtenida (g)
0.05 M	0.267 g

Realizado por: Villagomez J., 2023

4.4 Resultados de la caracterización de nanopartículas de óxido de cobre

4.4.1 Espectroscopia Uv-vis

La espectroscopia Uv-vis, es la primera técnica analítica que se emplea para determinar la presencia de nanopartículas, puesto a que ésta, revela si se ha sintetizado o no nanopartículas del compuesto de interés, en este caso nanopartículas de óxido de cobre.

Para realizar el análisis se efectuó un barrido de la muestra en un rango de longitud de onda de 200 a 600 nm, según Martín (2018, p. 25), las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) en solución, absorben longitudes de onda de 250 hasta 350 nm, los picos formados a dichas longitud de onda tienden a desplazarse hacia la derecha o hacia la izquierda según sea el tamaño que presenten las nanopartículas, de tal modo que, mientras mayor sea el desplazamiento hacia el lado derecho mayor será el tamaño que presenten las nanopartículas. En nuestra investigación, la muestra analizada a concentraciones 0.05 M presentan un único pico a una longitud de onda de 327 nm.

En la investigación realizada por Salahuddin y Husen (2020, pp. 5-7), las nanopartículas de CuO obtenidas a partir del extracto acuoso de eucalipto y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mM presentaron un único pico de absorción a una longitud de onda de 327 nm, mientras que las nanopartículas de CuO sintetizadas por Qamar et al (2020, pp. 6-7), a partir del extracto acuoso de la fruta *Momordica charantia* (melón) y a una concentración de 0.1 M de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, registraron en un rango de

200-600 nm un solo pico de absorción a 246 nm. Así también las nanopartículas sintetizadas por Al-Fa et al (2021, pp. 2-3), a partir del extracto acuoso de las hojas de *Bougainvillea buttiana* (bungavilla) y 5 gramos de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, registraron la formación de un pico a una longitud de onda de 310 nm.

Según Adewale et al (2020, p. 4), la diferencia de longitud de onda en la que se registra el pico de absorción se puede deber a diferentes factores de síntesis como es la concentración de la sal precursora, el tipo de extracto que se emplea para la síntesis de las nanopartículas y condiciones como temperatura. Al estar nuestros resultados (Tabla 6-4), dentro de los rangos de la longitud de onda establecidos por Martín (2018, p. 25), y al ser similares a los autores anteriormente citados, podemos afirmar que efectivamente se ha sintetizado nanopartículas de óxido de cobre.

Tabla 4-6: Resultado del análisis por espectroscopía UV-vis

Concentración de las CuONPs	Longitud de onda (nm)
0.05 M	327 nm

Realizado por: Villagomez J., 2023

A continuación, en la **Figura 6-4** se puede distinguir claramente el pico formado al analizar la muestra obtenida en el equipo UV-Vis.

[]	nm	Abs
0.05 M	327	0.400

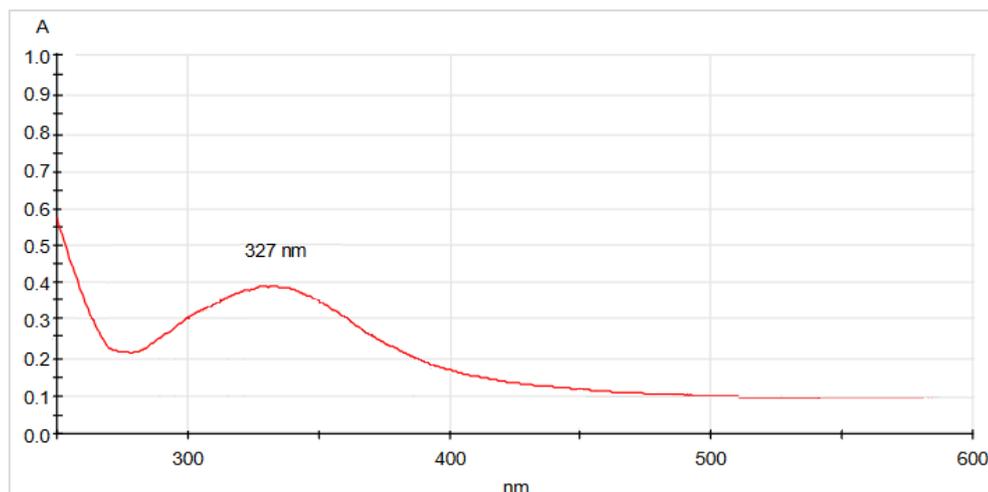


Ilustración 4-13: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.05 M

Realizado por: Villagomez J., 2023

4.4.2 Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR)

El análisis mediante la técnica de Espectroscopia infrarrojo al igual que la espectroscopia Uv-vis permite comprobar que en efecto las nanopartículas sintetizadas son completamente de óxido de cobre. Según Qamar et al (2020, p. 6), las nanopartículas de óxido de cobre generalmente presentan un pico agudo en el espectro infrarrojo a bajas frecuencias entre 590.4 y 628.200 cm^{-1} .

En la Figura 14-4, se observan los diferentes picos de absorción que presentaron las nanopartículas de CuO a una concentración de 0.05 M . Los picos más representativos de las CuONPs se registran a 3551.21 cm^{-1} que hace referencia al grupo OH de los compuestos fenólicos y a 1668.79 cm^{-1} que indica el estiramiento de C=C de los alquenos dichos picos señalan la presencia de los grupos funcionales presentes en el extracto acuoso de eucalipto, mientras que el tercer pico de absorción a una longitud de onda de 576.34 cm^{-1} supone la presencia de bandas del enlace Cu-O.

Estos picos de absorción, presentados en el presente trabajo experimental, son próximos a los reportados por Alhalili (2022, pp. 5-7), quien al realizar el análisis FT-IR de las nanopartículas de CuO identificó un pico de absorción en la región de 3480 correspondiente al grupo OH de los grupos fenólicos y el segundo pico observado entre 530 y 580 cm^{-1} se les atribuyó a las vibraciones de CuO, por lo cual se dedujo que se ha sintetizado nanopartículas de óxido de cobre.

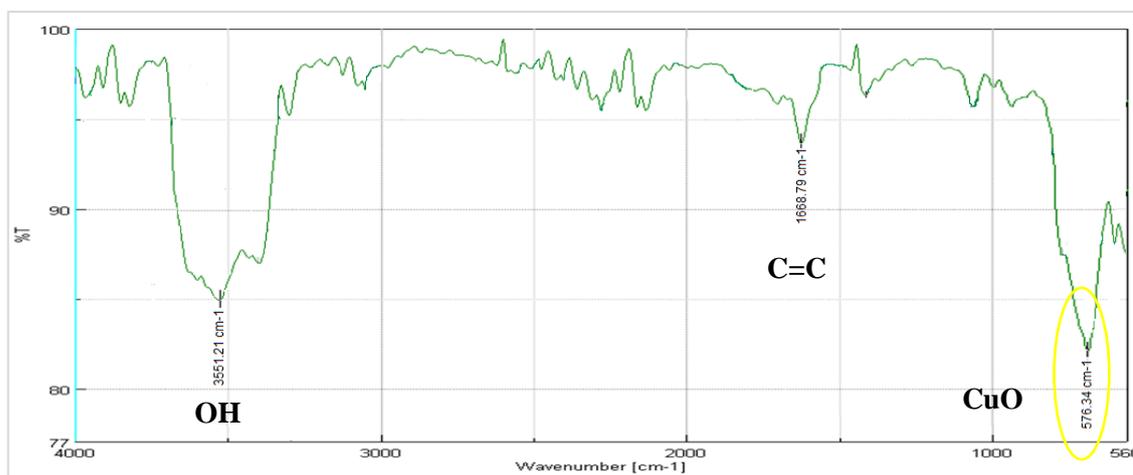


Ilustración 4-14: Espectroscopia de infrarrojo de nanopartículas de CuO 0.05 M

Realizado por: Villagomez J., 2023

De acuerdo a estos resultados encontrados, se puede comprobar que el pico formado en las nanopartículas de óxido de cobre en el rango de 590.4 y 628.200 cm^{-1} si corresponde a vibraciones del enlace Cu-O y que las nanopartículas en efecto, son de óxido de cobre.

4.4.3 Microscopia electrónica de barrido

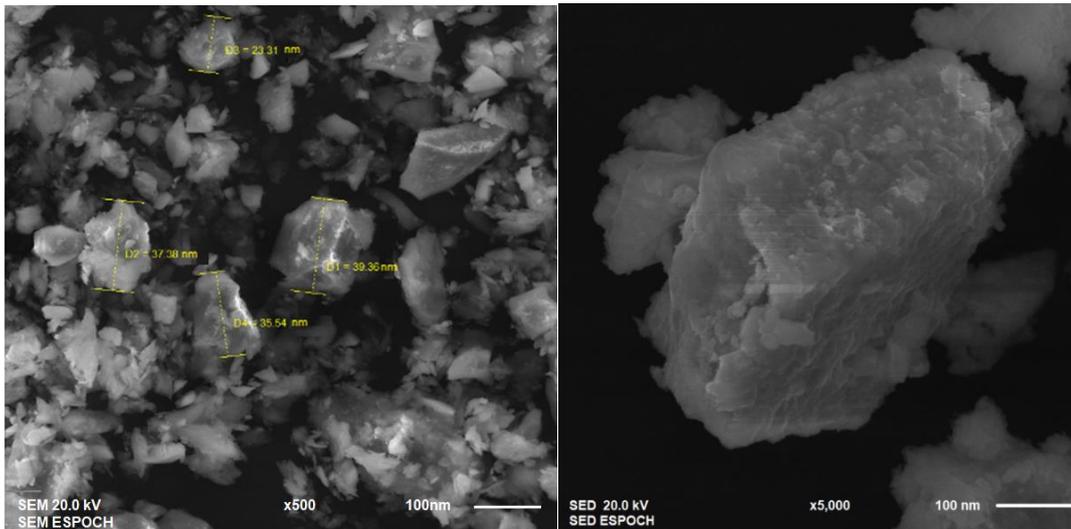


Ilustración 4-15: Microscopia electrónica de barrido de nanopartículas de óxido de cobre a 500x (izq.) y 5000X (der)

Realizado por: Villagomez J., 2023

Mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido, se identificó las características morfológicas y el tamaño que presentan las CuONPs. Al lado izquierdo de la Figura 16-4, a una resolución de 500X, se muestra que las nanopartículas de CuO presentan un tamaño entre 23-39 nm respectivamente, mientras que, a una resolución de 5000X se puede evidenciar que las nanopartículas son de forma ovalada, de bordes irregular y superficie rugosa, además se encuentran dispersas y sin aglomerarse. Estos resultados coinciden con los resultados encontrados por Letchumanan et al (2021, p.4-6), quien reporto que las nanopartículas de óxido de cobre presentan una forma ovalada y su tamaño promedio se encontraba entre 12 y 68 nm, sin embargo, al mismo tiempo encontró nanopartículas de forma cubica y esférica.

Otros autores como Aguilar (2019, p. 49), determinaron que las nanopartículas de óxido de cobre no solo presentaban forma ovalada o esféricas, sino que también, podían tener forma de diente de león, forma tipo flor y forma tipo rugby, en cuanto al tamaño estas variaban entre 10 y 35 nm. Pese a la diferencia de tamaños y formas, podemos concluir que tanto nuestros resultados obtenidos como los resultados encontrados por otros autores, se encuentran dentro de la escala manometría, lo cual es muy importante debido a que el potencial efecto antimicrobiano que ejercen las nanopartículas depende netamente de su tamaño y morfología ya que son estas características que les facilitara su paso libre a través de los poros de la membrana celular bacteriana y puedan ingresar intracelularmente a causar un estrés oxidativo y la posterior muerte de las bacterias (Sánchez, 2021, pp. 75-78).

4.5 Resultados de la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de cobre

Para determinar la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de cobre frente a bacterias resistentes a medicamentos, se empleó muestras de agua tomadas en dos fechas diferentes y en tres puntos del río Chibunga: parque Ecológico, empresa Cemento Chimborazo y puente de entrada al cantón Chambo (Figura 17-4).



Ilustración 4-16: Toma de muestras de agua del río Chibunga

Realizado por: Villagomez J., 2023

Según la investigación realizada por Landa (2023), el agua del río Chibunga aloja un gran número de bacterias resistentes medicamentos, por lo tanto, debido a este hecho fue necesario trabajar con un medio de cultivo que permite el crecimiento de diferentes tipos de bacterias como es el agar Nutritivo, así como también fue necesario realizar diluciones hasta 1×10^{-4} de las muestras de agua (inoculo) para realizar un conteo adecuado de las colonias bacterianas formadas, dado a que mientras mayor sea la concentración de las muestras mayor será el crecimiento de las colonias bacterianas y por lo tanto será casi imposible el recuento de las celular viables (Figura 18-4).



Ilustración 4-17: Diluciones de las muestras de agua del río Chibunga

Realizado por: Villagomez J., 2023

Es importante mencionar que todo el proceso de siembra en placas Petri, se debe realizar con precaución y bajo condiciones asépticas para evitar generar una contaminación cruzada y por ende el crecimiento e identificación de bacterias que no correspondan a cada muestra de agua recolectada (Figura 19-4).



Ilustración 4-18: Siembra de muestras de agua usando la cámara de flujo laminar

Realizado por: Villagomez J., 2023

4.5.1 *Determinación del número de colonias formadas en Agar nutritivo.*

Para contabilizar el número inicial de colonias bacterianas, se realizó una siembra por extensión en placa del inoculo (dilución 10^{-4}) de los tres puntos de muestreo y en dos fechas diferentes. Al cabo de 48 horas de incubación a 37°C , se obtuvo como resultado un total de 25 colonias formadas de la muestra de agua tomada en la empresa Cemento Chimborazo (Figura 18-4), 31 colonias para la muestra tomada en el sector del parque Ecológico (figura 19-4) y 27 colonias para la muestra tomada del puente de entrada al cantón Chambo (Figura 20-4).

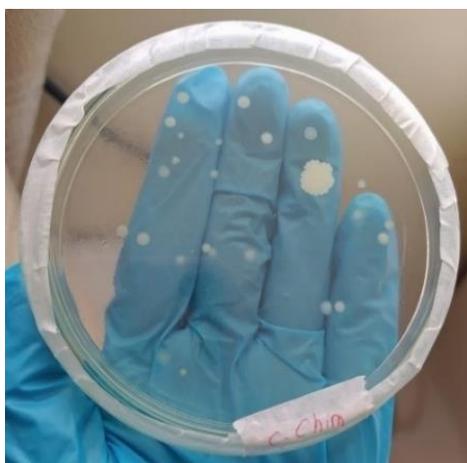


Ilustración 4-19: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo

Realizado por: Villagomez J., 2023

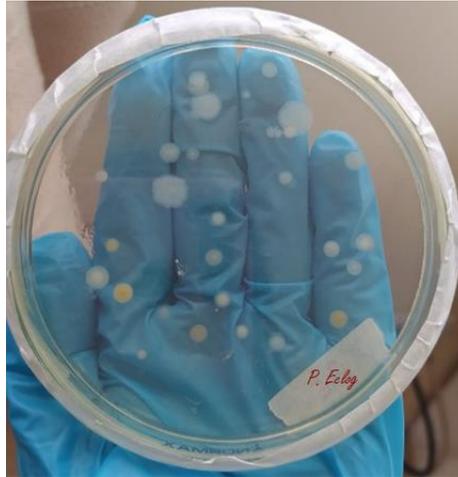


Ilustración 4-20: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo

Realizado por: Villagomez J., 2023

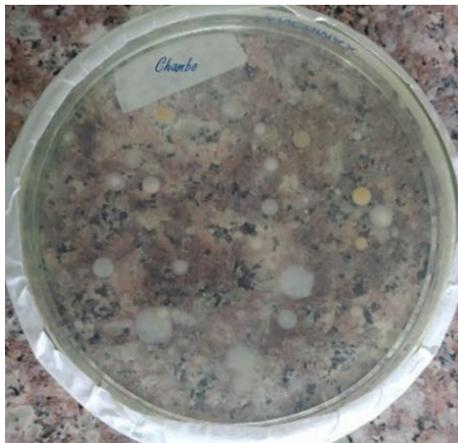


Ilustración 4-21: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo

Realizado por: Villagomez J., 2023

4.5.2 Caracterización morfológica de bacterias mediante la técnica de Tinción Gram.

Para identificar de manera general las bacterias que se encuentran presentes en los tres puntos de muestreo del río Chibunga, se realizó una caracterización morfológica de las cepas de los cultivos bacterianos mediante la técnica de Tinción Gram (Figura 17-4) así también se observó su forma, tamaño y color de las colonias formadas en las placas Petri.

Una vez realizado este procedimiento, con la ayuda de un microscopio binocular se logró identificar y clasificar de acuerdo a su morfología y a la tinción de su pared celular a dos grupos de bacterias que son bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos (Figura 18-4).

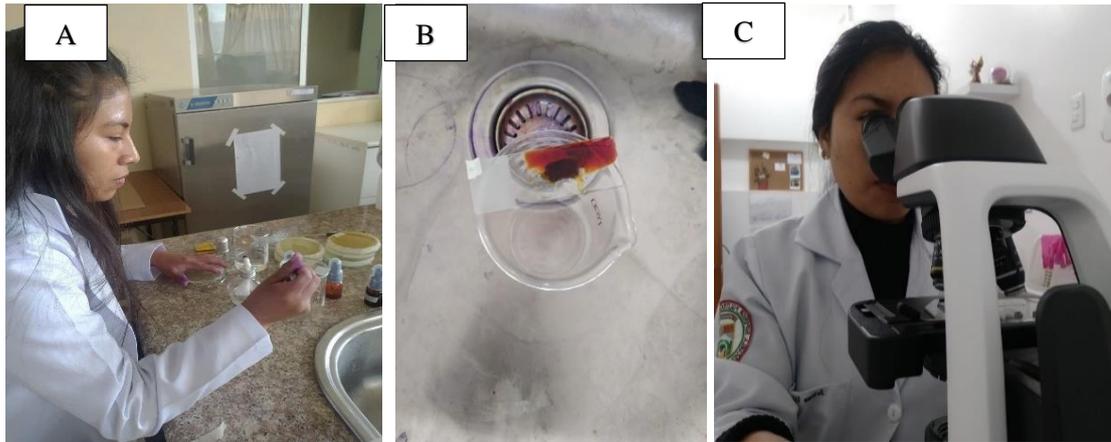


Ilustración 4-22: (A) Preparación de la placa; (B) Proceso de Tinción Gram (B); (C) Vista al microscopio binocular

Realizado por: Villagomez J., 2023

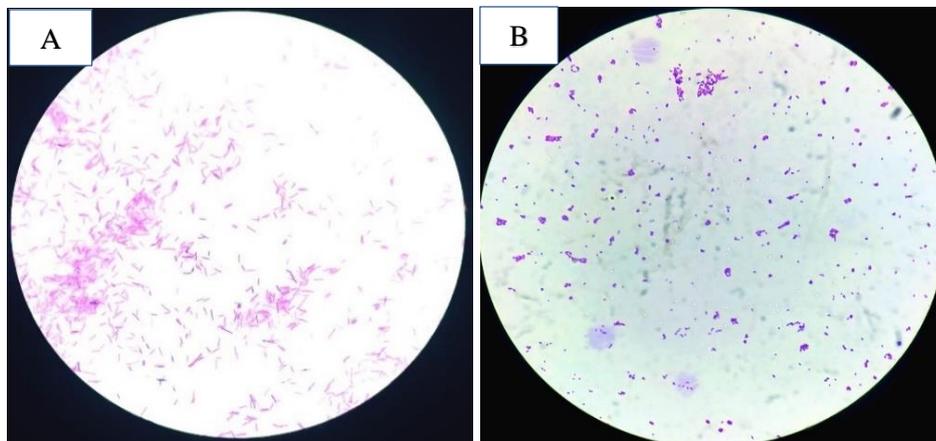


Ilustración 4-23: (A) Bacilos Gram Negativos, (B) Cocos Gram positivos lente de 100X

Realizado por: Villagomez J., 2023

Según Landa (2023, pp. 53-60), en el río Chibunga aloja 11 tipos de cepas bacterianas que son patógenas para el ser humano (Tabla 7-4) las cuales han mostrado tener ciertas resistencias a diferentes tipos de antibiótico. En el caso de las bacterias Gram negativas, el género de *Enterobacterias* han demostrado ser resistentes frente a la acción de la ampicilina; el género de *Aeromonas* son resistentes a la penicilina y amoxicilina; el género *Pseudomonas* son resistentes a la acción del ácido nalidixico y aztreonam. Mientras que, el grupo de cocos Gram positivos como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* han mostrado ser resistentes a medicamentos como penicilina, ampicilina, amoxicilina, gentamicina y vancomicina.

En base a su investigación, se puede deducir que las bacterias Gram positivas de morfología bacilar encontradas en nuestro trabajo experimental, corresponden a los mismos géneros bacterianos encontrados e identificados por Landa (2023), como son *Escherichia coli*, *Klebsiella*

pseudoniae, *Salmonella entérica*, *Salmonella paratyphi*, *Shigela flexnery*, *Proteus mirabilis* y *Edwardsiella tarda*, *Pseudomona aeruginosa* y *Aeromona hydrophilas*, mientras que las bacterias Gram positivas de morfología cocácea pertenecen a los géneros de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Tabla 4-7: Especies bacterianas presentes en las muestras de agua del río Chibunga

Puntos de muestreo	Colonias bacterianas	Familia bacteriana	Tinción Gram
Parque ecológico. Empresa Cemento Chimborazo.	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella entérica</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Shigela flexnery</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Edwardsiella tarda</i>	Enterobacteriaceae	Bacilos Gram negativos
Puente del cantón Chambo	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Pseudomonas	Cocos Gram positivos
	<i>Aeromona hydrophilas</i>	Aeromonas	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Streptococcaceae	

Fuente: Landa, 2023

Realizado por: Villagomez J., 2023

4.6 Pruebas microbiológicas

Las pruebas microbiológicas llevadas a cabo en este trabajo experimental, nos permitieron determinar la actividad bactericida que ejercen las nanopartículas de óxido de cobre sobre aquellas bacterias presentes en las muestras de agua del río Chibunga, mediante la observación directa de la disminución del número de colonias bacterianas mientras más tiempo estaban expuestas las muestras de agua a las nanopartículas de CuO y bajo la presencia de la luz solar.

Para evidenciar este hecho, a las muestras de agua diluidas se les añadió 0.05 g de nanopartículas de óxido de cobre y se las dejó por un periodo de tiempo de 1, 2 y 4 expuestas a la luz solar.

4.6.1 Determinación del número de colonias en Agar Nutritivo

4.6.1.1 Determinación del número de colonias bacterianas de las muestras de agua con nanopartículas de óxido de cobre cada 1, 2 y 4 horas expuestas a la luz solar.

Para poder determinar el número de colonias bacterianas formadas en agar Nutritivo, se realizó una siembra por extensión en superficie tomando 0.1 ml de muestra de agua añadida 0.05 g de nanopartículas de CuO después de ser expuestas a la luz solar en los tres periodos de tiempo

establecidos. Cabe mencionar que, el proceso de siembra y conteo de colonias se realizó por duplicado de cada una de las muestras de agua tomadas en los tres puntos de muestreo del río Chibunga y en las dos fechas diferentes. Al cabo de 48 horas de incubación a una temperatura de 37 °C, para las muestras de agua recolectadas se obtuvo los siguientes resultados que se detallan en la Tabla 8-4, Tabla 9-4 y Tabla 10-4.

Tabla 4-8: Recuento de colonias bacterianas sector Cemento Chimborazo

Cemento Chimborazo				
n	Tiempo (hrs)	# Colonias bacterianas	Promedio	UFC/ml
0	0	25	25	25×10^5
1	1h	2	3	3×10^5
2	1h	3		
3	2h	1	0	0
4	2h	0		
5	4h	0	0	0
6	4h	0		

Realizado por: Villagomez J., 2023

Tabla 4-9: Recuento de colonias bacterianas sector parque Ecológico

Parque Ecológico				
n	Tiempo (hrs)	# Colonias bacterianas	Promedio	UFC/ml
0	0	31	31	31×10^5
1	1h	9	9	9×10^5
2	1h	8		
3	2h	1	0	0
4	2h	0		
5	4h	0	0	0
6	4h	0		

Realizado por: Villagomez J., 2023

Tabla 4-10: Recuento de colonias bacterianas sector Puente del cantón Guano

Puente de Chambo				
n	Tiempo (hrs)	# Colonias bacterianas	Promedio	UFC/ml
0	0	27	27	27×10^5
1	1h	4	5	5×10^5
2	1h	5		
3	2h	1	0	0
4	2h	1		
5	4h	0	0	0
6	4h	0		

Realizado por: Villagomez J., 2023

A través de estos resultados obtenidos para las tres muestras recolectadas de los tres puntos de muestreo del río Chibunga, podemos deducir que existe una reducción considerable del número de colonias bacterianas formadas mientras más tiempo pasen las muestras de agua expuestas a las nanopartículas de óxido de cobre y a la luz solar dado a que, el caso de las muestras de agua tomadas del sector de la empresa Cemento Chimborazo de 25 colonias iniciales pasaron a 3 colonias en el transcurso de 1 hora y en un lapso de tiempo de 2 y 4 horas se disminuyó totalmente a cero (Tabla 8-4), mientras que para las muestras del sector del parque Ecológico de 31 colonias inicialmente formadas pasaron a 9 colonias en el transcurso de 1 hora y en un lapso de tiempo de 2 y 4 horas se disminuyó totalmente a 0 (Tabla 9-4), finalmente para las muestras tomadas del puente de entrada al cantón Chambo, de 27 colonias iniciales pasaron a 5 colonias en el transcurso de 1 hora y en un lapso de tiempo de 2 y 4 horas se disminuyó totalmente a cero (Tabla 10-4).

4.6.1.2 *Determinación del crecimiento bacteriano en agar nutritivo de las muestras de agua sin nanopartículas de óxido de cobre cada 1, 2 y 4 horas.*

Para determinar el número de colonias bacterianas formadas se llevó a cabo el mismo procedimiento anteriormente mencionado, sin embargo, en este caso no se añadió nanopartículas de CuO y después de 48 horas de incubación a 37°C, se procedió a contabilizar el número de colonias, obteniendo los resultados que se detalla en la Tabla 11-4.

Tabla 4-11: Recuento de colonias bacterianas sin nanopartículas de CuO

Punto de muestreo	n	Tiempo	# Colonias bacterianas	UFC/ml
Cemento Chimborazo	1	1h	27	27x10 ⁵
	2	2h	27	27x10 ⁵
	3	4h	27	27x10 ⁵
Parque Ecológico	4	1h	31	31x10 ⁵
	5	2h	31	31x10 ⁵
	6	4h	31	31x10 ⁵
Puente entrada al cantón Chambo	7	1h	25	25x10 ⁵
	8	2h	25	25x10 ⁵
	9	4h	25	25x10 ⁵

Realizado por: Villagomez J., 2023

A partir de estos resultados podemos confirmar que cuando no se aplican las nanopartículas de óxido de cobre a las muestras de agua y se exponen a la luz solar, no existe ninguna alteración o disminución del número de colonias formadas, puesto a que, de las tres muestras de agua de los tres puntos de muestreo, el número de colonias permanecía constante durante los tres periodos de tiempo.

4.6.1.3 *Determinación del número de colonias bacterianas formadas con y sin nanopartículas de óxido de cobre en estado puro.*

Para determinar si las nanopartículas de óxido de cobre en estado 100% puro presentan actividad bactericida frente a cepas bacterianas Gram positivas y Gram Negativas, se realizó una siembra por estría de 2 tipos cepas de bacterianas pertenecientes al grupo de bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos previamente aisladas e identificados mediante la tinción Gram.

Una vez que se realizó la siembra de cada tipo de bacteria sobre la superficie del agar nutritivo, se colocó en cada placa 0.1 g de CuONPs. Después de transcurrir 48 horas de incubación a 37°C se obtuvo los resultados que se muestra en la Tabla 6-4.

Tabla 4-12: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de CuO

Cepas	# Colonias formadas	
	Con CuONPs	Sin CuONPs
Bacilos Gram Negativos	0	8
Cocos Gram Positivos	0	5

Realizado por: Villagomez J., 2023

4.6.2 *Análisis del estudio estadístico experimental*

Para llevar a cabo el análisis del diseño experimental se empleó la Correlación de Pearson, el cual nos permitió determinar si existe correlación entre la variable independiente y la variable dependiente, es decir entre el tiempo de exposición de las muestras de agua con nanopartículas de óxido de cobre a la luz solar y el número de colonias bacterianas formadas en los tiempos establecidos.

De esta manera, a través del programa de Microsoft Excel se elaboró tres tablas correspondientes a los resultados obtenidos en la parte experimental de las tres muestras de agua de los tres puntos de muestreo y a partir de estos datos se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 4-13: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de CuO

Cemento Chimborazo		
n	Tiempo (hrs)	N° Colonias
1	0	25
2	1	3
3	2	0
4	4	0
Coef. Pearson (r)		-0.733

Realizado por: Villagomez J., 2023

Tabla 4-14: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de CuO

Parque Ecológico		
n	Tiempo (hrs)	N° Colonias
1	0	31
2	1	9
3	2	0
4	4	0
Coef. Pearson (r)		-0.808

Realizado por: Villagomez J., 2023

Tabla 4-15: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de CuO

Puente de entrada a Chambo		
n	Tiempo (hrs)	N° Colonias
1	0	27
2	1	5
3	2	0
4	4	0
Coef. Pearson (r)		-0.764

Realizado por: Villagomez J., 2023

Debido a que el coeficiente de correlación de Pearson en el caso de las muestras de agua tomadas de la empresa Cemento Chimborazo toma un valor de -0.733 (Tabla 13-4) y -0.764 para las muestras de agua del puente de entrada al cantón Chambo respectivamente (Tabla 14-4) se puede deducir que existe una correlación alta entre la variable dependiente e independiente, mientras que para las muestras tomadas del sector Parque Ecológico el coeficiente de Pearson calculado es de -0.808 se deduce que existe una correlación muy alta entre las variables.

Entonces, de acuerdo a estos resultados obtenidos, podemos afirmar que si existe una correlación entre la variable independiente (tiempo de exposición) y la variable dependiente (número de colonias bacterianas formadas), pero esta relación es inversamente proporcional dado a que mientras mayor tiempo pasen las muestras de agua expuestas a las nanopartículas y a la luz solar, menor es el número de colonias bacterianas formadas.

4.6.3 *Influencia de las variables*

4.6.3.1 *Evaluación de efecto bactericida de las nanopartículas de CuO frente a bacterias*

De acuerdo al análisis comparativo entre el número de colonias bacterianas de las muestras de agua tomadas del sector de la empresa Cemento Chimborazo reportadas en la Tabla 8-4 y la Tabla 11-4, podemos demostrar que existe una disminución considerable de la carga bacteriana mientras

más tiempo de exposición tengan las muestras de agua diluidas hacia las nanopartículas de CuO en presencia de la luz solar, mientras que, cuando no existe dicha exposición, la carga bacteriana no varía ni se altera en lo absoluto (Figura 19-4). Este hecho, acontece igualmente para las muestras tomadas en el sector del parque ecológico (Tabla 9-4 y Tabla 11-4) y del sector puente de entrada al cantón Chambo (Tabla 10-4 y Tabla 11-4).

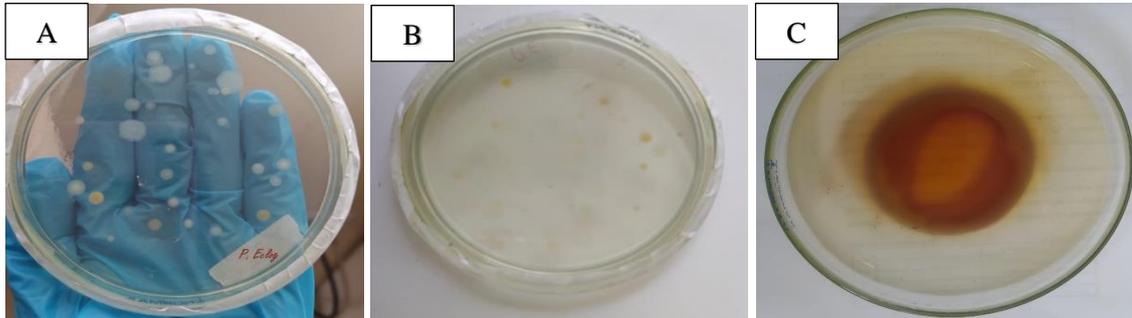


Ilustración 4-24: (A) Crecimiento bacteriano sin nanopartículas; (B) Disminución de colonias 1h de exposición; (C) Disminución total de la carga bacteriana

Realizado por: Villagomez J., 2023

Por otro lado, el análisis comparativo de la Tabla 12-4, demuestra claramente como la aplicación de forma directa y en estado 100% puro de nanopartículas de óxido de cobre inhibe completamente el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas, ya que en los medios de cultivo donde se colocó las nanopartículas al cabo de 48 horas de incubación no se evidenciaba crecimiento microbiano mientras que si hubo crecimiento en aquellas placas Petri que no contenían nanopartículas (Figura20-4).

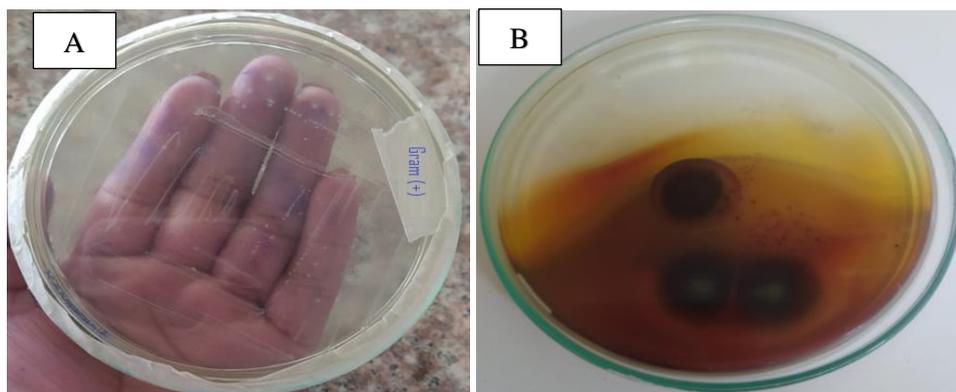


Ilustración 4-25: (A) Crecimiento de colonias Gram positivas sin NPs; (B) Placa con CuO NPs sin crecimiento

Realizado por: Villagomez J., 2023

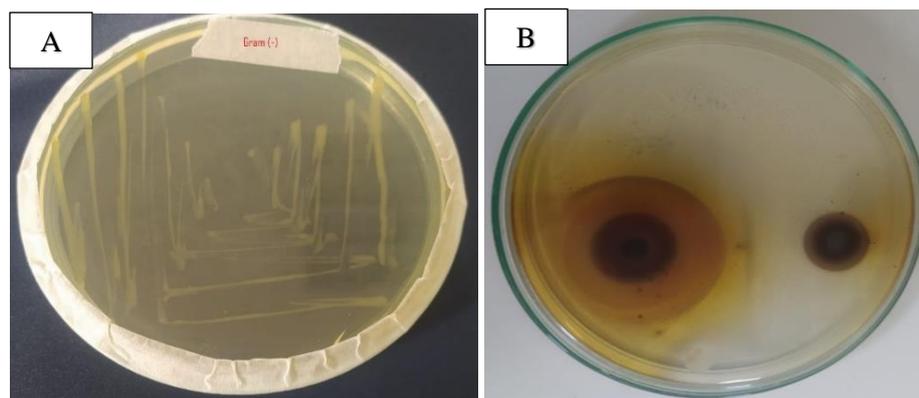


Ilustración 4-26: (A) Crecimiento de colonias Gram negativas sin NPs; (B) Placa con CuO NPs sin crecimiento

Realizado por: Villagomez J., 2023

A partir de estos resultados, podemos demostrar que las nanopartículas de óxido de cobre sintetizada a partir del extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* es un potencial bactericida contra bacilos Gram negativos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella entérica*, *Salmonella paratyphi*, *Shigela flexnery*, *Proteus mirabilis* y *Edwarsiella tarda*, *Pseudomona aeruginosa* y *Aeromona hydrophilas*, y también contra bacterias Gram positivas de morfología cocácea pertenecen a los géneros de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, cepas bacterianas que fueron encontrados e identificados por Landa (2023, p. 54), en las muestras de agua del río Chibunga.

Es importante considerar que, para las muestras de agua tomadas en el parque ecológico, la carga bacteriana es más alta en comparación de los otros dos puntos, esta característica según Toapanta (2022, p. 46), se debe a que a la altura del parque Ecológico el agua recibe constantemente la descarga de aguas residuales domésticas de la ciudad de Riobamba lo que provoca un incremento de la cantidad de coliformes fecales y por ende la disminución de su calidad.

Estos resultados son similares a los encontrados en el trabajo de investigación realizado por Adewale et al (2020: pp. 3-7), quien determino la actividad antibacteriana de las nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas a partir del extracto *Eucalyptus globulus* (eucalipto) contra cepas Gram positivas y Gram negativas mediante pruebas de inhibición bacteriana obteniendo como resultado que, no hubo un crecimiento por lo que dedujo las nanopartículas de óxido de cobre presentan un alto potencial bactericida contra bacterias Gram positivas (*Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigela spp*, *Shigela spp* y *Escherichia coli*). Además, este hecho de inhibición y su eficacia la relacionó con la capacidad que tienen las nanopartículas de producir especies reactivas

de oxígeno dentro de la célula, que generan un estrés oxidativo y posteriormente la muerte del microorganismo.

Igualmente, Letchumanan et al (2021, p. 9) determinó que las CuO NPs muestran un efecto supresor del crecimiento de bacterias Gram-negativas causantes de infecciones, como *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda*, *Klebsiella sp*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* y que también muestran un potencial efecto bactericida contra bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pyogenes*.

4.6.3.2 Evaluación del efecto del tiempo de exposición de las muestras de agua de río a las nanopartículas de CuO.

En base a los resultados que se encuentran en la Tabla 8-4 para las muestras de agua del sector de la empresa Cemento Chimborazo, el número de colonias bacterianas se redujo considerablemente de 25 a 3 al cabo de 1 hora, igualmente en las muestras tomadas en el parque ecológico paso de 31 colonias a 9 en 1 hora (Tabla 9-4) y para las muestras de agua del sector puente de entrada al cantón Chambo paso de 27 colonias a 5 en una hora (Tabla 10-4), mientras que al pasar 2 y 4 horas respectivamente en ninguna de las placas de las tres muestras se evidenciaba crecimiento microbiano. Por lo tanto, se puede concluir que el tiempo de contacto entre el agua y las nanopartículas de CuO es muy importante puesto a que mientras mayor sea este tiempo de exposición menor será el número de colonias bacterianas formadas. Este hecho se debe a que durante este periodo de tiempo de exposición las nanopartículas pueden ejercer su efecto bactericida contra bacterias gram positivas y gram negativas.

Estos resultados se relacionan con los encontrados por Salahuddin y Husen (2022, p.9), quienes encontraron que las nanopartículas de CuO obtenidas a partir de la goma *Karaya* presentan una mejor actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas mientras mayor tiempo de contacto exista entre las cepas bacterianas y las nanopartículas, esto se debe a que durante este lapso de tiempo los iones cobre de las nanopartículas pueden interactuar con los grupos amino y carboxilo de las proteínas presentes en la membrana celular para facilitar su ingreso a la célula y poder generar un daño oxidativo y posteriormente la muerte de las bacterias. Así también Vásquez et al (2018, p.31), dedujo que las nanopartículas de óxido de cobre durante el tiempo de contacto con las células bacterianas producen cuatro tipos de oxígeno reactivo, el O₂ y el H₂O₂ producen un estrés oxidativo que puede ser neutralizado por los antioxidantes endógenos presentes en la misma célula bacteriana como son las enzimas catalasa y superóxido,

por lo que es necesario que se genere dos especies más de oxígeno reactivo como el OH y el O₂ que causen efectos nocivos sobre estas células como son daño en su ADN, daño oxidativo que conlleven a la apoptosis y finalmente la muerte aguada de las bacterias.

4.6.3.3 Evaluación del efecto de la luz solar sobre las muestras de agua de río con nanopartículas de CuO.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la exposición de las muestras de agua de los tres puntos de muestreo a las nanopartículas en presencia de la luz solar durante 1, 2 y 4 horas (Tabla 8-4, Tabla 9-4 y Tabla 10-4) se puede evidenciar que, las nanopartículas de óxido de cobre en presencia de la luz solar activan su actividad fotocatalítica que hace que se disminuya considerablemente la carga bacteriana. Según Adewale et al (2020: pp. 3-7), durante el proceso de fotocatalisis las nanopartículas de óxido de cobre producen rápidamente especies reactivas de oxígeno generados por el CuO que son los radicales superóxido e hidroxilo los cuales son capaces de interactuar con la membrana de la célula bacteriana permitiendo así el ingreso de las nanopartículas intracelularmente que posteriormente provocaran disfunciones de la célula producto del estrés oxidativo de la célula bacteriana y conllevando la inhibición en el crecimiento bacteriano y su muerte.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- Las nanopartículas de óxido de cobre obtenida mediante una síntesis verde, es una alternativa sostenible para dar un tratamiento efectivo al agua del río Chibunga que aloja una gran cantidad de cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas resistentes a los antibióticos, pues la forma, tamaño, estabilidad y poder antibacteriano que muestran estas nanopartículas hacen que sean de interés científico para esta finalidad.
- El presente trabajo experimental demuestra que las mejores condiciones para sintetizar nanopartículas de óxido de cobre son empleando 50 ml de sulfato de cobre pentahidratado 0.05M y 20 ml de extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (*eucalipto*) cuyos grupos fenólicos actúan como agente reductor de los iones cobre y estabilizante de las nanopartículas. La importancia de emplear una baja concentración de la sal precursora se debe principalmente a que mientras más concentrada esté la sal, más cantidad de ella quedará sin reaccionar con los grupos funcionales del extracto, lo cual imposibilita la formación de las nanopartículas deseadas. Así también se ha observado que es necesario trabajar a una temperatura de 80°C para que se dé lugar a la síntesis. Por lo tanto, se concluye que tanto la concentración de la sal como la temperatura son factores determinantes para la formación de nanopartículas.
- El análisis realizado por espectroscopia UV-vis y espectroscopia de infrarrojo IR confirmaron que la síntesis de nanopartícula de óxido de cobre obtenidas mediante una síntesis verde fue efectiva, además, la forma que exhiben estas nanopartículas de acuerdo al análisis realizado mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM), fue ovalada, de bordes irregulares y superficie rugosa cuyo diámetro promedio se encuentra entre 23 y 39 nm, por lo tanto, dichas características únicas, hacen posible que las nanopartículas pueda actuar como un agente bactericida frente a cepas bacterianas Grampositivas y Gramnegativas.
- Se determinó que las nanopartículas de óxido de cobre sí presentan actividad bactericida frente a bacteriana Gram positivas y Gram negativas resistentes a antibióticos que se encuentran presentes en las muestras de agua del río Chibunga debido a que redujo considerablemente la carga bacteriana desde la primera hora en que las muestras de agua entraron en contacto con las nanopartículas. Este hecho se debe principalmente a que las nanopartículas forman especies reactivas de oxígeno a nivel intracelular conllevando a un estrés oxidativo y finalmente a la muerte de estos microorganismos.

RECOMENDACIONES

- Al momento de realizar la síntesis y obtención de nanopartículas de óxido de cobre mediante una ruta verde, se aconseja evaluar otros factores que influyan directamente sobre la síntesis como son: el pH, la concentración del extracto de la especie vegetal, la agitación magnética e incluso emplear otras sales precursoras de cobre de las cuales se pueda tener un mejor rendimiento.
- Durante la síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre se forman dos fases, una sólida y una líquida. En este trabajo experimental solo se consideró emplear la fase sólida para la caracterización de las CuONPs y para realizar las pruebas microbiológicas, se recomienda emplear también la fase líquida puesto a que en esta igualmente existe la presencia de nanopartículas en suspensión.
- Además de realizar un test de cloruro férrico para determinar la presencia de compuesto fenólicos se recomienda realizar un análisis fitoquímico de la especie vegetal *Eucalyptus globulus* (eucalipto) para determinar con certeza los grupos funcionales específicos que contienen y conocer específicamente cuales los que cumplen con la capacidad reductora y estabilizante de las nanopartículas.
- Se recomienda que durante la síntesis de las nanopartículas la solución obtenida luego la reacción química entre el extracto y la sal precursora sea centrifugada a 1500 rpm tal como lo hicieron otros autores y determinar si existe o no la formación de nanopartículas, ya que en los laboratorios de la institución no se cuenta con un equipo con este número de revoluciones.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, G., et al. (2018). Determinación de microorganismos en el aire de los laboratorios de microbiología de la Universidad Continental 2018. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad Continental, Facultad de Ciencias de la Salud. (Huancayo-Perú). 2018. pp. 7-64 [Consulta: 12 de octubre 2022]. Disponible en: https://repositorio.continental.edu.pe/bitstream/20.500.12394/7198/3/IV_FCS_508_TI_Acosta_Mejia_Zanabria_2018.pdf

ADEWALE AKINTELU, S., et al. "Green synthesis of copper oxide nanoparticles for biomedical application and environmental remediation". *Heliyon* [En línea], 2020, (United State of America) 6(1), pp. 45-62. [Consulta: 8 de diciembre 2022]. ISSN 2405-8440. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Downloads/1-s2.0-S2405844020313529-main.pdf>

AGUILAR, E., DELGADO, F., & MENDOZA, N. *Nanopartículas de origen natural*. [blog]. México. [Consulta: 14 de junio 2022]. Disponible en: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1635-nanoparticulas-de-origen-natural>

AL-FA OURI, A. et al. "Green synthesis of copper oxide nanoparticles using Bougainvillea leaves aqueous extract and antibacterial activity evaluation". *Chemistry International* [En línea], 2021, (Jordania) 7(3), pp. 155-162. [Consulta: 11 de agosto 2022]. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Desktop/ARTICULOS%20AJUSTE%20PH/NPS%20%20comparar.pdf>

ALHALILI, Z. "Green synthesis of copper oxide nanoparticles CuO NPs from Eucalyptus Globoulus leaf extract: Adsorption and design of experiments". *Arabian Journal of Chemistry* [En línea], 2022, (Arabia Saudita) 15(5), pp. 195-206. [Consulta: 18 de junio 2022]. ISSN 1878-5352. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Downloads/1-s2.0-S1878535222000557-main.pdf>

ÁLVAREZ CONSTANTE, Dayana Mishell. Evaluación de la factibilidad del uso de nanoparticulas de óxido de bismuto como bactericida en muestras de agua servidas en la comunidad San Vicente de Lacas, Provincia de Chimborazo. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Biotecnología Ambiental. (Riobamba-Ecuador). 2021. pp. 17-18 [Consulta: 12 de diciembre 2022]. Disponible en:

<https://ocw.unican.es/pluginfile.php/965/course/section/1090/Contaminacion%2520del%2520agua.pdf>

ARCINIEGA TENEMAZA, Andres Eduardo, Y SALAZAR CHCHA, Johana Patricia. Diseño de la planta de tratamiento de agua residual mediante lodos activados para la comunidad de Pesillo, parroquia Olmedo [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado). UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA, Quito, Ecuador. 2021. pp. 1-134. [Consulta: 20 de julio 2022]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19898/1/UPS%20-%20TTS292.pdf>

ATIAJA ESPIN, Diana Maribel., & RAMIREZ GUANO, Silvia Elizabeth. Resistencia antimicrobiana de bacterias patógenas presentes en el agua del río Chanchán. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ciencias de la Salud. (Riobamba-Ecuador). 2019. pp. 1-62 [Consulta: 27 de octubre -2022]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/6224/1/Resistencia%20antimicrobiana%20de%20bacterias%20pat%C3%B3genas%20presentes%20en%20el%20agua%20del%20r%C3%ADo%20Chanch%C3%A1n.%202019.pdf>

BALBOA LUNA, C., & VERGARA GONZÁLES, L. "Potencial aplicación de bacterias ácido lácticas en sistemas de tratamiento de agua". *Ecosistemas* [En línea], 2021, (Chile) 30(2), pp. 26-37. [Consulta: 10 de noviembre 2022]. ISSN 1697-2473. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Downloads/2224-Texto%20del%20art%C3%ADculo-10586-1-10-20210816.pdf>

BARRANTES MURILLO, C., & ORTEGA OVIEDO, G. "Nanopartículas y antibióticos: respuesta a la resistencia global bacteriana" *Revista Ciencia & Salud: Integrando Conocimientos* [En línea], 2020, (Costa Rica) 4(5), pp. 34-43. [Consulta: 8 de junio 2022]. ISSN 946-957. Disponible en: [file:///C:/Users/IDC/Downloads/moralesvju,+04_Articulo+NPs+\(Nanoparticulas+y+antibioticos\).pdf](file:///C:/Users/IDC/Downloads/moralesvju,+04_Articulo+NPs+(Nanoparticulas+y+antibioticos).pdf)

CAYCEDO LOZANO, L, et al. "Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química". *Nova* [En línea], 2021,(Colombia) 19(36), pp. 31-76. [Consulta: 17 de agosto 2022]. ISSN 1794-2470. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v19n36/1794-2470-nova-19-36-49.pdf>

CEDANO CUADROS, Norma Andrea. Evaluación de las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de cobre sintetizadas a partir de CuSO_4 y extracto de eucalipto. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad Nacional de San Agustín, Facultad de Ingeniería de Procesos, Escuela Profesional de Ingeniería de Materiales. (Arequípa-Perú). 2018. p. 7-49. [Consulta: 19 de octubre 2022]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/5725/MTcecuna.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

GONZÁLEZ, R., et al. *Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico* [En línea]. Zaragoza México: UNAM SEF. [Consulta: 20 de octubre 2022]. 2018. Disponible en: <https://www.zaragoza.unam.mx/wpcontent/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Tinciones.pdf>

CHELA TUALONBO, B. *Ecuador: El turbio recorrido del río Chibunga*. [blog]. Ecuador. [Consulta: 14 de septiembre 2010]. Disponible en: <https://www.servindi.org/actualidad-cronica-noticias-radioteca-audios/09/03/2020/de-las-aguas-cristalinas-del-chimborazo>

CHIRIBOGA SISALEMA, Indira Jackeline. Bacterias resistentes a antibióticos en estaciones depuradoras de agua residual. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares. (Madrid-España). 2019. pp. 1-57 [Consulta: 22 de noviembre 2022]. Disponible en: https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/41790/TFM_Chiriboga_Sisalema_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y

COLCHA CHAVARREA, Dennys Alexander. Estudio experimental de las propiedades físicas y espectroscopia de nanomateriales basados en grafeno. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. (Riobamba-Ecuador). 2021. pp. 1-56 [Consulta: 26 de noviembre 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/15058/1/86T00155.pdf>

FERNÁNDEZ, E., et al. "Resistencia antibiótica: el papel del hombre, los animales y el medio ambiente". *Salud Uninorte* [En línea], 2019, (Colombia) 36(1), pp. 298-324. [Consulta: 13 de junio 2022]. ISSN 0120-7531. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v36n1/2011-7531-sun-36-01-298.pdf>

GÓMEZ GARZÓN, Marcela. "Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde". *Repertorio de Medicina y Cirugía* [En línea], 2018, (Colombia) 27(2), p. 75-80. [Consulta: 10 de junio 2022]. ISSN 777-7780. Disponible en: <https://www.fucsalud.edu.co/sites/default/files/2018-08/Art-1.pdf>

GÓMEZ GARZÓN, M., et al. "Aplicaciones de la nanotecnología en el campo de la oftalmología: ¿dónde estamos?". *Revista Mexicana de oftalmología* [En línea], 2020, (México) 94(5), pp. 221-233. [Consulta: 17 de junio 2022]. ISSN 2604-1227. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmof/v94n5/0187-4519-rmo-94-5-221.pdf>

GRIJALVA ENDARA, A., JIMÉNEZ HEINERT, M., & PONCE SOLÓRZANO, H. "Contaminación del agua y aire por agentes químicos". *RECIMUNDO Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento* [En línea], 2020, Ecuador 4(4), pp. 79-93. [Consulta: 17 de junio 2022]. ISSN 2588-073x. Disponible en: <https://www.recimundo.com/index.php/es/issue/view/21/4>

GUARACA CHANGO, Nicole Alexandra. El eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y el COVID-19, barrio San Alfonso parroquia La Ecuatoriana, D.M. Quito, 2020 – 2021. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias. (Quito-Ecuador). 2022. pp. 1-257. [Consulta: 13 de diciembre 2022]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/25575/1/FIL-CPCEQB-GUARACA%20NICOLE.pdf>

IRIARTE MENDÍVIL, Rubén. Nuevas tendencias en sistemas de purificación del agua. [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Universidad Politécnica de Valencia. (Valencia-España). 2020. pp. 1-49 [Consulta: 10 de junio 2022]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/150093/Iriarte%20-%20Nuevas%20tendencias%20en%20sistemas%20de%20purificaci%C3%B3n%20de%20aguas.pdf?sequence=3>

KUKLINSKI, Claudia. *FARMACOGNOSIA estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural* [en línea]. Barcelona, España: OMEGA, 2000. [Consulta: 18 de diciembre 2022]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/280112637/100352432-Farmacognosia-C-Kuklinski-pdf#>

LETCHUMANAN, D., SOK S., IBRAHIM, S., & ARSHAD, N. "Plant-Based Biosynthesis of

Copper/Copper Oxide Nanoparticles: An Update on Their Applications in Biomedicine, Mechanisms, and Toxicity". *Biomolecules* [En línea], 2020, (Malasia) 1(1), pp. 10-37. [Consulta: 12 de junio 2022]. ISSN 1104-0564. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Downloads/biomolecules-11-00564.pdf>

LIZANA YARLEQUÉ, Pedro Ceferino. Tratamiento de aguas residuales para el caserío Villa Palambla. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad de Piura. (Piura-Perú). 2018. p. 66 [Consulta: 12 de octubre 2022]. Disponible en: https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/3636/ING_605.pdf?sequence=1&isAllowed=y

LÓPEZ MORA, Y., & GUTIÉRREZ ARENAS, D. "Síntesis de nanopartículas y su aplicación en la nutrición animal". *Agro productividad* [En línea], 2018, (México) 11(6), pp. 85-90. [Consulta: 11 de junio 2022]. Disponible en: file:///C:/Users/IDC/Downloads/valeria_sias,+Journal+editor,+con-14.pdf

LÓPEZ, J., et al. "Manual de instrucciones para la toma, preservación, y transporte de muestras de agua de consumo humano para análisis de laboratorio". *Salud Ambiental* (2019), (Colombia) p. 19.

MACIAS, Aida (ed.). *Microbiología y salud* [En línea]. Manabí-Ecuador: Editorial Area de Innovación y Desarrollo, S.L, 2019. [Consulta: 11 de agosto 2022]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=qSCODwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=bacterias+morfologia+y+mas++pdf&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwif8vHfs_X6AhUBSDABHTirBjwQ6AF6BAgMEAI#v=onepage&q&f=false

MADERA LÓPEZ, Daniela, & VILORIA SOTO, María Fernanda. Contaminantes emergentes en diferentes matrices de agua y tratamientos alternativos para su eliminación. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Básicas (Córdoba-España). 2020. pp. 1-110 [Consulta: 10 de agosto 2022]. Disponible en: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/3572/viloriasotomariafernanda-maderalopezdaniela.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

MARÍN GALVÍN, R. *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: Tratamiento y control de calidad de agua* [En línea]. 2ª ed. España: Díaz de Santos, 2019. [Consulta: 28 de septiembre 2022]. Disponible en:

https://books.google.com.ec/books?id=jmzWDwAAQBAJ&pg=PR13&dq=Fisicoqu%C3%ADmica+y+microbiolog%C3%ADa+de+los+medios+acu%C3%A1ticos:+Tratamiento+y+control+de+calidad+de+aguas&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj_gsSKo8j8AhWvSjABHVfjBYYQ6AF6BAGJEAI#v=onepage&q=Fisicoqu%C3%ADmica%20y%20microbiolog%C3%ADa%20de%20los%20medios%20acu%C3%A1ticos%3A%20Tratamiento%20y%20control%20de%20calidad%20de%20aguas&f=false

NTE INEN 2226:2013. Agua. Calidad del agua. Muestreo. Diseño de los programas de muestreo. [En línea], [Consulta: 19 de noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2226-1.pdf>

OMS. (2021). *Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS.* [blog]. México: Organización Mundial de la Salud, 2021. [Consulta: 14 de diciembre 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms#:~:text=Helicobacter%20pylori%2C%20Staphylococcus%20aureus%2C%20Streptococcus,riesgo%20la%20salud%20de%20la>

PALACIOS FARIAS, Silvia Elizabeth. Frecuencia de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aisladas del agua del río de Piura, Perú en un tramo de la ciudad. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad Nacional de Piura, Facultad de Ciencias. (Piura-Perú). 2019. pp. 1-93. [Consulta: 19 de agosto 2022]. Disponible en: <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/1957/CIE-PAL-FAR-2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

PARRALES LOOR, Ronald Daniel. Estudio de la calidad del agua mediante el uso de microinvertebrados bentónicos en el Río San Carlos, Jipijapa. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad Estatal del Sur de Manabí, Facultad de Ciencias. (Manabí-Ecuador). 2020. pp. 1-95. [Consulta: 21 de agosto 2022]. Disponible en: <http://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/2773/1/PARRALES%20LOOR%20RONALD%20DANIEL.pdf>

PÉREZ, M. *La pandemia silenciosa: resistencia bacteriana a los antibióticos* [En línea]. Madrid-España: CEU ediciones, 2021. [Consulta: 20 de agosto 2022]. Disponible en: https://repositorioinstitucional.ceu.es/bitstream/10637/13083/1/Pandemia_Perez_2021.pdf

PINZÓN TORRES, Rodrigo Alfonso. Análisis bacteriológico del agua de consumo humano en el corregimiento de Berlín (Samaná-Caldas). [En línea] (Trabajo de titulación) (Tesis posgrado). Universidad Pedagógica Nacional, Facultad de Ciencias y Tecnología. (Bogotá-Colombia). 2021. pp. 14-34. [Consulta: 14 de septiembre 2022]. Disponible en: <http://repository.pedagogica.edu.co/bitstream/handle/20.500.12209/13378/An%C3%A1lisis%20bacteriol%C3%B3gico%20del%20agua%20de%20consumo%20humano%20en%20el%20corregimiento%20de%20Berl%C3%ADn%20%28Saman%C3%A1%20Caldas%29.pdf?sequence=4&isAllowed=y>

PRADA, Juan; et al. *Criterios de calidad y gestión del agua potable* [En línea]. Madrid, España: Unidad Nacional de Educación a Distancia, 2019. [Consulta: 28 de agosto 2022]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=_bOWDwAAQBAJ&pg=PT209&dq=escherichia+coli+presente+en+agua++2019&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjI1d-doPb6AhVDTjABHbhaDx4Q6AF6BAgHEAI#v=onepage&q=escherichia%20coli%20presente%20en%20agua%20%202019&f=false

QAMAR, H., et al. "Green Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Copper Oxide Nanomaterial Derived from *Momordica charantia*". *International Journal of Nanomedicine* [En línea], 2020, (India) 1(15), pp. 2541-2553. [Consulta: 30 de diciembre 2022]. PMID 32368039 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7170629/>

SERRANO BERRÍOS, Carolina; & GUTIÉRREZ ILABACA, Rodrigo. *Manual de microbiología.*. Santiago-Chile: ediciones UC, 2018. ISBN 978-95614-2347-3. pp. 40-70.

RAMIS CIRUJEDA, Juan. *Aguas residuales urbanas* [En línea]. Madrid-España: Editorial Elearning, S.L, 2019. [Consulta: 18 de agosto 2022]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=wMfIDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=aguas+residuales&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=aguas%20residuales&f=false

RODRÍGUEZ, S, et al., "Presencia de indicadores microbiológicos en agua para consumo humano en San Cosme (Corrientes,Argentina)". *Revista veterinaria* [En línea], 2018, (Argentina) 29(1), pp. 9-12. [Consulta: 23 de diciembre 2022]. ISSN 1669-6840. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Downloads/2779-8642-2-PB.pdf>

RUIZ POSADAS, L., & SALAZAR AGUILAR, S. "La nanotecnología en la medicina". *Agro Productividad* [En línea], 2018, (México) 1(1), pp. 1-6. [Consulta: 16 de junio 2022]. ISSN 2493-

2027. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/249320275.pdf>

SALAHUDDIN SIDDIQI, Khwaja., & HUSEN, Azamal. "Current status of plant metabolite-based fabrication of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review". *Biomaterials Research* [En línea], 2020, (Etiopía) 24(2), pp. 135-149. [Consulta: 20 de septiembre 2022]. ISSN 2055-7124. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Desktop/ANTEPROYECTO%20EUCALIPTO/Estado%20actual%20de%20la%20fabricaci%C3%B3n%20basada%20en%20metabolitos%20vegetales%20de%20nanopart%C3%ADculas%20de%20cobre%20%C3%B3xido%20de%20cobre.pdf>

SALAZAR SERIÑA, José Manuel. Potencial de Transporte de Nanopartículas de Oxido de Cobre a Través de Matrices Granulares Representativas de Suelo. [En línea] (Trabajo de titulación) (Trabajo posgrado). Universidad IBEROAMERICANA. (Ciudad de Mexico-México). 2019. pp. 1-96. [Consulta: 01 de diciembre 2022]. Disponible en: <http://ri.ibero.mx/bitstream/handle/ibero/2387/016807s.pdf?sequence=1>

SALGADO, Pablo., MÁRTIRE, Daniel., & VIDAL, Gladys. "Eucalyptus extracts-mediated synthesis of metallic and metal oxide nanoparticles: current status and perspectives". *Materials Research Express* [En línea], 2019, (Chile) 6(8), pp. 17-37. [Consulta: 14 de diciembre 2022]. ISSN 2053-1591. Obtenido de <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/124353/Documento.pdf-PDFA.pdf?sequence=1>

SÁNCHEZ RAMIREZ, Lilia itzel. Nanopartículas Cu y CuO/Cu₂O mediadas por extracto de *Larrea tridentata* y su potencial en la remediación de agua y como antimicrobiano. [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. (Saltillo-México). 2021. pp. 35-78. [Consulta: 23 de noviembre 2022]. Disponible en: <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/3813/SSIT0016929.pdf?sequence=1>

TOAPANTA, Jhon. Evaluación de la calidad de agua en un tramo de la microcuenca del río Chibunga, utilizando macroinvertebrados acuáticos como bioindicadores e índice ICA-NSF. [En línea] (Trabajo de titulación) (Tesis posgrado). Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ciencias. (Riobamba-Ecuador). 2018. p.46. [Consulta: 10 de diciembre 2022]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/9009/1/Toapanta%20J%20%282022%29%20Tesis%20Evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20calidad%20de%20agua%20en%20un%20tramo%20de%20la%20microcuenca%20del%20Ri%C3%B3%20Chibunga%20utilizando%20macroinvertebrados%20acuaticos%20como%20bioindicadores%20e%20%C3%ADndice%20ICA%20%281%29.pdf>

TORRES LIMIÑANA, Jacqueline. Evaluación antimicrobiana de Ag-TiO₂ obtenido a partir de biosíntesis acoplada a microondas [En línea] (Trabajo de titulación) (Tesis posgrado). Universidad Autónoma de Querétaro. (Santiago de Querétaro-México). 2022. pp.39-40. [Consulta: 23 de enero 2023]. Disponible en: <http://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/3630/1/IGLIN-255065-0522-522-Jacqueline%20Torres%20Limi%C3%B1ana%20%20%20-A.pdf>

TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES. "Información Científica y Tecnológica para el Congreso de la Unión" INCyTU, n°28 (2019), (México) pp. 2-3.

VANEGAS MÚNERA, Johanna., & JIMÉNEZ QUICENO, Judy. "Resistencia antimicrobiana en el siglo xxi: ¿hacia una era postantibiótica?". *Rev. Fac.Salud Pública*, [En línea], 2020, (Colombia), 38(1), pp. 1-6. [Consulta: 21 de julio 2022]. ISSN e335-7759 Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v38n1/2256-3334-rfnsp-38-01-e337759.pdf>

VÁZQUEZ-OLMOS, América; VEGA-JIMENEZ, Alejandro., & PAZ-DIAZ, Blanca. "Mecanosíntesis y efecto antimicrobiano de óxidos metálicos nanoestructurados". *Mundo nano* [En línea], 2018, (México) 11(21), pp. 29-44. [Consulta: 11 de junio 2022]. ISSN 2448-5691. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/mn/v11n21/2448-5691-mn-11-21-29.pdf>

YANCHAPANTA TAMAQUIZA, Erika Pamela. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata como agente bactericida en aguas residuales. Riobamba. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. (Riobamba-Ecuador). 2022. p. 30. [Consulta: 10 de enero 2023]. Disponible en: [file:///C:/Users/IDC/Downloads/Trabajo%20de%20integracion%20Curricular_%20Yanchapanta%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/IDC/Downloads/Trabajo%20de%20integracion%20Curricular_%20Yanchapanta%20(1).pdf)



ANEXOS

ANEXO A: CÁLCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Se detalla la cantidad en gramos de la sal precursora empleada para preparar las disoluciones de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a las concentraciones estudiadas en cada experimentación.

- **0.5 M**

$$100 \text{ ml } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{0.5 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{\text{L sol}} * \frac{249.6 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} = \mathbf{12,48 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}$$

- **1 M**

$$100 \text{ ml } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{1 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{\text{L sol}} * \frac{249.6 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} = \mathbf{29,6 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}$$

- **1.5 M**

$$100 \text{ ml } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{1.5 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{\text{L sol}} * \frac{249.6 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} = \mathbf{37,44 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}$$

- **0.25 M**

$$100 \text{ ml } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{0.25 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{\text{L sol}} * \frac{249.6 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} = \mathbf{6,24 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}$$

- **0.025 M**

$$100 \text{ ml } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{0.025 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{\text{L sol}} * \frac{249.6 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} = \mathbf{0,624 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}$$

- **0.05 M**

$$100 \text{ ml } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{0.05 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{\text{L sol}} * \frac{249.6 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}} = \mathbf{1,249 \text{ g } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}$$

ANEXO B: RESULTADOS DE ESPECTROSCOPIA UV-VIS EXPERIMENTO 1

Thermo Scientific

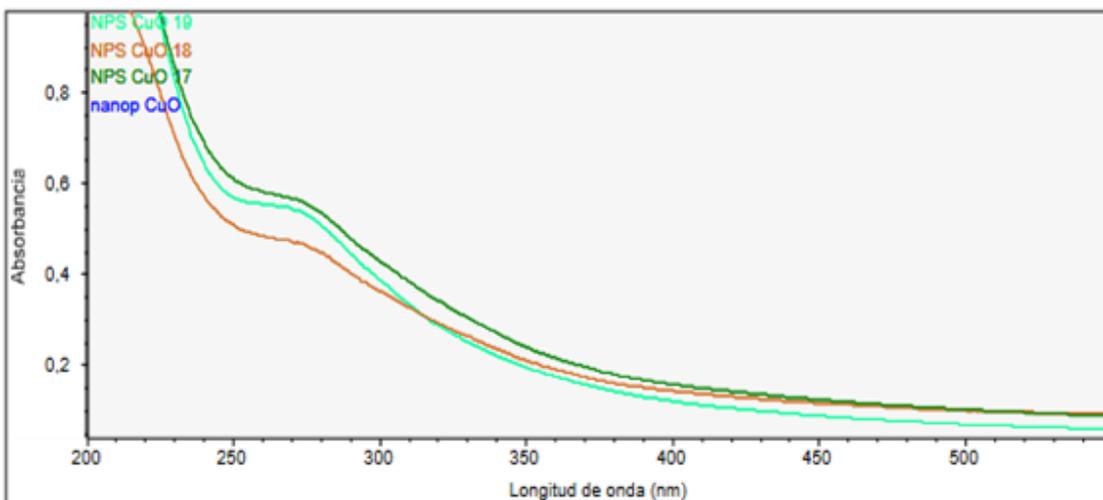
Información de configuración

Elemento	Valor
Archivo de libro	sin nombre
Accesorios	Accesorio: Detector estándar
Software	INSIGHT: 2.1.133
microprograma, software inalterable	3.0.0.109
Aplicación	Barrido - Barrido
Formato de datos	Absorbancia
Nivel de suavizado	Ninguno
Orden derivativo	Ninguno
Iniciar longitud de onda	700,00 nm
Detener longitud de onda	200,00 nm
Velocidad de barrido	1200,00 nm/min
Intervalo de datos	1,00 nm
Tiempo de integración	0,050 sec
Ancho de banda	1 nm
Corrección de línea base	100 %T
Tipo de resultados	Selección de picos

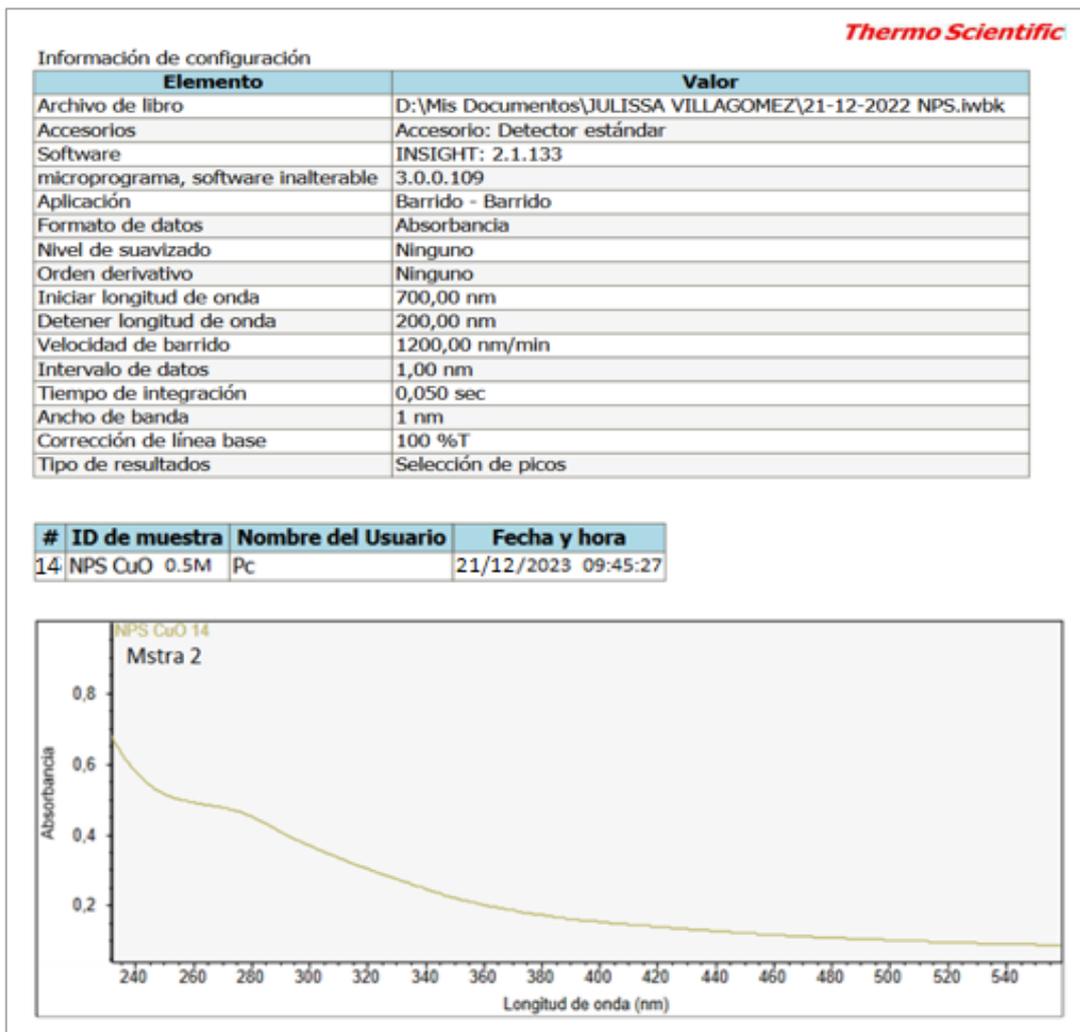
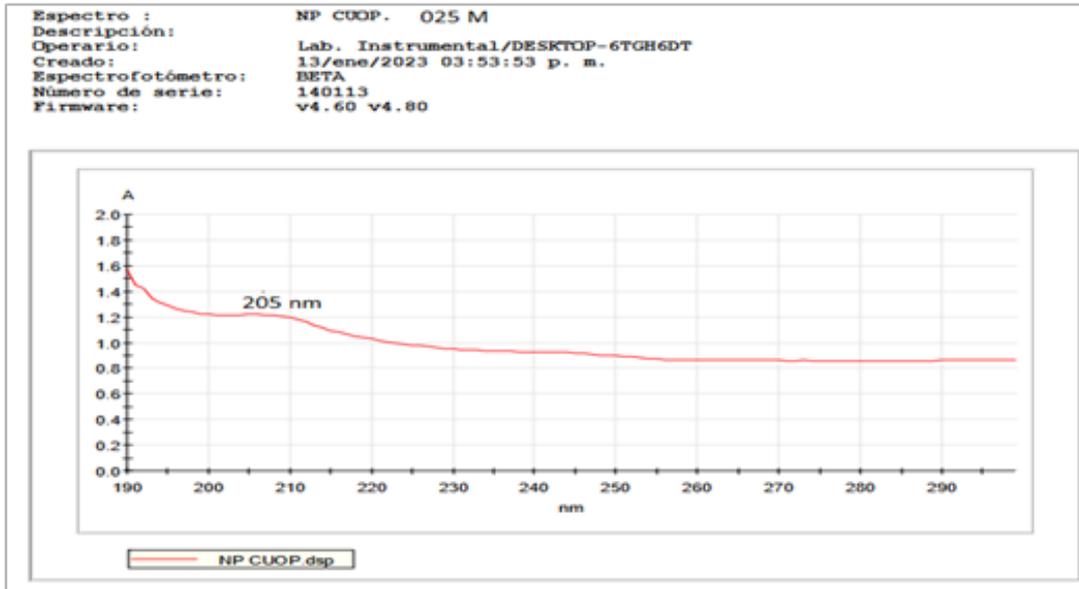
#	ID de muestra	Nombre del Usuario	Fecha y hora
18	NPS CuO 0.5M	Pc	22/11/2022 12:50:23

#	ID de muestra	Nombre del Usuario	Fecha y hora
19	NPS CuO 1M	Pc	22/11/2022 12:56:45

#	ID de muestra	Nombre del Usuario	Fecha y hora
20	NPS CuO 1.5M	Pc	22/11/2022 13:10:34



ANEXO C: RESULTADOS DE ESPECTROCOPIA UV-VIS EXPERIMENTO 2



ANEXO D: RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE AGUA DEL RIO CHIBUNGA.



Sector Parque Ecológico



Sector Empresa Cemento Chimborazo

ANEXO E: REPORTE URKUND



Document Information

Analyzed document	VILLAGOMEZ JULISSA SINTESIS CuONPs (1).pdf (D159249914)
Submitted	2/22/2023 3:45:00 PM
Submitted by	MISHELL MORENO
Submitter email	mishell.moreno@esPOCH.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	mishell.moreno.esPOCH@analysis.orkund.com

Sources included in the report

SA	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO / ErikaYanchapanta.pdf	 6
	Document ErikaYanchapanta.pdf (D130719653)	
	Submitted by: mishell.moreno@esPOCH.edu.ec Receiver: mishell.moreno.esPOCH@analysis.orkund.com	
SA	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO / DIANA LANDA.pdf	 2
	Document DIANA LANDA.pdf (D158171759)	
	Submitted by: mishell.moreno@esPOCH.edu.ec Receiver: mishell.moreno.esPOCH@analysis.orkund.com	

Entire Document



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 20 / 07 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: JULISSA MARÍA VILLAGOMEZ HERRERA
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: CIENCIAS
Carrera: BIOQUÍMICA Y FARMACIA
Título a optar: BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo



0867-DBRA-UPT-2023