



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

**SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE HIERRO A
PARTIR DE *Piper aduncum* (MATICO) PARA EVALUAR SU
ACTIVIDAD BACTERICIDA EN MUESTRAS DEL RÍO
CHIBUNGA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACEUTICA

AUTORA: PAMELA ALEXANDRA CAZCO MARIÑO

DIRECTORA: Bioq. Cl. MISHEL CAROLINA MORENO SAMANIEGO MSc

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Pamela Alexandra Cazco Mariño

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, Pamela Alexandra Cazco Mariño, 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, 30 de mayo del 2023



Pamela Alexandra Cazco Mariño
060490814-5

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 DE NANOPARTÍCULAS DE HIERRO A PARTIR DE *Piper aduncum* (MATICO) PARA EVALUAR SU ACTIVIDAD BACTERICIDA EN MUESTRAS DEL RÍO CHIBUNGA**, realizado por la señorita: **PAMELA ALEXANDRA CAZCO MARIÑO**, 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
Dra. Sandra Noemi Escobar Arrieta, PhD PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-05-30
Bq.Cl. Mishell Moreno Samaniego DIRECTOR(A) DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-05-30
Dra. Adriana Monserath Monge Moreno ASESOR(A) DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-05-30

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a Dios, por haberme permitido llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más. A mis padres, por ser el pilar más importante durante toda esta etapa y especialmente por haberme dado la vida, apoyo, educación, por demostrarme siempre su cariño y por haberme inculcado valores los mismos que me han permitido convertirme en lo que soy. También se lo dedico a mis tíos, maestros y amigos, quienes sin su ayuda nunca hubiera podido hacer esta tesis.

Pamela

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar un sincero agradecimiento en primer lugar a Dios, por brindarme salud, fortaleza y valor para cumplir mis metas anheladas, además su infinita bondad y amor, a mis padres y hermanos por haberme apoyado en todo momento, por sus sabios consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por su amor y confianza. De igual manera quiero agradecer de corazón a mi tutora de tesis Bq. Cl Mishell Moreno, quien desde el primer momento me brindó sus conocimientos y fue de gran apoyo durante este largo proceso. También quiero agradecer a mis amigos y demás familiares que contribuyeron con un granito de arena a la culminación de este trabajo de titulación.

Pamela

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	5
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	5

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Antecedentes de la investigación.....	6
2.2. Referencias teóricas	8
2.2.1. <i>Nanotecnología</i>	8
2.2.2. <i>Nanopartículas metálicas</i>	8
2.2.2.1. <i>Clasificación de nanopartículas</i>	9
2.2.3. <i>Nanopartículas: Forma y Tamaño</i>	9
2.2.4. <i>Importancia de las nanopartículas</i>	9
2.2.5. <i>Síntesis de nanopartículas</i>	10
2.2.6. <i>Nanopartículas de hierro</i>	11
2.2.6.1. <i>Propiedades antibacterianas de Nanopartículas de hierro</i>	11
2.2.7. <i>Síntesis verde</i>	12
2.2.7.1. <i>Síntesis de nanopartículas de hierro utilizando plantas</i>	13
2.2.7.2. <i>Extractos vegetales en síntesis de nanopartículas</i>	13
2.2.7.3. <i>Reducción de los iones metálicos mediante el uso de plantas</i>	14
2.2.8. <i>Piper aduncum (matico)</i>	15

2.2.9.	<i>Factores que afectan la síntesis de las nanopartículas</i>	16
2.2.9.1.	<i>Temperatura</i>	16
2.2.9.2.	<i>Tiempo</i>	16
2.2.9.3.	<i>Concentración del extracto vegetal</i>	17
2.2.9.4.	<i>pH</i>	17
2.2.10.	<i>Agua</i>	17
2.2.10.1.	<i>Importancia del agua</i>	18
2.2.11.	<i>Tipos de aguas</i>	18
2.2.11.1.	<i>Agua potable</i>	18
2.2.11.2.	<i>Agua dulce</i>	18
2.2.11.3.	<i>Agua salada</i>	18
2.2.11.4.	<i>Agua salobre</i>	19
2.2.11.5.	<i>Agua servida</i>	19
2.2.12.	<i>Agua de Río</i>	19
2.2.13.	<i>Río Chibunga</i>	20
2.2.14.	<i>Principales contaminantes del agua</i>	20
2.2.14.1.	<i>Agentes patógenos</i>	20
2.2.14.2.	<i>Agentes orgánicos</i>	20
2.2.14.3.	<i>Sustancias químicas orgánicas</i>	21
2.2.14.4.	<i>Sustancias químicas inorgánicas</i>	21
2.2.14.5.	<i>Nutrientes inorgánicos</i>	21
2.2.14.6.	<i>Contaminantes emergentes</i>	21
2.2.15.	<i>Aguas residuales</i>	22
2.2.15.1.	<i>Efectos contaminantes de aguas residuales</i>	22
2.2.15.2.	<i>Tratamiento de aguas residuales</i>	23
2.2.15.3.	<i>Métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales</i>	23
2.2.16.	<i>Tipo de muestreo de aguas corrientes</i>	24
2.2.16.1.	<i>Muestras puntuales</i>	24
2.2.16.2.	<i>Muestras compuestas</i>	25
2.2.17.	<i>Bacterias</i>	25
2.2.17.1.	<i>Bacterias más recurrentes en el agua</i>	25
2.2.18.	<i>Resistencia bacteriana</i>	26
2.2.18.1.	<i>Resistencia bacteriana natural o intrínseca</i>	26
2.2.18.2.	<i>Resistencia bacteriana adquirida</i>	26
2.2.19.	<i>Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a organismos patógenos</i>	27
2.2.19.1.	<i>Actividad antimicrobiana</i>	27

2.2.20.	<i>Bloqueo de los mecanismos de resistencia de los microorganismos</i>	28
2.2.21.	<i>Interferencia de la síntesis proteica</i>	28
2.2.22.	<i>Microorganismos y su clasificación</i>	29
2.2.23.	<i>Método de difusión en agar</i>	30
2.2.24.	<i>Resistencia bacteriana Principio de la prueba de difusión en agar</i>	30
2.2.25.	<i>Factores que influyen en la prueba de difusión en agar</i>	30
2.2.26.	<i>Métodos de caracterización de nanopartículas de hierro</i>	32
2.2.26.1.	<i>Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis)</i>	33
2.2.26.2.	<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	33

CAPITULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	34
3.1.	Descripción de los procesos	34
3.2.	Materiales, reactivos y equipos	34
3.3.	Alcance de la investigación	35
3.4.	Diseño de la investigación	35
3.4.1.	<i>Por el método de la investigación</i>	35
3.4.2.	<i>Según el objeto</i>	35
3.4.3.	<i>Según el nivel de profundización en el objeto de estudio</i>	36
3.4.4.	<i>Según la manipulación de variables</i>	36
3.4.5.	<i>Por la condición de estudio</i>	36
3.5.	Población de estudio	36
3.5.1.	<i>Selección de la muestra</i>	36
3.5.1.1.	<i>Muestreo</i>	36
3.6.	Lugar de investigación	37
3.7.	Diseño experimental	37
3.7.1.	<i>Según la manipulación de las variables</i>	37
3.8.	Diseño experimental	38
3.8.1.	<i>Cálculo del coeficiente de Correlación de Pearson en Microsoft Excel</i>	39
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.	Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	40
3.9.1.	<i>Síntesis de nanopartículas</i>	40
3.9.1.1.	<i>Obtención del extracto acuoso de Piper aduncum (Matico)</i>	41
3.9.1.2.	<i>Preparación de la solución de la sal precursora</i>	42

3.10.	Caracterización de nanopartículas de óxido de cobre	42
3.10.1.	<i>Técnicas de recolección de datos</i>	42
3.10.1.1.	<i>Espectroscopia UV- vis.....</i>	42
3.10.1.2.	<i>Microscopía electrónica de barrido.....</i>	43
3.10.2.	<i>Evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas de hierro.....</i>	43
3.10.2.1.	<i>Preparación del medio de cultivo (Agar nutritivo).....</i>	44
3.10.2.2.	<i>Preparación de diluciones de las muestras de agua.....</i>	44
3.10.2.3.	<i>Siembra en placas.....</i>	44
3.10.2.4.	<i>Siembra por extensión en placa.</i>	44
3.10.2.5.	<i>Siembra por estrías</i>	45
3.10.2.6.	<i>Identificación de bacterias mediante Tinción Gram.....</i>	45
3.10.2.7.	<i>Pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana</i>	45

CAPITULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	47
4.1.	Obtención del extracto acuoso de <i>Piper aduncum</i> (matico).....	47
4.1.1.	<i>Análisis del extracto acuoso de <i>Piper aduncum</i> (matico).....</i>	48
4.2.	Síntesis de nanopartículas de hierro.....	49
4.3.	Resultados de la caracterización de nanopartículas de hierro.....	50
4.4.	Resultados de la caracterización de nanopartículas de hierro.....	50
4.4.1.	<i>Espectroscopia Uv-vis</i>	50
4.4.2.	<i>Microscopía electrónica de barrido</i>	52
4.5.	Resultados de la actividad bactericida de las nanopartículas de hierro	52
4.5.1.	<i>Determinación del número de colonias formadas en Agar nutritivo.</i>	54
4.5.2.	<i>Caracterización morfológica de bacterias mediante la técnica de Tinción Gram.</i>	55
4.6.	Pruebas microbiológicas.....	57
4.6.1.	<i>Determinación del número de colonias en Agar Nutritivo.....</i>	57
4.6.1.1.	<i>Determinación del número de colonias bacterianas de las muestras de agua con nanopartículas de hierro cada 1, 3, 5 y 6 horas expuestas a la luz solar.</i>	57
4.6.1.2.	<i>Determinación del crecimiento bacteriano en agar nutritivo de las muestras de agua sin nanopartículas de hierro cada 1, 3, 5 y 6 horas.....</i>	58
4.6.1.3.	<i>Determinación del número de colonias bacterianas formadas con y sin nanopartículas de hierro en estado puro.</i>	59
4.6.2.	<i>Análisis del estudio estadístico experimental</i>	60
4.6.3.	<i>Influencia de las variables</i>	62

4.6.3.1.	<i>Evaluación de efecto bactericida de las nanopartículas de hierro frente a bacterias..</i>	62
4.6.3.2.	<i>Evaluación del efecto del tiempo de exposición de las muestras de agua de Río a las nanopartículas de hierro.....</i>	64
4.6.3.3.	<i>Evaluación del efecto de la luz solar sobre las muestras de agua de Río con nanopartículas de hierro.....</i>	64

CAPITULO V

CONCLUSIONES.....	65
--------------------------	-----------

RECOMENDACIONES.....	66
-----------------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1:	Materiales, reactivos y equipos.....	34
Tabla 3-2:	Recuento de colonias bacterianas sector Parque Ecológico (Punto 1).....	38
Tabla 3-3:	Recuento de colonias bacterianas sector Cemento Chimborazo (Punto 2).....	39
Tabla 4-1:	Especies bacterianas presentes en las muestras de agua del río Chibunga	56
Tabla 4-2:	Recuento de colonias bacterianas sector Puente del cantón Guano	57
Tabla 4-3:	Recuento de colonias bacterianas sector Cemento Chimborazo.....	58
Tabla 4-4:	Recuento de colonias bacterianas sin nanopartículas de hierro	59
Tabla 4-5:	Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de hierro	60
Tabla 4-6:	Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de hierro	60
Tabla 4-7:	Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de hierro	61
Tabla 4-8:	Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de hierro.	61

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1: Escala nanométrica donde se indica el tamaño de las nanopartículas.	8
Ilustración 2-2: Nanopartículas metálicas	10
Ilustración 2-3: Síntesis verde de nanopartículas.	13
Ilustración 2-4: Principales metabolitos vegetales: A - terpenoides (eugenol); B, C - flavonoides (luteolina, quercetina); D - una hexosa reductora con forma de cadena abierta; E, F – aminoácidos (triptófano (E) y tirosina (F))	15
Ilustración 2-5: Especie vegetal <i>Piper aduncum</i>	16
Ilustración 2-6: Métodos convencionales de aguas residuales	24
Ilustración 2-7: Bloque de mecanismos de resistencia de los microorganismos.....	28
Ilustración 2-8: Composición de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.	30
Ilustración 3-1: Puntos de toma de muestras de agua del río Chibunga.....	37
Ilustración 3-2: Cálculo coeficiente de correlación de Pearson Excel	39
Ilustración 3-3: Coeficiente de correlación de Pearson	40
Ilustración 3-4: Proceso para la obtención del extracto acuoso de <i>Piper aduncum</i> (Matico) ...	41
Ilustración 3-5: Proceso para la preparación de la solución de la sal precursora	42
Ilustración 4-1: Obtención del extracto acuoso	47
Ilustración 4-2: Extracto acuoso de <i>Piper aduncum</i> (matico).	48
Ilustración 4-3: Presencia de compuestos fenólicos: cambio de color de amarillo pálido a negro	49
Ilustración 4-4: Obtención nanopartículas de hierro	50
Ilustración 4-5: Espectro Uv-vis de nanopartículas de hierro de 1 nm.	51
Ilustración 4-6: Microscopia electrónica de barrido de nanopartículas de hierro a 300x y a 1000X.	52
Ilustración 4-7: Diluciones de las muestras de agua tomadas de cada punto Chibunga.....	53
Ilustración 4-8: Diluciones de las muestras de agua del río Chibunga.....	53
Ilustración 4-9: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo	54
Ilustración 4-10: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo	54
Ilustración 4-11: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo	55
Ilustración 4-12: (A) Preparación de la placa; (B) Proceso de Tinción Gram (B); (C) Vista al 55	
Ilustración 4-13: (A) Bacilos Gram Negativos, (B) Cocos Gram positivos lente de 100X.....	56
Ilustración 4-14: (A) Crecimiento bacteriano sin nanopartículas; (B) Disminución de colonias	62

Ilustración 4-15: (A) Crecimiento de colonias Gram positivas sin NPs; (B) Placa	63
Ilustración 4-16: (A) Crecimiento de colonias Gram negativas sin NPs; (B)	63

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** DILUCIONES DE LAS MUESTRAS DE AGUA TOMADAS EN LOS PUNTOS DIFERENTES DEL RÍO CHIBUNGA
- ANEXO B:** REALIZACIÓN DE LA TINCION GRAM
- ANEXO C:** VISTA AL MICROSCOPIO DE LAS COLONIAS BACTERIANAS PARA SU IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA
- ANEXO D:** SIEMBRA EN AGAR NUTRITIVO DENTRO DE LA CAMERA DE FLUJO
- ANEXO E:** IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS Y COCOS GRAM POSITIVOS
- ANEXO F:** REPORTE URKUND

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Fe:	Hierro
NPs:	Nanopartículas
Felpas:	Nanopartículas de hierro
FeCl₃:	Cloruro férrico
Nm	Nanómetro
UV-Vis:	Espectroscopía Ultravioleta Visible
SEM:	Microscopía de Barrido Electrónico
λ	Longitud de onda
UFC:	Unidades Formadoras de Colonias
H₂O:	Agua

RESUMEN

La síntesis de nanopartículas está siendo de gran relevancia dentro del campo de la biomedicina y presenta una variedad de aplicaciones, entre las que cabe destacar el empleo de nanopartículas para el tratamiento de agua, misma que en la actualidad es considerada una fuente de albergue de bacterias potencialmente patógenas que están adquiriendo resistencia a los antibióticos. El presente estudio tuvo como objetivo obtener nanopartículas de hierro mediante síntesis verde para así ser evaluadas como agentes bactericidas en muestras de agua del Río Chibunga. Las nanopartículas de hierro se sintetizaron utilizando un método rápido, de un solo paso y completamente ecológico que emplea extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum* (matico) como agente reductor y de protección. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Espectroscopia ultravioleta visible (Uv-vis). Como resultado se obtuvieron nanopartículas con un tamaño promedio entre 15 - 24 nm. En donde se compararon dos zonas de la muestra de las cuales se comprobó la presencia de nanopartículas de hierro en forma agregada ya que, a simple vista aparecen cúmulos blancos sobre la superficie de la muestra. De igual forma la actividad antimicrobiana de las nanopartículas se efectuó mediante pruebas de inhibición bacteriana en medios de cultivos sólidos (agar nutritivo), determinándose el crecimiento de las bacterias. Para el análisis del diseño experimental se empleó el coeficiente de correlación de Pearson con el fin de establecer si existe relación o no entre las variables tiempo y crecimiento. Se concluye que el extracto acuoso de la planta de matico, es un agente reductor adecuado para la síntesis de nanopartículas de hierro debido a su buena estabilidad en solución y a las longitudes de onda UV-Vis que presenta. Además, presentan una alternativa sostenible para el tratamiento de muestras de agua del Río Chibunga.

Palabras clave: <ANTIBIÓTICOS>, <TRATAMIENTO DE AGUA>, <SINTESIS VERDE>, <NANOPARTÍCULAS DE HIERRO (FeNPs)>, <AGENTE BACTERICIDA>, <BACTERIAS >, <EXTRACTO ACUOSO>, <RÍO CHIBUNGA>.

1468-DBRA-UPT-2023



ABSTRACT

The synthesis of nanoparticles is being of great relevance in the field of biomedicine and has a variety of applications, including the use of nanoparticles for water treatment, which is currently considered a source of harboring potentially pathogenic bacteria that are acquiring resistance to antibiotics. The present study had the objective of obtaining iron nanoparticles by green synthesis to be evaluated as bactericidal agents in water samples from Chibunga river. The iron nanoparticles were synthesized using a rapid, one-step and completely ecological method that employs aqueous extract of *Piper aduncum* (matíco) leaves as reducing and protective agent, the obtained nanoparticles were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Ultraviolet Visible Spectroscopy (UV- vis). As a result, nanoparticles with an average size between 15 - 24 nm were obtained. Two areas of the sample were compared and the presence of iron nanoparticles in aggregate form was verified, since, at first sight, white clusters appear on the surface of the sample. Similarly, the antimicrobial activity of the nanoparticles was done by means of bacterial inhibition pre-tests in solid culture media (nutrient agar), determining the growth of the bacteria. For the analysis of the experimental design, Pearson's correlation coefficient was used to establish whether or not there is a relationship between the variables time and growth. It is concluded that the aqueous extract of the matíco plant is a suitable reducing agent for the synthesis of iron nanoparticles due to its good stability in solution and the UV- Vis wavelengths it presents. In addition, they present a sustainable alternative for the treatment of water samples from the Chibunga river.

Keywords: <ANTIBIOTICS>, <WATER TREATMENT>, <GREEN SYNTHESIS>, <IRON NANOPARTICLES (FeNPs)>, <BACTERICIDE AGENT>, <BACTERIA>, <AQUEOUS EXTRACT>, <CHIBUNGA RIVER>.



Lic. Edgar Mesías Jaramillo Moyano

C.I. 0603497397

INTRODUCCIÓN

El agua es fundamental para la sostenibilidad de los ecosistemas, y por tanto es un requisito previo para la renovación de este recurso vital en los diversos procesos físicos y biológicos, tanto en la producción agrícola, animal, industrial y forestal, como en el uso y consumo humano (Azpilcueta et al., 2019: p.7).

Por esta razón, el agua de los ríos ha jugado un papel importante en el desarrollo de la sociedad humana porque, desde el punto de vista hidrológico, los ríos juegan un papel central en el ciclo global del agua entre la tierra, el aire y el mar; se acumulan junto con los acuíferos subterráneos, recogen la precipitación y lo lleva al mar. Este ciclo rejuvenece continuamente los suministros limitados de agua en los continentes sustentando así toda la vida en la tierra. Desde una perspectiva humana, los ríos son la principal fuente de agua para cocinar, beber, bañarse y en la agricultura en zonas donde las precipitaciones son insuficientes, para crear energía eléctrica y para producir todo tipo de artículos materiales (Motakef et al., 2019: p.2).

La contaminación del agua se ha transformado en un inconveniente peligroso. Se estima que casi el 40% de la población mundial no tiene acceso a servicios de saneamiento adecuados, los países en desarrollo son los más afectados vertiendo casi el 90% de sus aguas residuales sin ningún tipo de tratamiento en ríos, lagos y zonas costeras, contaminando sus fuentes de suministro (Brault et al., 2020: pp. 12-20).

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).

En la actualidad las nanopartículas metálicas han llamado la atención de la industria farmacéutica y médica, especialmente porque estos nanomateriales poseen interesantes propiedades antimicrobianas, puesto que las nanopartículas están contribuyendo al desarrollo y expansión de diversos campos de la vida humana (Rojas et al., 2020: p.15).

Las nanopartículas de hierro tienen una enorme escala de aplicaciones, las cuales dependen de su estabilidad, forma y tamaño. Su empleo se ve enfocado en áreas diferentes como el tratamiento del agua y productos de consumo a base de plata, medicina, bioingeniería, medicina, ingeniería textil, y la biotecnología. Tienen un efecto bactericida, bacteriostático y fungicida, demostrado contra patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella*. La morfología y el

tamaño son un aspecto esencial en cuanto a su actividad antibacteriana y se ha sugerido que este efecto aumenta cuando el tamaño de las nanopartículas es pequeño (Motakef et al., 2019: p.2).

Por otro lado, la actividad antibacteriana puede ser considerada como un tema de gran interés en el campo médico, siendo un punto clave para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan luchar contra diferentes patologías asociadas a la *Escherichia coli* y otras bacterias patógenas asociadas a enfermedades transmitidas por el consumo de agua como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Brault et al., 2020: pp.34-37).

El presente trabajo de investigación propone la obtención de nanopartículas de hierro mediante síntesis verde a partir de extracto acuoso de hojas de *Piper aduncum* (matico) puesto que, las hojas de matico son antioxidantes por los compuestos fenólicos que presentan, estos contribuyen al extracto a actuar como agente reductor natural (Brault et al., 2020: pp.34-37).

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

El agua contaminada por fuentes artificiales o naturales sigue generando problemas a quienes se ven obligados a utilizarla, tanto para el consumo como para la agricultura. El agua puede estar contaminada principalmente por productos químicos, minerales y bacterias potencialmente peligrosas, las mismas que han sido responsables de la resistencia a los antibióticos en los últimos años (Fernández, 2018, pp. 2-4).

El uso de antibióticos desde la década de 1940 ha llevado a una reducción drástica de la morbilidad y la mortalidad en todo el mundo. A pesar de ello, la aparición de resistencia a los antibióticos ha convertido el tratamiento de enfermedades infecciosas en una tarea compleja que requiere que los médicos brinden opciones de tratamiento racionales y basadas en evidencia para mejorar la salud de los pacientes (Gonzales et al., 2019: pp. 3-7).

El aumento de bacterias resistentes a los antibióticos en los ríos de Ecuador es un grave problema de salud. A esto se incluye el tratamiento ineficaz/inadecuado de las aguas residuales da como resultado que los desechos tratados de manera insuficiente se viertan en los ríos, donde las bacterias no patógenas pueden servir como reservorio de genes de resistencia (Ortega et al., 2019: pp. 9-11).

Hoy en día, los enormes avances en el área de la nanotecnología han permitido el crecimiento de nuevas técnicas de tratamiento de agua enfocados en sistemas de nanotecnología que son más resistentes al tratamiento de agua de forma natural y menos dañina, reduciendo así la cantidad de bacterias que presentan resistencia a los antibióticos. Es muy importante señalar que antes de que los contaminantes entren al ambiente natural, deben ser removidos o degradados (Ruiz et al., 2018: p. 1).

El Río Chibunga se origina en los manantiales ubicados en las faldas del Chimborazo y baja por los páramos de El Arenal hasta llegar a zonas agrícolas de la zona parroquial de San Juan, como Las Caleras y Shobol, entre otras. En un trabajo de investigación realizado por alumnos de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo indicaron que esta fuente de agua requiere de una intervención urgente. Metales pesados, hidrocarburos, aceites y grasas están por encima del nivel permisible, por lo que los indicadores muestran un alto nivel de contaminación. El río

Chibunga también recibe aguas servidas sin ningún tipo de tratamiento de los pueblos y ciudades que se encuentran a su alrededor (Iriarte, 2020, pp. 12-15).

Por esta razón, en el mundo están surgiendo problemas de contaminación ambiental que hacen necesaria la continua modernización de las técnicas de remediación y tratamiento de los recursos naturales.

La finalidad de este trabajo de investigación es evaluar la actividad bactericida de nanopartículas de hierro en muestras de agua tomadas del río Chibunga, y que en un futuro sirva de investigación con el fin de atenuar los escasos del agua.

1.2. Justificación

El hombre es el principal responsable de la contaminación del agua y del medio ambiente. Más del 80 % de las aguas residuales resultantes de la actividad humana se descargan en los ríos o en el mar sin ningún tipo de procedimiento en el agua, lo que genera su contaminación (Romero et al., 2019: pp.5-6).

Con el paso de los años, ha venido siendo de gran interés el tema y uso de nanopartículas metálicas debido a su amplia gama de aplicaciones que poseen, yendo desde aplicaciones biomédicas, diseño de ADN nanotecnológico, construcción de dispositivos electrónicos e incluso a la mitigación de problemas medioambientales (López et al., 2018: pp.4-6).

Por esta razón, son varias las investigaciones que han demostrado que las nanopartículas poseen dos propiedades exclusivas que las hacen particularmente atractivas como adsorbentes en el tratamiento del agua. Uno se basa en su masa, ya que tienen un área de superficie mucho mayor que las partículas más gruesas, y el otro es su capacidad para funcionalizarse con varios productos químicos, y con ello aumentar su afinidad por ciertos compuestos y desarrollar propiedades exclusivas como adsorbentes selectivos con alta capacidad para iones y aniones metálicos. Un ejemplo de ello son las nanopartículas de hierro, que han mostrado tener una actividad bactericida superior a los desinfectantes convencionales (Medina et al., 2019: pp.3-9). Por lo mencionado anteriormente, el propósito de este trabajo de investigación es evaluar la capacidad bactericida de las nanopartículas de hierro en muestras de agua de río. Para lograr este propósito, se sugiere realizar la síntesis de nanopartículas de hierro mediante una metodología verde que no contamine el medio ambiente.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Realizar la síntesis verde de nanopartículas de hierro a partir de hojas de Matico (*Piper aduncum*) para su posterior evaluación como agente bactericida en el tratamiento de muestras de agua del Río Chibunga.

1.3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de hojas de *Piper aduncum* (matico) y cloruro de hierro (FeCl_3).
- Caracterizar las nanopartículas de hierro empleando métodos de Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopía ultravioleta visible (Uv-vis).
- Evaluar la actividad bactericida antimicrobiana de nanopartículas de hierro mediante pruebas de inhibición bacteriana.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Actualmente, existen estudios enfocados en el uso de extractos de plantas para la obtención de nanopartículas y a la evaluación de la actividad antimicrobiana tanto de los extractos vegetales como de las nanopartículas obtenidas mediante síntesis verde.

En España en el año (2018) en la universidad de Barcelona se realizó el tema de tesis “Nanopartículas de hierro a bajas concentraciones han demostrado ser poco eficientes en su uso como bactericidas”. No obstante, a menor tamaño de partícula y mayor concentración, estas provocan una mejor inhibición del crecimiento del microorganismo. Por lo que, lo ideal es hacer una comparación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de hierro con una relación área superficial/masa de partícula similar, para determinar el efecto de la morfología entre el contacto de la célula y la partícula (Noriega et al., 2018: pp.2-15).

En Cuba en el año (2020), en la universidad de la Habana realizaron un estudio sobre los nanomateriales y sus aplicaciones en la remediación ambiental, en el que se comprobó que las nanopartículas de hierro conocidas como maghemita son muy útiles en procesos de remediación de aguas residuales debido a su constitución cero-valente, a su tamaño (1-100nm) en comparación con las células bacterianas que poseen diámetros de 1µm, que además pueden permanecer en suspensión por largos periodos de tiempo generando así una zona de tratamiento in situ(43), tomando como base estos compuestos se han generado una gran cantidad de nanomateriales con un sin número de aplicaciones. Sin embargo, también se determinó que las nanopartículas de hierro 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 (Heredia et al., 2020: pp.2-33).

En Colombia en el año (2019) en la Universidad EIA, realizaron un estudio sobre la “Capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de hierro que fueron obtenidas por el método de síntesis verde empleando el extracto de d-limoneo como agente reductor al cloruro de hierro III como sal

precursora. El análisis de la Capacidad antimicrobiana se realizó en *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella oxytoca* ATCC 700324, *Enterococcus casseliflavus* ATCC 700327, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Echeverry et al., 2020: p.8) ya que, la mayoría de los métodos de síntesis de nanopartículas superparamagnéticas descritos en la literatura están relacionados con la obtención de nanopartículas de magnetita, especialmente magnetita, para aplicaciones biomédicas (Vera, 2019, p.6).

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).

Finalmente, en Ecuador en el año (2018) en la universidad Espíritu Santo se realizó un estudio con el tema Síntesis de nanopartículas de plata a partir de un extracto vegetal *Petiveria Alliacea* L., el extracto vegetal se preparó a partir de las hojas de *Petiveria* y por medio de un ensayo fitoquímico” en donde se seleccionó el extracto con mayor presencia de metabolitos secundarios que puede reducir las sales metálicas para formar nanopartículas. La caracterización se realizó por espectrofotometría UV-VIS, que confirmó la presencia de nanomateriales con absorción en el rango de 380 a 480 nm, correspondientes a la resonancia de plasmones superficiales (AgNPs) con tamaños de partícula entre 15 y 34 nm. La adición de las AgNPs en la muestra de agua comprobó su efectividad en la disminución de los valores que estaban fuera de los límites permisibles. Se obtuvieron resultados favorables con un porcentaje de disminución de coliformes fecales del 95%, Nitritos 60%, Cobre 98.7% y Zinc 6.8% humano (Mollogón, 2018, pp.9-11).

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 metálicas

Las nanopartículas metálicas son el tipo de nanomateriales o nanoestructuras más utilizado porque están relativamente disponibles y su forma o tamaño se pueden controlar fácilmente según el tipo de estudio que se haga. Estas partículas son magnéticas o conductoras y se pueden usar en varios campos, como biomarcadores, fungicidas, células solares y más. Las primeras nanopartículas metálicas utilizadas fueron las nanopartículas de oro y plata, que se utilizaron por primera vez en la formación de vidrio (López et al., 2019: p.12).

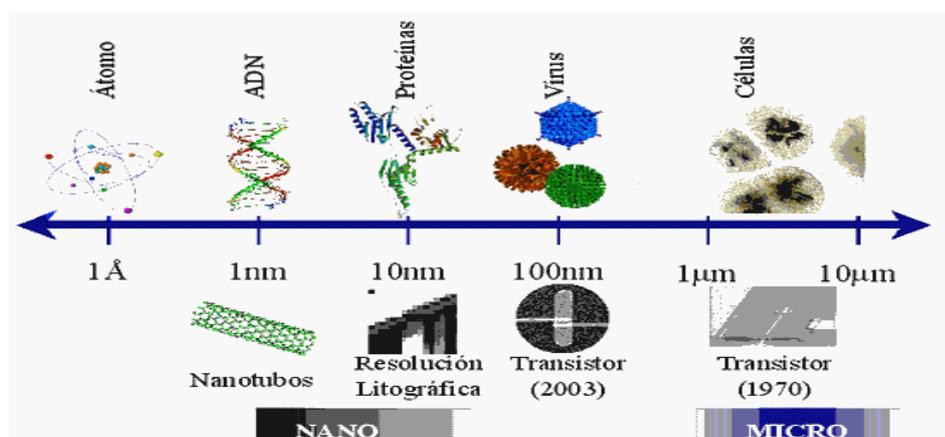


Ilustración 2-1: Escala nanométrica donde se indica el tamaño de las nanopartículas.

Fuente: (López et al., 2021: p. 1).

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 antimicrobiana, 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: Forma y Tamaño

La relación superficie-volumen es muy importante a nanoescala, ya que la mayoría de las interacciones ocurren en las superficies. Las nanopartículas tienen una alta relación superficie-volumen y, por lo tanto, una mayor superficie de contacto con el medio ambiente, que aumenta al disminuir el tamaño de las nanopartículas. Esta área de contacto más grande da como resultado sitios más activos y una mayor energía superficial. Debido a que necesitan aceptar electrones con facilidad, tienen una alta capacidad antimicrobiana porque las nanopartículas son más sensibles al oxígeno (Reyes, 2020, pp.19-21).

2.2.4. Importancia de las nanopartículas

La importancia de las nanopartículas metálicas reside en sus ventajas que tienen a nanoescala frente a otros materiales a macroescala. Su relación superficie-volumen es una de sus mayores ventajas, ya que las moléculas pueden cargarse, activarse y absorberse fácilmente debido a su tamaño. Las nanopartículas metálicas son materiales robustos, flexibles, cristalinos y más ligeros que los materiales a granel, y son menos peligrosos para la salud y el medio ambiente (Medina et al., 2019: pp.3-9).

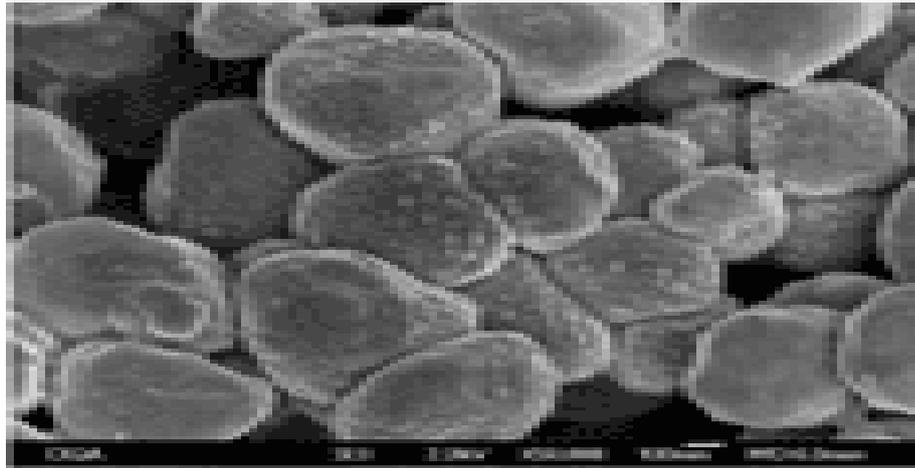


Ilustración 2-2: Nanopartículas metálicas

Fuente: Aguilar, 2019

2.2.5. Síntesis de nanopartículas

Existen diferentes métodos para producir nanopartículas; y la elección de cualquiera de ellos depende de los objetivos y las condiciones específicas dónde y cómo se utilizarán las nanopartículas obtenidas, por lo que se debe tener en cuenta la estabilidad física y química de la sustancia activa, su toxicidad, perfil de liberación y muchas consideraciones. Los métodos de síntesis de nanopartículas se dividen generalmente en dos categorías: top-down (top-down) y bottom-up (López et al., 2018: pp.4-6).

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 toxica, por lo tanto, esta técnica de síntesis puede remplazar 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 mas tiempo y sin cambiar sus propiedades (Salahuddin y Husen. 2020: p. 2).

2.2.6. *Nanopartículas de hierro*

Con el paso de los años, las nanopartículas de hierro (FeNPs) han llamado la atención de los científicos debido a sus excelentes propiedades físico-químicas para aplicaciones dinámicas en diversos campos. Dado que los procesos físicos y químicos son altos y potencialmente dañinos para los seres vivos y el entorno natural, los métodos biosintéticos son prometedores y desempeñan un papel importante en la nanotecnología. Se pueden utilizar microorganismos como hongos y células vegetales para disminuir los iones metálicos a nanopartículas de metales neutros. El tamaño, la forma, la estabilidad y el rendimiento de las nanopartículas biosintetizadas son apropiadas para la remediación del medio ambiental (Letchumanan et al., 2021: p.13).

La importancia de las nanopartículas de hierro está relacionada con sus propiedades físicas, químicas y biológicas. La reacción bioquímica, la actividad catalítica y el comportamiento atómico de las macropartículas se deben a su superficie.

Las nanopartículas de hierro (FeNPs) suelen tener las siguientes formas (Torres, 2018, p.36):

- **Nanopartículas de hierro cero-valente (Fe⁰):** Las cuales exhiben típicamente una morfología núcleo- recubrimiento, donde el núcleo está compuesto de hierro metálico, y el recubrimiento se conforma de óxido de hierro (Torres, 2018, p. 36).
- **Nanopartículas de óxidos de hierro:** Las cuales contienen un núcleo de óxido de hierro de uno o más cristales incrustados y el recubrimiento. El núcleo consiste en maghemita (Fe₂O₃) y magnetita (Fe₃O₄). La maghemita es la forma cúbica ferrimagnética del óxido de hierro III, y difiere de la estructura de espín inversa de la; presentan actividades catalíticas, antioxidantes y bacterianas, buena estabilidad y biocompatibilidad. Se utilizan para numerosas aplicaciones biomédicas, como agentes terapéuticos y de diagnóstico o administración de fármacos (Torres, 2018, p. 36).

2.2.6.1. *Propiedades antibacterianas de Nanopartículas de hierro*

La acción antibacteriana de las nanopartículas está vinculada a la especie del material y a ciertas características intrínsecas de las mismas, como sus dimensiones manométricas y la alta semejanza área/volumen que permite un mayor contacto e interacción con dichos microorganismos (Galeas et al, 2019, pp. 6-7).

Las nanopartículas de hierro tienen una gran potencia bactericida a comparación del óxido hierro, y esta actividad bacteriana se puede mejorar combinándose con polímeros como quitosano y polisacárido catiónico (López et al., 2019: pp. 4-6).

En términos generales, el tamaño, la forma, la carga superficial, la funcionalización y la estructura del núcleo son factores importantes que determinan los efectos biológicos de las nanopartículas, como la captación celular, la activación celular y la distribución intercelular. Diversos autores descubrieron que el aumentar el tamaño de las nanopartículas el efecto antibacteriano disminuía. El efecto antibacteriano de las nanopartículas de hierro depende del tamaño de la nanopartícula y el contenido de hierro (Galeas et al., 2019, pp. 6-7).

Las nanopartículas de hierro han ganado utilidad por sus propiedades únicas, tales como estabilidad química, buena conductividad, actividad antibacteriana, mostrando un amplio efecto biosida frente a microorganismos a través del deterioro de su membrana unicelular perturbando así sus actividades enzimáticas. A diferencia de los pigmentos metálicos las nanopartículas metálicas no son perjudiciales para la salud (Letchumanan et al., 2021, p. 9).

2.2.7. Síntesis verde

La síntesis verde se basa en una síntesis amigable con el ecosistema, utilizando agentes reductores de terminación ecológica como plantas, hongos, levaduras, bacterias, etc., los cuales reaccionan con material metálico para la obtención de nanopartículas, teniendo una gran ventaja sobre los anteriores métodos evitando solventes orgánicos y agentes tóxicos además de que pueden permanecer estables durante largos periodos de tiempo (Espinosa y García, 2021: pp. 150-165).

Las nanopartículas formadas por medio de síntesis verde se pueden dividir en dos grupos: Nanopartículas no metálicas y metálicas.

La síntesis “verde” de nanopartículas pretende combinar las propiedades del elemento, con las cualidades curativas que brindan las plantas. Por ejemplo, se puede emplear la planta de Matico por sus propiedades cicatrizantes, antibacterianas y microbiológicas, las cuales pueden combinarse con la acción bactericida de las nanopartículas de hierro, producirá un efecto sinérgico antimicrobiano (Espinosa y García, 2021: pp. 150-165).



Ilustración 2-3: Síntesis verde de nanopartículas.

Fuente: (Alhalili, 2022, p. 8).

2.2.7.1. Síntesis de nanopartículas de hierro utilizando plantas

Según diversas fuentes la síntesis verde utilizando plantas y extractos de plantas parece ser más rápida que la de otros microorganismos, como bacterias y hongos.

En la síntesis de nanopartículas de hierro el extracto de la planta actúa como reductor y estabilizante, factor importante en la reacción. Siendo los campos bioactivos los que permiten la reducción de la sal metálica permitiendo la formación de las nanopartículas de forma que no afecta al medio ambiente por no usar químicos agresivos (Gómez, 2018, p. 4).

2.2.7.2. Extractos vegetales en síntesis de nanopartículas

En la actualidad, existe una gran cantidad de antecedentes relacionados con el uso de extractos de raíces, hojas y tallos de plantas. Los compuestos bioactivos presentes en el extracto permiten la reducción de iones metálicos en átomos, dando núcleos que son los que proporcionan una base para la elaboración de nanomateriales (Zulfiqar et al., 2019: pp. 15-18).

Un estudio realizado en el 2016 demostró que la conversión de iones de hierro en nanopartículas y la distribución de tamaño dependía totalmente de la concentración de lignina (agente reductor y de remate), además diversos informes indican que la presencia de grupos funcionales activos tales como el azúcar y los ácidos fenólicos son los responsables de la reducción de los iones metálicos Usar extractos de plantas como agentes reductores propone una vía rápida para la preparación de nanopartículas, además del aprovechamiento de sus propiedades. La obtención del extracto alto en poder antioxidante como polifenoles, azúcares reducidos y aminoácidos permiten la reducción de cationes en la solución metálica (Sixiao et al., 2018: pp. 37-40).

El extracto vegetal es el agente reductor y estabilizador mientras que la sal metálica es el agente precursor de la reacción. El extracto vegetal, su naturaleza y concentración; concentración de la solución metálica, tiempo de reacción, pH, temperatura son algunas de las variables de operación que determinan la morfología, cantidad y otras características de las nanopartículas (Zulfiqar et al., 2019: pp. 15-18).

2.2.7.3. *Reducción de los iones metálicos mediante el uso de plantas*

En las raíces, tallos, flores y frutos por lo general se encuentran propiedades antioxidantes, las mismas que permiten la reducción de cationes a partir del empleo de sales metálicas a lo que llamamos síntesis verde. Esta síntesis permite el control en cuanto a la forma, tamaño de las nanopartículas sin el empleo de estabilizadores (Guerrero et al., 2017: pp. 25-40). Entre varios de los metabolitos presentes en los extractos destacan los alcaloides, polifenoles, terpenoides, ácidos fenólicos, azúcares y proteínas. Según investigaciones realizadas se ha reportado que los terpenoides, polímeros orgánicos que se encuentran en plantas que tienen una fuerte actividad antioxidante, están asociados con nanopartículas, también se descubrió que el eugenol, un terpenoide, desempeña un papel importante en la formación de nanopartículas de plata. Debido a la disociación de los grupos OH del eugenol, la resonancia permite una mayor oxidación al reducir los iones metálicos y formar así nanomateriales. Otro metabolito que se reduce fácilmente a iones metálicos son los flavonoides, que contienen varios compuestos fenólicos como antocianinas, flavonoles y flavonoides. También está relacionado con los grupos funcionales.

La síntesis de nanopartículas metálicas a partir de extractos vegetales consta de tres fases:

1. La fase de activación en la que se reducen los iones metálicos.
2. Crecimiento en el que las pequeñas nanopartículas recién formadas se unen espontáneamente en partículas más grandes, conocido como maduración de Ostwald. Además, aumenta la estabilidad termodinámica de las nanopartículas.
3. La etapa de acabado determina la forma final de las nanopartículas (Valdés et al., 2019: pp. 50-65).

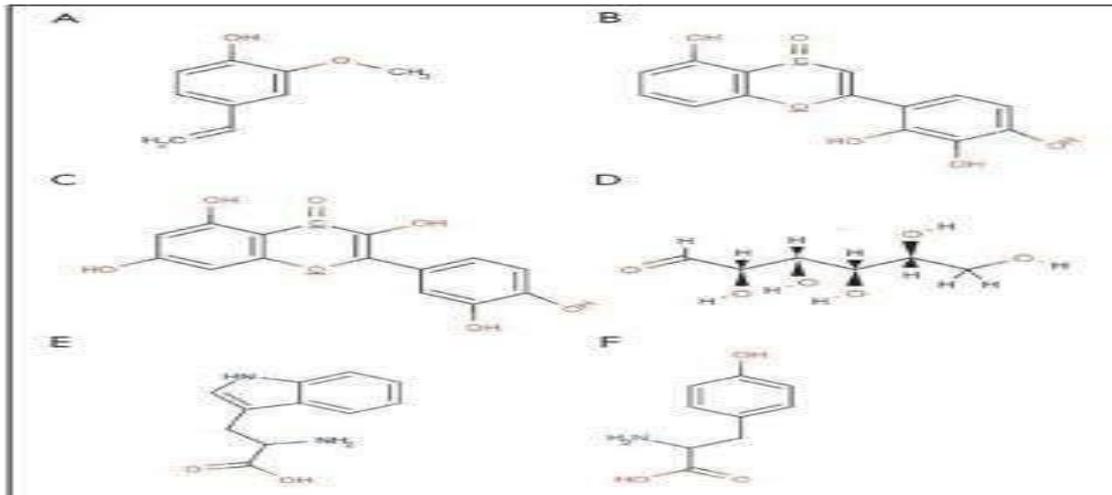


Ilustración 2-4: Principales metabolitos vegetales: A - terpenoides (eugenol); B, C - flavonoides (luteolina, quercetina); D - una hexosa reductora con forma de cadena abierta; E, F – aminoácidos (triptófano (E) y tirosina (F))

Fuente: (Valdés et al., 2019: pp. 50-65)

2.2.8. *Piper aduncum* (matico)

La planta de Matico (*Piper aduncum*), es conocida también como hierba de soldado o chuzalongo, es un arbusto perenne que puede alcanzar de 1 a 4 m de altura, familia de la pimienta. Tiene ramas grises y hojas aromáticas de color verde brillante, su fruto es de color negro y posee una semilla pequeña, oscura en su interior. Se distribuye en toda la cuenca amazónica, Perú, Brasil, Colombia, Paraguay, Bolivia y Ecuador. En Ecuador crece en la región interandina, entre 3000 y 3700 msn. Además, se lo puede encontrar en la orilla de los caminos y en la cordillera cerca de los matorrales (Santorum, 2019: pp. 25- 26).

Presenta propiedades cicatrizantes, antibacterianas y antiinflamatorias debido a los principios activos que posee en sus hojas y ramas: aceites esenciales, ácido tánico, resinas, sustancias amargas (maticina), taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides y triterpenoides. El principal componente cicatrizante del Matico es un tanino denominado proantocianidina, el cual se encuentra en un 5.7% en las hojas de la planta. Es por esto que el Matico es muy empleado en heridas, quemaduras, inflamaciones, así como otras condiciones, y cuando se encuentra en contacto con heridas o llagas recientes, detiene y reduce los derrames sanguíneos y ayuda a la cicatrización (Santorum, 2019: pp. 25-26).



Ilustración 2-5: Especie vegetal *Piper aduncum*.

Fuente: (Mauillefert, 2022, p. 8).

2.2.9. Factores que afectan la síntesis de las nanopartículas

Dentro de los factores que influyen principalmente durante el proceso de la síntesis de nanopartículas podemos encontrar a la temperatura, Ph, tiempo, concentración tanto del extracto como de la sal precursora y naturaleza de la planta, es decir todos estos factores van a ser determinantes para conseguir las nanopartículas es por esto que es muy importante mantener controlados estos parámetros, de esta manera conseguir las nanopartículas con el tamaño y la forma exacta (Salahuddin y Husen. 2020: p. 2).

2.2.9.1. 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).

2.2.9.2. 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).

2.2.9.3. 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)

2.2.9.4. 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 acididad 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 hierro 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).

2.2.10. Agua

El agua cubre más del 70 % de la superficie del planeta; se la encuentra en océanos, lagos, ríos, en el aire, y en el suelo. Es la fuente y el sustento de la vida, contribuye a regular el clima del mundo y con su fuerza formidable modela la Tierra. Posee propiedades únicas que la hacen esencial para la vida. El agua es usada por el ser humano para su desarrollo, consumo doméstico y para realizar actividades agrícolas e industriales (Fernández, 2012, pp. 2-3).

2.2.10.1. Importancia del agua

Cabe mencionar que, los seres humanos sin agua no podrían vivir, motivo por el cual es considerada de vital importancia, indispensable para el desarrollo sostenible, son diversas las funciones que la necesitan para llevar a cabo procesos biológicos, es decir su ausencia podría conllevar a la muerte. Además, sostiene diversas teorías científicas relacionadas con la vida, pero además de participar como elemento vital, tiene muchísimas otras aplicaciones. De igual manera, a medida que se incrementa la población, la demanda de agua es aún mayor (Saldívar, 2013, pp. 9-11).

2.2.11. Tipos de aguas

Según la OMS existen diferentes tipos de agua en función de sus características químicas, físicas o biológicas. Los principales tipos de agua que se consideran son: agua potable, dulce, salada, salobre, y servidas (Gutiérrez 2018, p.213).

2.2.11.1. Agua potable

El agua potable se puede definir de acuerdo con las Guías de Calidad de la Organización Mundial de la Salud como un agua que puede utilizarse para el consumo humano y uso doméstico, así como también para la higiene personal, es un agua libre de microorganismos patógenos y de alta calidad para evitar riesgos en la salud (Robert 2019, p. 26).

2.2.11.2. Agua dulce

El agua dulce por lo general se encuentra en la superficie terrestre de manera natural, así como en ecosistemas subterráneos, está representada tan sólo con el 2.5% del agua en toda la tierra y la mayor parte en forma de hielo o en el subsuelo. En las sociedades actuales el agua se ha convertido en un bien muy preciado, debido a la escasez, es un sustento de la vida y además el desarrollo económico está sometido a la disponibilidad de agua (Robert 2019, p. 26).

2.2.11.3. Agua salada

El agua salada está constituida por mares y océanos. Este tipo de agua contiene alta salinidad y corresponden a las aguas territoriales en la que términos distintos región sus derechos internacionales (Ministerio del Ambiente 2019, p. 263).

2.2.11.4. Agua salobre

El agua salobre es aquel tipo de agua que posee una salinidad comprendida entre 0.5 y 30 UPS de sales. UPS es la unidad práctica de salinidad que representa la cantidad de gramos de sales disueltas por kilogramo de agua (Ministerio del Ambiente 2019, p. 263).

2.2.11.5. Agua servida

Las aguas servidas son aquellas que se producen a través del alcantarillado desde las viviendas hasta los cursos de agua de un lago o el mar. La cantidad de agua servida que se produzca en cada domicilio va a depender de la población y de diversos factores, ese tipo de aguas está constituida por una pequeña porción de sólidos suspendidos que ejerce una acción muy importante en sus efectos a corto y largo plazo. Generalmente tienen un olor desagradable y contienen compuestos químicos inorgánicos que hace que se conviertan en un problema de contaminación (Astudillo Godoy 2019, p. 4).

2.2.12. 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).

2.2.13. Río Chibunga

El río Chibunga forma parte de la subcuenca del río Chambo, que es una de las tres subcuencas que forman parte de la cuenca del río Pastaza, es la tercera cuenca de drenaje más importante del Ecuador, cubriendo un área total de 32182 km². Tiene un gradiente altitudinal de más de 5000 metros en la vertiente oriental de los Andes y posee una descarga de 2051 m³ por segundo. Dentro de la cuenca alta que forma el Pastaza se encuentra el río Chibunga que nace desde los deshielos del nevado Chimborazo para luego unir sus aguas con el río Cajabamba formando así el río Chibunga que atraviesa de noroeste a sureste por diferentes comunidades (Calpi, Gatazo, Licán, Riobamba, Yaruquíes, San Luis), la cual, con el paso del tiempo y las actividades humanas, el río Chibunga se ha deteriorado y ha sido afectado en su caudal, calidad de agua, riveras y paisaje, debido a que se le considera no como río sino como canal de riego y el lugar para la disposición final de desechos sólidos y líquidos (Mendoza, 2018, p.2-3).

2.2.14. 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).

2.2.14.1. 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.).

2.2.14.2. Agentes 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).

2.2.14.3. 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.).

2.2.14.4. 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).

2.2.14.5. 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).

2.2.14.6. 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).

2.2.15. Aguas residuales

Las aguas residuales se definen como aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general, de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas. Aquellas aguas que no han recibido ningún tipo de tratamiento se convierten en reservorio de microorganismos, especialmente aquellos que son patógenos para el ser humano (Romero et al., 2019: pp. 5-6).

Dentro de este concepto se incluyen aguas con diversos orígenes:

- **Aguas residuales domésticas o aguas negras:** Resultan de la orina y heces humanas, limpieza de la casa, de la cocina e incluso del aseo personal. Posee un conjunto considerable de microorganismos y de materia orgánica, así como restos de grasas, detergentes, lejía y jabones.
- **Aguas blancas:** Puede ser de origen atmosférico (hielo, nieve y lluvia) o del riego y limpieza de lugares públicos, calles y parques. En aquellas zonas en que las precipitaciones atmosféricas son muy abundantes, dichas precipitaciones suelen excretarse por separado para mantener el sistema de depuración.
- **Aguas residuales industriales:** Se originan de los procesos ejecutados en empresas industriales y fábricas los mismos que contienen ácidos, grasas, antibióticos, detergentes y otros productos, dependiendo de las diversas actividades industriales.
- **Aguas residuales agrícolas:** Suelen aparecer por producto de las distintas actividades agrícolas en las zonas rurales (Oakley y Salguero, 2020: pp. 90-95).

2.2.15.1. Efectos contaminantes de aguas residuales

En las últimas décadas el mundo ha venido mostrando preocupación y está tratando de resolver los problemas relacionados con la disposición de los efluentes líquidos provenientes del uso doméstico, comercial e industrial de las aguas de abastecimiento. Las fuentes de agua (ríos, acuíferos, lagos, mar), han sido incapaces por sí mismas para absorber y neutralizar esta carga contaminante, y por ello estas masas de agua han perdido sus condiciones naturales de apariencia física y su capacidad para sustentar una vida acuática adecuada, que responda al equilibrio ecológico que de ellas se espera para preservar los cuerpos de agua. Como resultado, pierden aquellas condiciones mínimas que les son exigidas para su racional y adecuado aprovechamiento como fuentes de abastecimiento de agua, como vías de transporte o fuentes de energía. Esta

contaminación se manifiesta con mayor intensidad en los países industrializados y con una explotación intensiva de la agricultura (Arciniega y Salazar, 2021: p. 28).

2.2.15.2. *Tratamiento de aguas residuales*

El tratamiento de aguas servidas tiene como objetivo eliminar las sustancias nocivas contaminantes y posteriormente devolver este tipo de aguas al ciclo normal, ya sea por el desagüe al mar o por reutilización directa. Entre las sustancias que se pueden llegar a eliminar están aceites, harinas, sólidos sedimentables y compuestos como amoníaco y fosfatos. Existen varios tratamientos para tratar las aguas servidas, los cuales ayudan a mejorar el estado y calidad de esas aguas como lo son los tratamientos físicos que implican una separación física de sólidos de distintos tamaños; los tratamientos químicos que constituyen una serie de procesos químicos que ayudan a la eliminación o reducción de sustancias nocivas como nitratos o fosfatos; y tratamientos biológicos que eliminan contaminantes coloidales a través de microorganismos por procesos aeróbicos o anaeróbicos (Arciniega y Salazar, 2021: p. 28).

2.2.15.3. *Métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales*

El tratamiento de las aguas residuales es una práctica que, si bien se lleva realizando desde la antigüedad, en la actualidad resulta algo fundamental para mantener una buena calidad de vida. Actualmente, los métodos convencionales son los más empleados por las industrias, a continuación, se presentan algunos de ellos:

Categoría	Subcategoría
Tratamiento de agua residuales con materia desuspensión	Desbaste Sedimentación Filtración Flotación Coagulación-floculación

Tratamientos de aguas residuales para la eliminación de materia disuelta	Precipitación Intercambio iónico Adsorción
Tratamientos biológicos	Sistemas anaerobios Sistemas aerobios Sistemas anóxicos

Ilustración 2-6: Métodos convencionales de aguas residuales

Fuente: (Ramis, 2019, pp. 14-20).

2.2.16. Tipo de muestreo de aguas corrientes

Según la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 2176:2013 establece guías sobre las técnicas de muestreo usadas para obtener los datos necesarios en los análisis de control de calidad, de las aguas naturales, aguas contaminadas y aguas residuales para su caracterización (Astudillo Godoy 2019, p. 4).

2.2.16.1. Muestras puntuales

Es una muestra individual tomada de forma manual o automática para aguas superficiales, a una profundidad específica, y para aguas subterráneas; cada muestra generalmente solo describe la calidad del agua en el momento y el lugar de la recolección. El muestreo automático corresponde a una serie de muestras tomadas en tiempos preestablecidos o intervalos basados en flujo (Astudillo Godoy 2019, p. 1).

Se recomienda el muestreo in situ cuando se dan las siguientes condiciones:

- El caudal de agua del que se toma la muestra no es uniforme.
- Si el valor del parámetro de interés no es constante, o si se usa una muestra compuesta que difiere de una sola muestra debido a las reacciones entre muestras (Sixiao et al., 2016: pp.37-40).
- El muestreo oportuno es suficiente para investigar la posible contaminación y determinar el alcance de la contaminación en una encuesta, o en el caso de la recolección automática de una sola muestra, para determinar cuándo ocurrió la contaminación. El muestreo in situ

también se puede utilizar para establecer un programa de muestreo más amplio y es esencial si el propósito del programa de muestreo es evaluar si la calidad del agua se encuentra dentro o fuera de los valores promedio de calidad (Sixiao et al., 2016: pp.37-40).

Se recomienda tomar muestras especiales para determinar parámetros inestables como: concentraciones de gases disueltos, cloro residual y sulfitos solubles (Astudillo Godoy 2019, p. 4).

2.2.16.2. Muestras compuestas

Las muestras se toman en lotes y se combinan para obtener una muestra total. Las muestras compuestas proporcionan datos de composición promedio, por lo que antes de mezclar las muestras es necesario asegurarse de que estos sean los datos deseados o que el parámetro de interés no haya cambiado significativamente durante el período de muestreo. Se recomienda el muestreo combinado cuando se cumplen los límites basados en la calidad promedio del agua (Sixiao et al., 2018: pp.37-40).

2.2.17. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares, con un tamaño medido en micrómetros (entre 0.5 a 5). Presentan una variedad de formas que incluyen hélices, esferas y barras. También las bacterias son procariotas, lo que quiere decir que no poseen un núcleo ni presentan orgánulos internos. Algunas de ellas poseen sistemas de desplazamiento que les permiten movilidad y diseminación. Por lo general, también cuentan con una pared celular, en la cual el peptidoglicano se considera como componente característico y propio de éstas (Castillo, 2019, pp. 2-3).

2.2.17.1. Bacterias más recurrentes en el agua

La presencia de microorganismos potencialmente patógenos para el ser humano en el agua de consumo es un riesgo que se incrementa en las áreas marginales de mayor densidad poblacional o en zonas sin disponibilidad de agua potable (Castillo, 2019, pp. 2-3).

Las bacterias que están presentes en el agua, generalmente han sido bacterias de la flora saprófita intestinal, entre las que se encuentran *Bacteroides fragilis*, bacterias mesófilas, coliformes totales, y fecales (termo tolerantes), *Escherichia coli* y estreptococos fecales. Algunas de estas son de origen animal (generalmente de explotaciones pecuarias), que representan un alto potencial zoonótico, siendo abundantes estreptococos fecales y parásitos como *Giardia intestinalis* y

Cryptosporidium spp., que tienen una mayor resistencia a los procesos de tratamiento y desinfección del agua para consumo humano (Saldívar, 2020, pp. 9- 11).

2.2.18. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana, traducida por la aparición de cepas refractarias al efecto bacteriostático y bactericida de los antibióticos, constituye un problema mundial de salud pública, ya que afecta de manera dramática el tratamiento ambulatorio y hospitalario de las infecciones producidas por esos microorganismos. Este fenómeno, que se incrementa de manera incesante, limita de forma progresiva las posibilidades de emplear antibióticos que en tiempos anteriores fueron activos, determinando un incremento en la tasa de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas tanto en los países subdesarrollados como en los más avanzados (Durich, 2018, pp. 7-9).

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un aspecto particular de su evolución natural, seleccionada bajo la presión de los productos antibacterianos, tanto si se trata de antibióticos como de antisépticos o desinfectantes. Este fenómeno mundial incluye todos los gérmenes patógenos para el ser humano y las diversas clases de antibióticos (Durich, 2018, pp. 7-9).

A continuación, se detalla los tipos de resistencia bacteriana:

2.2.18.1. Resistencia bacteriana natural o intrínseca

Es un proceso natural que se presenta entre las cepas bacterianas de una misma especie. 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 y Robles, 2020: pp. 3-4).

2.2.18.2. Resistencia bacteriana adquirida

En cambio, la resistencia bacteriana adquirida es un proceso que se da a una específica 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 (Pérez y Robles, 2020: pp. 3-4).

2.2.19. Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a organismos patógenos

Una de las particularidades que hacen la síntesis verde de NPs un método interesante, es la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos (Pérez y Robles, 2020: pp. 3-4).

2.2.19.1. Actividad antimicrobiana

Se definen como aquellas sustancias capaces de inhibir la supervivencia de microorganismos y son clasificadas según su origen en naturales y sintéticas. Las sustancias antimicrobianas poseen distintos mecanismos de acción, entre los que destacan los siguientes:

- **Inhibición de la síntesis de la pared celular del microorganismo:** La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna (mayor en las bacterias Gram positivas). La ausencia de esta estructura condicionaría la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano. La síntesis de la pared celular se desarrolla en 3 etapas, sobre cada una de las cuales pueden actuar diferentes compuestos: la etapa citoplasma, donde se sintetizan los precursores del peptidoglicano; el transporte a través de la membrana citoplasmática, y la organización final de la estructura del peptidoglicano, que se desarrolla en la parte más externa de la pared (Espinosa y García, 2017: pp. 150-165). 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).
- **Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos:** En la síntesis de bases que forman parte de los ácidos nucleicos, el ácido fólico representa la vitamina fundamental. A partir de este, y a través de una serie de pasos enzimáticos, se producen los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) y ribonucleico (ARN). Los antimicrobianos que siguen este mecanismo de acción pueden interferir en los pasos metabólicos que conllevan a la producción del ácido fólico, inhibir la acción de enzimas y competir en la síntesis del ADN (Espinosa y García, 2017: pp. 150-165). resistente a la acción de la ampicilina y está asociado a infecciones como otitis, sinusitis, meningitis y neumonías (OMS, 2021).

2.2.20. Bloqueo de los mecanismos de resistencia de los microorganismos

Los antimicrobianos que siguen este mecanismo carecen (habitualmente) de acción antimicrobiana intrínseca de verdadera importancia clínica, pero se unen irreversiblemente a algunas β -lactamasas, inhibiendo su acción de resistencia (Santorum, 2019: pp. 25-26).

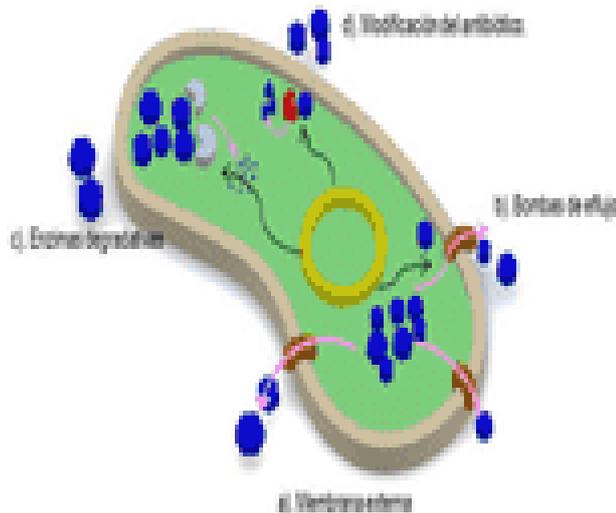


Ilustración 2-7: Bloque de mecanismos de resistencia de los microorganismos

Fuente: (Ramis, 2019, pp. 14-20).

2.2.21. Interferencia de la síntesis proteica

La síntesis de proteínas requiere un mecanismo de interacción adecuado entre los ribosomas, el ácido ribonucleico mensajero (ARNm), el transportador (ARNt) y los aminoácidos. Los antibióticos que utilizan este mecanismo bloquean la unión de ciertas partes del ribosoma e inhiben la síntesis de péptidos (Romero et al., 2019: pp.5-6).

La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas se debe a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos.

No se han determinado el modo de acción de estos compuestos fenólicos, ya que pueden alterar enzimas esenciales, interactuar con las membranas celulares o alterar la función del material genético y se ha observado que afectan a los lípidos, las proteínas, la concentración de sales, el pH y la temperatura afecta la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Romero et al., 2019: pp.5-6).

2.2.22. *Microorganismos y su clasificación*

Los microorganismos generalmente se definen como organismos o sistemas biológicos que solo pueden observarse bajo un microscopio, mientras que los microorganismos patógenos son microorganismos capaces de causar enfermedades en los individuos. Etimológicamente correcto, pero no incluye organismos infecciosos que no causan síntomas clínicos evidentes. Casadevall y Pirofski propusieron definir los microorganismos patógenos como microorganismos capaces de causar daño al huésped. Esta capacidad es la patogenicidad (Colcha, 2021, p. 23). Una característica taxonómica importante de las bacterias es su respuesta a la tinción de Gram, una tinción diferencial utilizada para la visualización en microbiología tanto para referirse a la morfología de la célula bacteriana como para realizar la diferenciación inicial (Colcha, 2021, p. 23). El procedimiento de tinción de Gram comienza con el uso de un colorante base de violeta de genciana. A continuación, se aplica una solución de yodo; en este punto del procedimiento, todas las bacterias se tiñen de azul. A continuación, las células se trataron con alcohol. Las células Gram positivas, que retienen el complejo violeta de genciana-yodo, se vuelven azules, mientras que las células Gram negativas se despigmentan por completo con la adición de alcohol. En el paso final, se aplica otro colorante, como safranina, para dar a las células Gram negativas alteradas un color de contraste. La respuesta diferencial a la tinción de Gram se basa en la estructura de la pared celular. La principal diferencia entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas es la composición y estructura de la pared celular. En ambas, la pared celular consta de la membrana citoplasmática o membrana celular que rodea al espacio interno de la célula. Luego hay una capa de peptidoglicano, y entre la membrana y el peptidoglucano un pequeño espacio llamado espacio periplasmático o periplasma. Las bacterias Gram positivas tienen una capa gruesa de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano mucho más delgada y están rodeadas por otra membrana, la membrana externa. En otras palabras, las bacterias Gram positivas no tienen membrana externa y tienen una capa de peptidoglicano mucho más gruesa que las bacterias Gram negativas (Medina et al., 2015: p. 3-9).

Existen varios métodos para la evaluación de la actividad antibacteriana, pero es bien sabido que la técnica de difusión ha sido ampliamente utilizada para evaluar la actividad antibacteriana de extractos de plantas, y tiene muchas ventajas sobre otros métodos, incluyendo su simplicidad, bajo costo y la capacidad de probar una variedad de microorganismos. y agentes antimicrobianos, así como la capacidad de interpretar los resultados presentados, utilizará el método de difusión en agar para evaluar la actividad antibacteriana de las FeNPs frente a microorganismos patógenos (Medina et al., 2019: p. 1). 3-9).

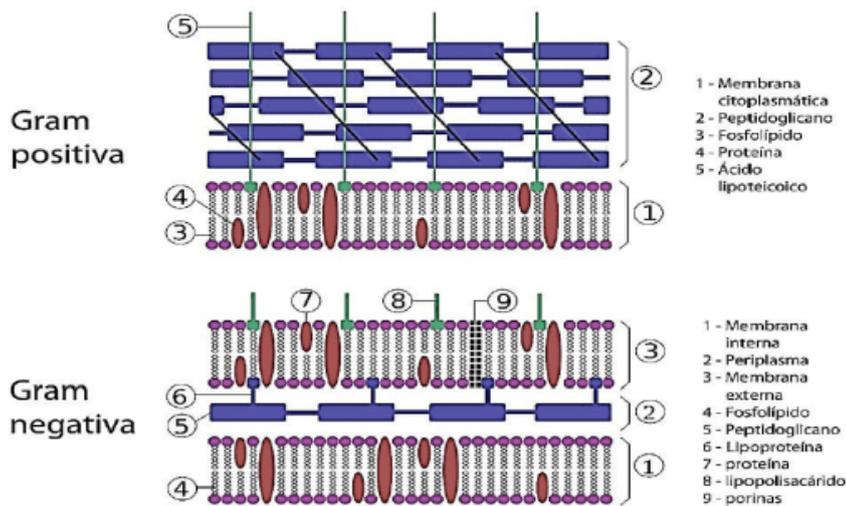


Ilustración 2-8: Composición de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Fuente: (Medina et al, 2019: pp. 83-85).

2.2.23. Método de difusión en agar

Esta técnica se basa en el método descrito originalmente por Bauer (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en agar o placa ha sido estandarizado y actualmente está aprobado por el Subcomité Nacional de Pruebas de Susceptibilidad de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, 1997), de EE. UU (Reyes, 2020, pp. 19- 21).

2.2.24. Resistencia bacteriana Principio de la prueba de difusión en agar

El principio de la prueba de difusión en agar se basa en la base cuantitativa del efecto de una sustancia en estudio (en este caso sería las FeNPs) sobre diferentes microorganismos, a través de la relación entre la concentración de la sustancia y la cepa bacteriana (Rodríguez et al., 2018: pp.9-15). 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).

2.2.25. Factores que influyen en la prueba de difusión en agar

Las siguientes variables se encuentran entre las más importantes a considerar para evitar posibles cambios:

- **Profundidad del agar:** Los resultados se ven afectados dependiendo de la profundidad de la capa de agar. Se debe tener cuidado de normalizar el volumen de agar fundido medido antes

de verterlo en una caja Petri, ya que existe una relación inversa entre el diámetro del halo formado y el espesor de la placa de agar sólido. Esto significa que, si se agrega una gran cantidad de agar a la placa, se pueden producir halos de diámetros más pequeños o viceversa cuando las demás condiciones se mantienen constantes (Reyes, 2018, pp.19-21).

- **Concentración del inóculo:** Suele ser la variable más importante, ya que tiene la capacidad de cambiar la respuesta (halo inhibitorio) que es la concentración en la suspensión del microorganismo seleccionado (el inóculo). La amplitud del diámetro del halo resultante es proporcional a la concentración del inóculo, manteniéndose constantes las demás concentraciones. La suspensión utilizada debe proporcionar una concentración conocida del microorganismo entre 10⁵ y 10⁶ unidades formadoras de colonias/ ml (UFC/ml) y por debajo de estas concentraciones las relaciones del instrumento se obtienen a valor razonable (Medina et al., 2018: pp.3-9).
- **Temperatura de incubación:** La temperatura de incubación de las placas debe ser la adecuada al microorganismo inoculado, de esta forma se incuba el microorganismo a su temperatura óptima de crecimiento para que el mismo antibiótico ejerza su efecto inhibitorio del crecimiento y no en cualquier otro caso, ya que en este caso la temperatura para bacterias debe ser de 37 °C como recomienda el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Por otro lado, es importante tener en cuenta que el apilamiento de placas conduce a un gradiente de temperatura, de modo que puede ocurrir un crecimiento más rápido en las placas exteriores que en las otras placas, donde la placa está en el centro de la pila, lo que en última instancia conducirá a respuestas incomparablemente diferentes (Medina et al., 2018: pp.3-9).
- **Naturaleza del borde del halo de inhibición:** Dado que todas las conclusiones extraídas de la prueba de difusión en agar para la actividad antibacteriana dependen en gran medida del halo inhibitorio medido, deben determinarse de tal manera que los valores de la prueba estén lo más cerca posible de su máximo. Sin embargo, los halos observados son limitados, dispersos, inciertos, dobles, difíciles de medir; esto se debe a que los microorganismos sembrados en agar encuentran un gradiente de concentración del agente antimicrobiano, que normalmente migra lejos de la fuente (disco), formando así una zona de inhibición. La sensación degenerativa en el borde de la areola es un área difusa y difícil de medir, además el diámetro de la areola es una característica medida en función del tiempo, ya que no es constante y se desarrollará después de un cierto período de incubación. Los cambios como el crecimiento excesivo pueden distorsionar y dificultar la lectura. En algunos casos se produce el fenómeno del doble halo en el que el halo interior es un halo completamente suprimido visto con un halo transparente y bien definido característico del medio. El halo exterior es menos transparente y tiene bordes borrosos, lo que dificulta su lectura. Por razones prácticas,

no es apropiado medir el tipo de halo para determinar la potencia relativa ya que la escala no cambia y la decisión se basa en la legibilidad. A discreción del operador el halo debe ser apropiado para la condición y la muestra que se está analizando (Medina et al., 2018: pp.3-9).

- **Composición química del medio de agar:** Es necesario verificar el contenido de algunas sustancias, especialmente los electrolitos que pueden afectar la difusión del agente antimicrobiano cuando se somete a cierto tipo de interacción de carga impidiendo finalmente el efecto inhibitorio del agente antibacteriano para el microorganismo porque no se propaga. Los medios de cultivo más comunes son Mueller Hinton Agar y Tryptic Soya Agar, debido a que su composición facilita el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y dispersa mejor las muestras (Medina et al., 2018: pp.3-9). iccausante 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).
- **Tiempo de incubación:** Dado que la formación del halo de inhibición depende del tiempo de incubación, se debe utilizar un tiempo de lectura constante para evitar errores en la determinación del diámetro del halo formado, debido a problemas como la difusión posterior a la lectura, el tiempo de incubación varía de 24 a 48 horas dependiendo del microorganismo (Medina et al., 2018: pp.3-9).
- **Concentración crítica (CC):** Se define como la concentración de un agente antimicrobiano por debajo de la cual no se puede inhibir el crecimiento microbiano. Esto se logra determinando la respuesta medible (área inhibitoria) provocada por diferentes concentraciones del agente antimicrobiano evaluadas en medio sólido inoculado con microorganismos transgénicos mediante el método de difusión en agar (Medina et al., 2018: pp.3-9).
- **Volumen de la concentración del antimicrobiano:** Se define como la concentración de sustancias antibacterianas que no inhiben el crecimiento microbiano. Esto se logra determinando la respuesta medible (halo inhibitorio) provocada por diferentes concentraciones de agente antimicrobiano evaluadas en medio sólido inoculado con microorganismos transgénicos por el método de difusión en agar (Medina et al., 2018: pp.3-9).

2.2.26. Métodos de caracterización de nanopartículas de hierro

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*)
- Microscopía de barrido electrónico

2.2.26.1. Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis)

Este método se utiliza para medir la absorbancia de la muestra al principio y al final del paso de la luz. Determina la cantidad de luz absorbida por la muestra (absorbancia), la cantidad de luz transmitida por la solución de muestra (transmitancia) y la concentración de la muestra según la ley de Beer-Lambert (Santorum, 2019: pp.25-26).

La absorción de radiación óptica provoca la excitación de electrones desde el orbital de menor energía (LUMO) de la molécula o átomo hasta el orbital de mayor energía (Espinoza et al., 2019: pp.150-165).

Un espectrofotómetro consta principalmente de: fuente de radiación, selector de longitud de onda, contenedor de muestra, detector de radiación y procesador de señal (Espinoza et al., 2019: pp.150-165).

2.2.26.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Es una técnica que permite estudiar las propiedades de una muestra, ya sea su morfología, estructura o química, también se la conoce como técnica de alta resolución y gran volumen. Su método involucra un haz de electrones de alta energía enfocado a través de un sistema de lentes e incidente en una muestra para producir electrones en respuesta al impacto de electrones. Estos electrones son detectados por un dispositivo que registra la cantidad de electrones y los convierte en una señal digital para crear una imagen. (Colcha, 2021, p. 23).

Esta técnica utiliza un microscopio electrónico de primer plano que proporciona una imagen topográfica ampliada a la muestra. El aumento del número de imágenes se debe a la relación entre el tamaño final de la imagen y el área de muestra (Espinoza et al., 2019: pp.150-165). El funcionamiento del microscopio implica que un haz de electrones incida sobre la muestra. Para que una muestra sea analizada, debe ser conductora; cuando una muestra carece de esta propiedad, se suele recubrir con una fina capa de oro o carbono, que le confiere sus propiedades conductoras. La técnica de preparación de la muestra se denomina *sputtering* (Colcha, 2021, p. 23).

CAPITULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Descripción de los procesos

Para la obtención de nanopartículas de hierro se utilizó el método de síntesis verde que se basa principalmente en el uso de extractos vegetales como agente reductor y agente estabilizador, lo que orienta a la disminución química de las sales metálicas, dando lugar así a las nanopartículas de hierro. Con ello, se llevó a efecto una revisión bibliográfica del poder reductor de *Piper aduncum* (matico). La caracterización y la síntesis de nanopartículas se elaboró en 2 partes: en primer lugar, la preparación del extracto acuoso de *Piper aduncum* (matico). En segundo lugar, se obtuvieron las nanopartículas y se llevó a cabo su posterior caracterización mediante técnicas de espectroscopia ultravioleta-visible (Uv-vis) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Finalmente, se quiere probar si las nanopartículas de hierro tienen un efecto bactericida sobre las bacterias patógenas que se encuentran en las muestras de agua del Río Chibunga, que actualmente son más resistentes a los antibióticos. Para ello se preparan medios, principalmente agar selectivo para bacterias, en este caso agar nutritivo (Medina et al., 2015: pp. 3-9).

3.2. Materiales, reactivos y equipos

Tabla 3-1: Materiales, reactivos y equipos

MATERIALES	REACTIVOS
Erlenmeyer	Etanol
Vidrio reloj	Agar nutritivo
Probeta	Agua destilada
Papel filtro	Cloruro férrico (FeCl ₃)
Fundas con cierre hermético	Extracto de <i>piper aduncum</i> (matico)
Vasos de precipitación de 250 ml	EQUIPOS
Varilla de agitación	Balanza analítica
Espátula	Sonicador
Gradilla para tubos	Rotavapor
Botellas color ámbar	Agitador magnético
Tubos falcón	Centrifuga

Aza	Espectrofotómetro Uv- Vis
Cajas Petri	Estufa
Balón de aforo de 100 ml	Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)
Embudo	Espectrofotómetro infrarrojo
Piseta	Cámara de flujo
Pipetas graduadas	Autoclave
Embudo	Microscopio
Pera	Reverbero
Porta y cubre objetos	
Termómetro	

Realizado por: Cazco P., 2023

3.3. Alcance de la investigación

El presente trabajo experimental se enfoca en comprobar si las nanopartículas de hierro sintetizadas a partir del extracto de *Piper aduncum* (matico) y la sal de cloruro férrico (FeCl_3) presentan un efecto bactericida frente a las bacterias patógenas que se encuentran en las muestras de agua del Río Chibunga.

3.4. Diseño de la investigación

3.4.1. Por el método de la investigación

El trabajo de investigación se diseñó mediante una modalidad de investigación cuantitativa debido a que las variables a evaluar pueden ser medibles, puesto que mediante una balanza analítica se puede controlar la cantidad de FeNPs, la longitud de onda que presenta a diferentes concentraciones en el espectrofotómetro de Uv- Vis, además de la actividad como agente bactericida.

3.4.2. Según el objeto

La investigación es de tipo aplicada porque se puso en práctica los conocimientos adquiridos en la formación académica, con un fin aplicativo, desarrollando una síntesis para obtener nanopartículas de hierro como antimicrobiano en muestras de agua del Río Chibunga

3.4.3. Según el nivel de profundización en el objeto de estudio

El presente trabajo de investigación es de tipo explicativo, ya que se usó la técnica de síntesis verde para probar el efecto bactericida de las nanopartículas de hierro principalmente en muestras de agua provenientes del Río Chibunga.

3.4.4. Según la manipulación de variables

Esta investigación es de tipo experimental, puesto que se manipularon las variables en situaciones controladas para garantizar que las nanopartículas de hierro funcionen como agentes bactericidas en muestras de agua del Río Chibunga.

3.4.5. Por la condición de estudio

El trabajo de investigación se efectuó dentro del laboratorio, mediante el empleo de técnicas de estudio capaces de controlar las variables en este caso el de la concentración para la síntesis de nanopartículas y para evaluar su efectividad como agente bactericida se usó pruebas in vitro con muestras de agua del Río Chibunga.

3.5. Población de estudio

En este trabajo, se consideró a las colonias bacterianas presentes en las muestras de agua provenientes del Río Chibunga.

3.5.1. Selección de la muestra

3.5.1.1. 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 representativas 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 y Parque ecológico (**Figura 3-1**).

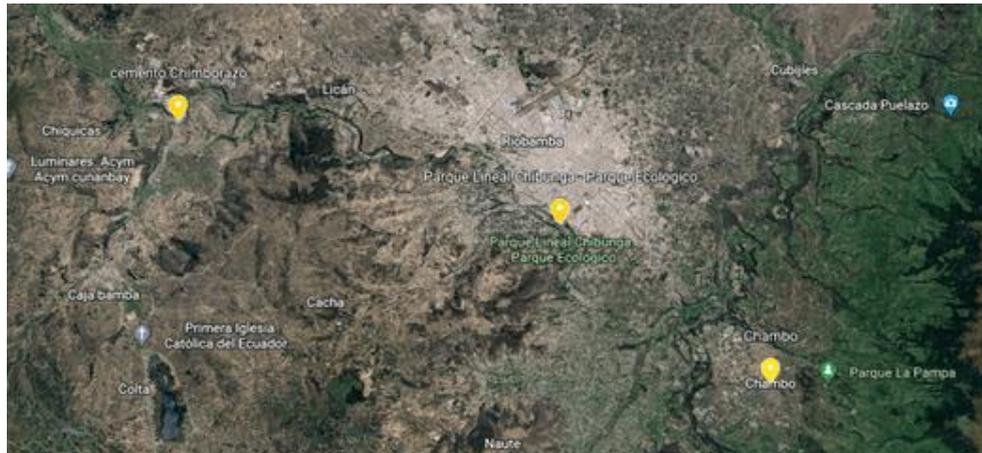


Ilustración 3-1: Puntos de toma de muestras de agua del río Chibunga.

Realizado por: Cazco, Pamela, 2023.

3.6. Lugar de investigación

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Investigación perteneciente a la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, con dirección Panamericana Sur km 1 1/2 del Cantón Riobamba, provincia de Chimborazo.

3.7. 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*.

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 hierro 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 hierro, se realizaron pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana en distintos periodos de tiempo y frente a la exposición a la luz solar.

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 Parque Ecológico (Punto 1)

PUNTO 1	
PARQUE ECOLOGICO	
Tiempo de exposición a las nanopartículas de hierro	Medio de cultivo
Horas	Agar nutritivo
0	21
1h	21
1h	21
3h	8
3h	8
5h	5
5h	0
6h	0
6h	0

Realizado por: Cazco P., 2023

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

PUNTO 2	
CEMENTO CHIMBORAZO	
Tiempo de exposición a las nanopartículas de hierro	Medio de cultivo
Horas	Agar nutritivo
0	14
1h	14
1h	14
3h	5
3h	5
5h	3
5h	0
6h	0
6h	0

Realizado por: Cazco P., 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.

Punto 1		
AGAR NUTRITIVO		
n	Tiempo (horas)	Colonias
1	0	21
2	1	9
3	3	5
4	5	0
5	6	0
COEFICIENTE DE PEARSON (r)		-0,91410245

Ilustración 3-2: Calculo coeficiente de correlación de Pearson Excel

Fuente: Cazco P., 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 3-3: Coeficiente de correlación de Pearson

Fuente: Cazco P., 2023

3.8.3. Hipótesis

H₀: Las nanopartículas de hierro no presentan una potencial actividad bactericida frente a colonias bacterianas resistentes a los antibióticos procedentes de las muestras de agua del Río Chibunga.

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

3.9. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

3.9.1. Síntesis de nanopartículas

Para lograr obtener las nanopartículas de hierro se realizó síntesis verde, esta técnica de síntesis consiste en emplear el extracto de la planta como agente reductor y ClFe_3 como sal precursora produciendo así las nanopartículas de hierro.

La síntesis de nanopartículas de hierro se divide en dos etapas:

3.9.1.1. Obtención del extracto acuoso de *Piper aduncum* (Matico).

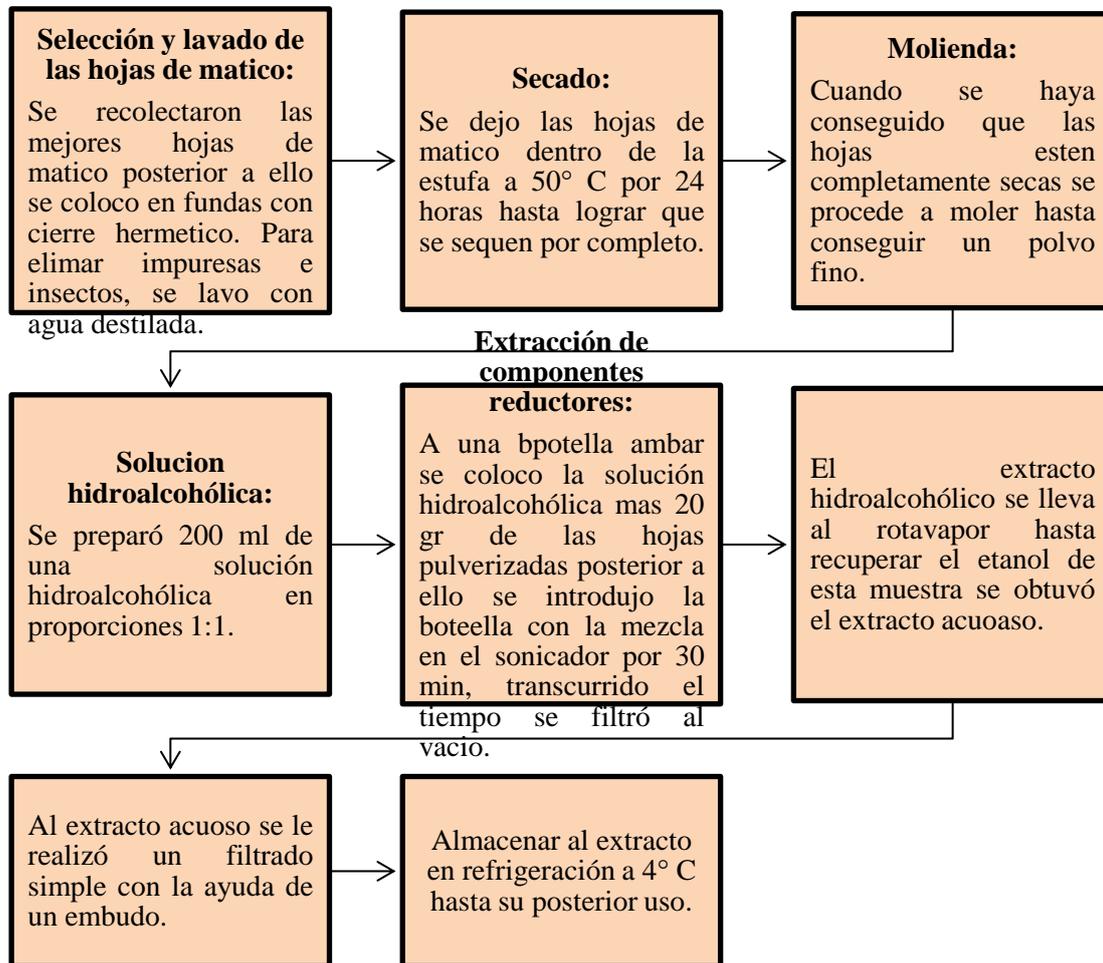


Ilustración 3-4: Proceso para la obtención del extracto acuoso de *Piper aduncum* (Matico)

Realizado por: Cazco P., 2023

3.9.1.2. Preparación de la solución de la sal precursora

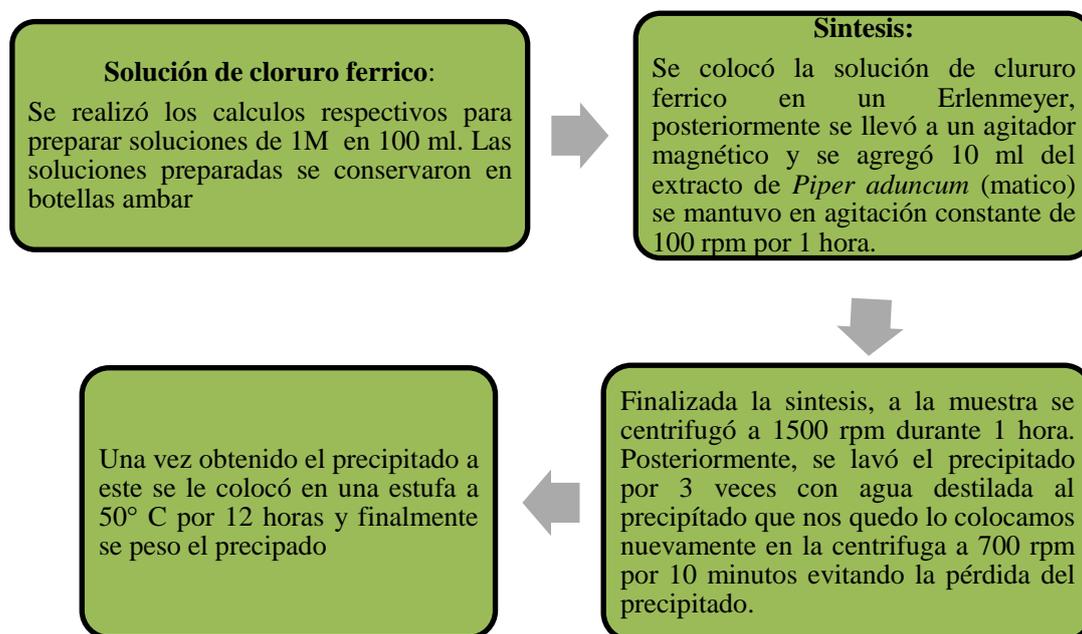


Ilustración 3-5: Proceso para la preparación de la solución de la sal precursora

Realizado por: Cazco P., 2023

3.10. Caracterización de nanopartículas de óxido de cobre

3.10.1. Técnicas de recolección de datos

Los datos de la caracterización de las nanopartículas hierro fueron recolectados mediante las técnicas de Espectroscopía ultravioleta visible (*UV-Vis*) y Microscopía de barrido electrónico (SEM).

3.10.1.1. 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 Fe 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...

3.10.1.2. 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.

3.10.2. Evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas de hierro

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.

3.10.2.1. 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.

3.10.2.2. 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 dos 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.

3.10.2.3. 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.

3.10.2.4. 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 2 siembras que corresponden a cada muestra tomada en un punto del

rio Chibunga: Sector de la empresa Cemento Chimborazo y Parque ecológico.

3.10.2.5. *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.

3.10.2.6. *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.

3.10.2.7. *Pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana*

1. Determinación del número de colonias bacterianas de las muestras de agua con nanopartículas de hierro cada 1, 3, 5 y 6 horas expuestas a la luz solar.

- En 4 tubos de ensayo se colocó 0,05g de FeNPs y 1 ml del inóculo y se expuso a la luz solar por el lapso de tiempo de 1, 3, 5 y 6 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).

2. Determinación del número de colonias bacterianas de las muestras de agua con nanopartículas de hierro 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 FeNPs 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 *Piper aduncum* (matico)

El extracto acuoso de *Piper aduncum* (matico) 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 matico. 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: Obtención del extracto acuoso

Realizado por: Cazco, Pamela, 2023.

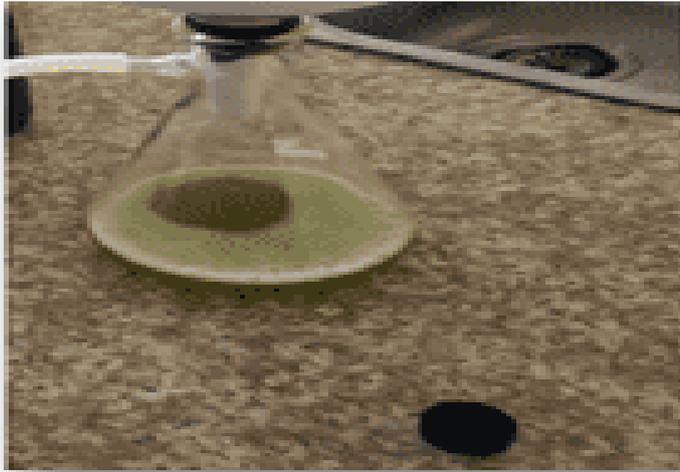


Ilustración 4-2: Extracto acuoso de *Piper aduncum* (matico).

Realizado por: Cazco, Pamela, 2023.

4.1.1. Análisis del extracto acuoso de *Piper aduncum* (matico)

La Figura 1-4 muestra el proceso de extracción en fase sólida-líquida, mediante el uso del sonicador con el propósito de separar los principios activos de las hojas de la planta de *Piper aduncum* (matico). Una vez ya realizado el extracto de Piper aduncum (matico), se realizó una prueba con cloruro férrico (FeCl_3) para corroborar la presencia de compuestos fenólicos esenciales para la síntesis de nanopartículas de hierro.

Según Kuklinski (2020), este análisis es cualitativo debido a que cuando el FeCl_3 reacciona con el fenol produce complejos de Fe^{+3} con colores intensos como púrpura, verde y negro dependiendo de la cantidad de fenoles en el compuesto. Como se ve en la Figura 4-2, el cambio de color verde a negro dando positiva la prueba a la presencia de fenoles en el extracto.

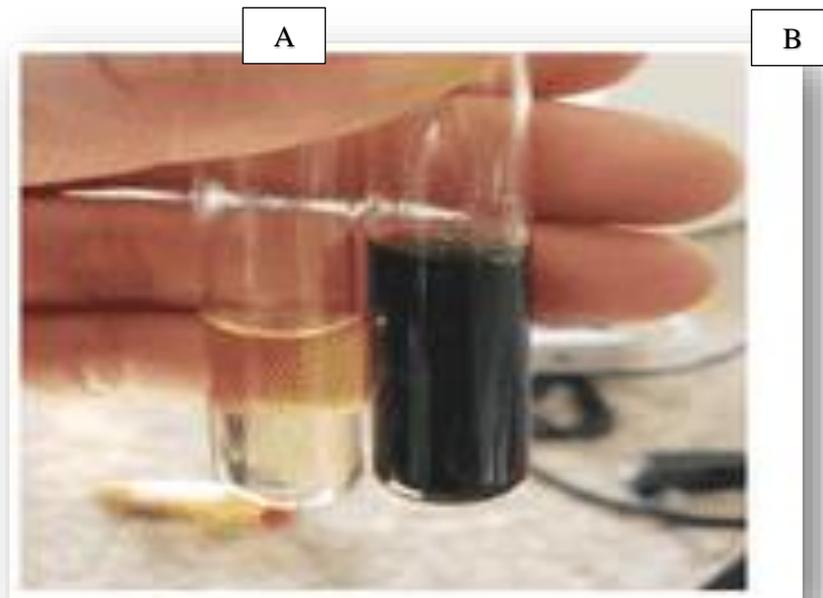


Ilustración 4-3: Presencia de compuestos fenólicos: cambio de color de amarillo pálido a negro
(A) Extracto puro; (B) Extracto más FeCl₃.

Realizado por: Cazco, Pamela, 2023.

4.2. Síntesis de nanopartículas de hierro

Para obtener nanopartículas de hierro, el precursor y el agente reductor se mezclan en una proporción de 1:1 en un matraz limpio y estéril. Para reducir los iones Fe, se añadió 10 ml de extracto de matico, y se mezcló con 50 ml de solución acuosa de FeCl₃ 0,001 M se debe mantener la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos, removiendo continuamente usando un agitador magnético, mientras se observa el cambio de color de la solución de verde a negro oscuro como se muestra en la Figura 3-4. Investigaciones de Gonzales (2020) y Palacios (2019) demostraron que de esta manera se confirmaba la formación de suspensiones coloidales de nanopartículas de hierro.

Con el fin de evitar incidentes en el laboratorio se efectuó una revisión periódica de la muestra. Después que se cumplió el tiempo estipulado (24 horas), las nanopartículas de hierro pasaron a estado sólido y presentaron un color negro, según varias fuentes bibliográficas el negro es color característico de las FeNPs.



Ilustración 4-4: Obtención nanopartículas de hierro

Realizado por: Cazco, Pamela, 2023

4.3. Resultados de la caracterización de nanopartículas de hierro

Para caracterizar las nanopartículas de hierro se empleó técnicas de de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) el cual nos permite determinar su morfología, tamaño y composición y Espectroscopia ultravioleta visible (Uv-vis).

4.4. Resultados de la caracterización de nanopartículas de hierro

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 hierro.

La caracterización por espectroscopía UV-Vis nos permitió verificar que durante la síntesis se obtuvo el compuesto deseado, en este caso particular de nanopartículas de hierro. En este tipo de análisis, el hierro tiene picos entre 190 y 300 nm La absorción de las bandas de las nanopartículas de hierro pueden moverse hacia la derecha o viceversa hacia la izquierda dependiendo del tamaño y la forma que estas presenten. Según Vera (2018), si se desplaza el pico hacia la derecha se estima que el tamaño de las nanopartículas aumenta.

La muestra analizada en este estudio presentó un pico a 194 nm con una absorbancia de 3.307, podemos ver que se forma la curva característica de las nanopartículas de hierro de esta forma podemos confirmar que el compuesto a sintetizar es hierro y es una muestra pura.

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 hierro.

A continuación, en la **Figura 5-4** se puede distinguir claramente el pico formado al analizar la muestra obtenida en el equipo UV-Vis.

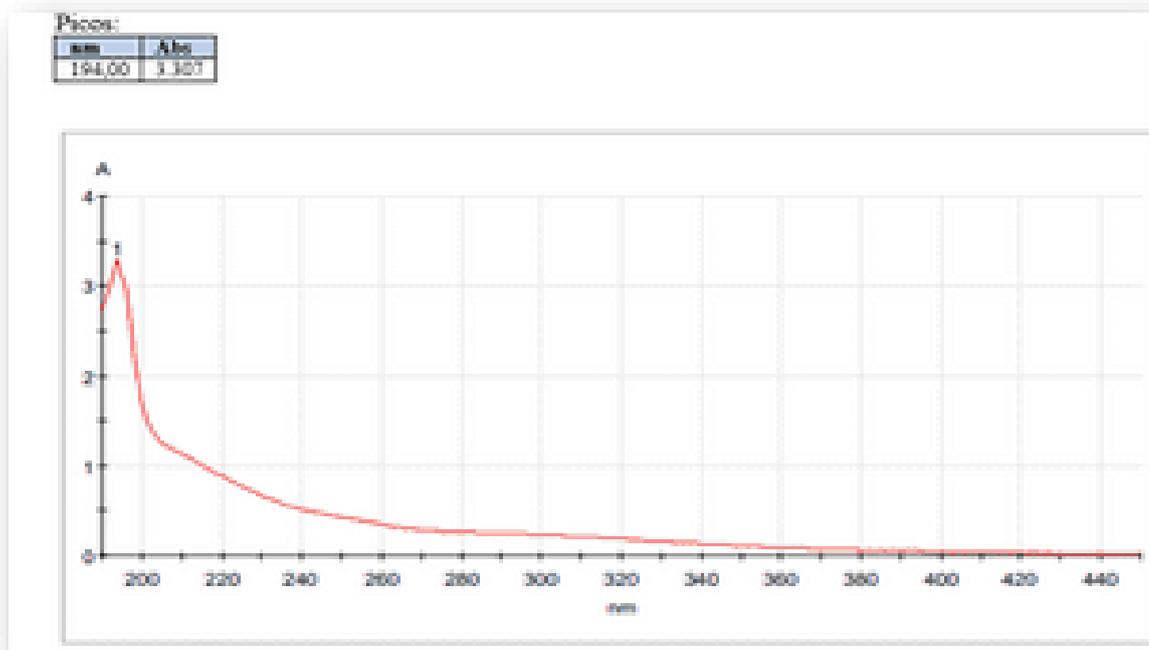


Ilustración 4-5: Espectro Uv-vis de nanopartículas de hierro de 1 nm.

Realizado por: Cazco, Pamela, 2023.

4.4.2. *Microscopia electrónica de barrido*

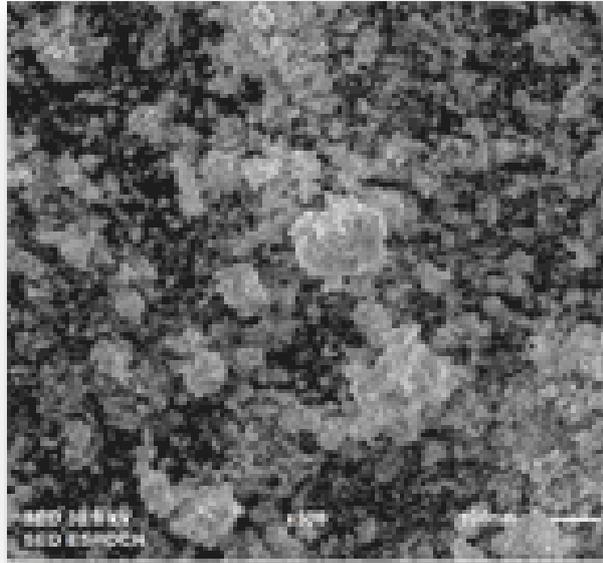


Ilustración 4-6: Microscopia electrónica de barrido de nanopartículas de hierro a 300x y a 1000X.

Realizado por: Cazco P., 2023

El análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las nanopartículas de hierro mostraron un tamaño de partícula entre 15nm - 24 nm analizado a 290 aumentos. En donde se compararon dos zonas de la muestra de las cuales se comprobó la presencia de nanopartículas de hierro en forma agregada ya que, a simple vista aparecen cúmulos de color blanco sobre la superficie de la muestra como se muestra en la figura 6-4 observadas mediante el empleo del microscopio electrónico de barrido (SEM).

De acuerdo con Saltos (2018) las nanopartículas están siempre juntas como en cadenas, porque la precipitación con el imán 50 crea una magnetización de las nanopartículas, por lo que se pegan entre sí hasta pasar por el proceso de centrifugado y lavado.

4.5. **Resultados de la actividad bactericida de las nanopartículas de hierro**

Se utilizó muestras de agua del Río Chibunga tomadas en 2 puntos diferentes para probar el poder bactericida de las nanopartículas de hierro, según varias fuentes bibliográficas se sabe que el Río Chibunga es considerado uno de los ríos más contaminados del Ecuador, por ende, posee un sin número de bacterias para lo cual se trabajó con agar nutritivo, que es un medio de cultivo útil para

todo tipo de bacterias.

Para iniciar con el estudio, se preparó diluciones de las muestras iniciales del agua del río Chibunga, puesto que de esta manera se podrá evitar la aglomeración de las colonias y se las podría contar sin ninguna dificultad.

Finalmente, Para el aislamiento de las cepas puras y su identificación mediante Tinción Gram (Figura 4-7) el tipo de bacterias que se hallan en el Río Chibunga se realizó la preparación del medio y su respectiva siembra en cajas Petri.



Ilustración 4-7: Diluciones de las muestras de agua tomadas de cada punto Chibunga

Realizado por: Cazco P., 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 4-8).



Ilustración 4-8: Diluciones de las muestras de agua del río Chibunga

Realizado por: Cazco P., 2023

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

Para registrar el número inicial de colonias bacterianas, se realizó siembras por extensión en placa del inóculo (dilución 10^{-4}) de los dos 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 14 colonias formadas de la muestra de agua tomada en la empresa Cemento Chimborazo (Figura 4-8), 21 colonias para la muestra tomada en el sector del parque Ecológico (figura 4-9).

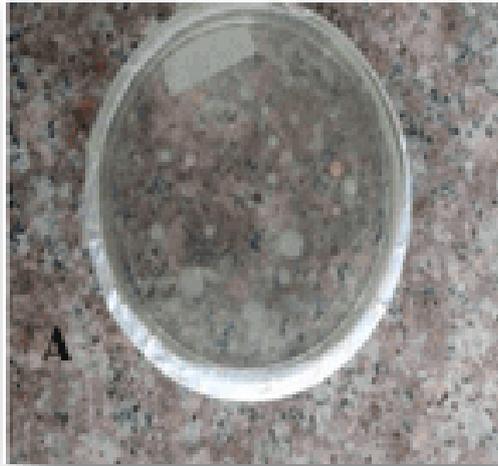


Ilustración 4-9: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo

Realizado por: Cazco P., 2023



Ilustración 4-10: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo

Realizado por: Cazco P., 2023

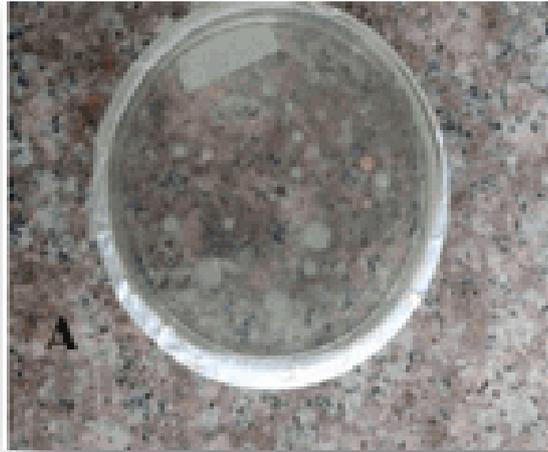


Ilustración 4-11: Colonias bacterianas formadas de la muestra inicial en agar Nutritivo

Realizado por: Cazco P., 2023

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

Para observar el color, la forma y el tamaño de las bacterias se elaboró una caracterización morfológica a partir de Tinción Gram (Figura 4-11) con la que se observó en el microscopio (Figura 12-4) clasificándose como Gram positivas o negativas.

Cada bacteria tiene una forma diferente y requiere una atención especial al momento de observar colores, formas, texturas y bordes en el microscópico.

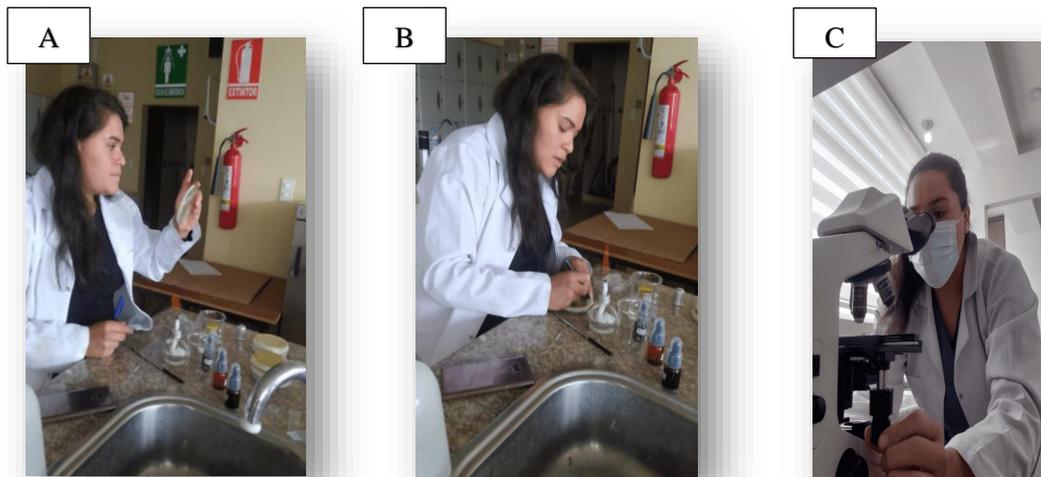


Ilustración 4-12: (A) Preparación de la placa; (B) Proceso de Tinción Gram (B); (C) Vista al microscopio binocular

Realizado por: Cazco P., 2023

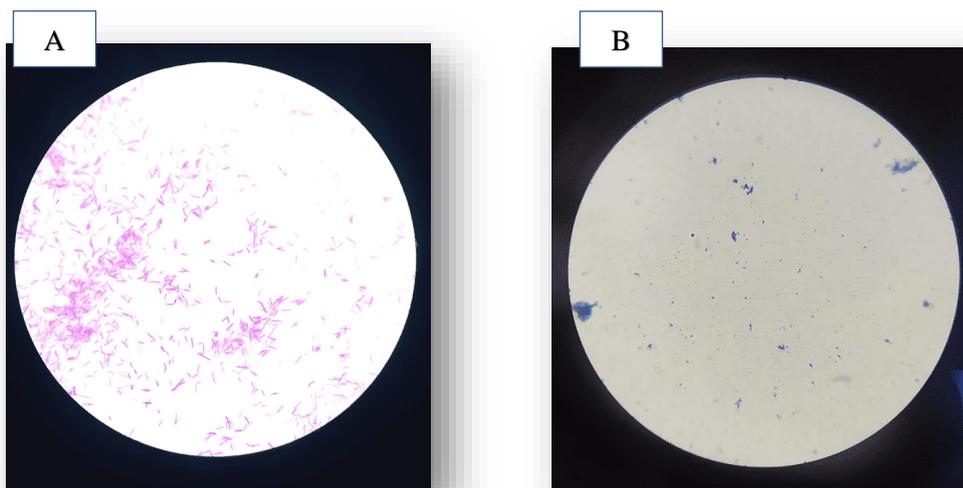


Ilustración 4-13: (A) Bacilos Gram Negativos, (B) Cocos Gram positivos lente de 100X
Realizado por: Cazco P., 2023

Según un estudio realizado por Landa (2023, pp. 53-60), nos menciona que existe alrededor de 11 tipos de bacterias diferentes en el Río Chibunga las mismas que en la actualidad son consideradas peligrosas para la salud del hombre (Tabla 4-1).

De acuerdo en esta investigación se encontró los mismos géneros bacterianos en las muestras de agua tomadas en los 2 úntos diferentes del Rio Chibunga los cuales corresponden: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *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 4-1: Especies bacterianas presentes en las muestras de agua del río Chibunga

Puntos de muestreo	Colonias bacterianas	Familia bacteriana	Tinción Gram
Parque ecológico	<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
Empresa Cemento Chimborazo	<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: Cazco P., 2023

4.6. Pruebas microbiológicas

Los ensayos microbiológicos realizados en este trabajo permitieron corroborar el poder bactericida de las nanopartículas de hierro al estar en contacto en diferentes tiempos en presencia y ausencia de luz solar, y se verificó que las nanopartículas entre más tiempo las muestras pasen en contacto con el sol mayor será la disminución de las bacterias.

Para evidenciar este hecho, a las muestras de agua diluidas se les añadió 0.05 g de nanopartículas de hierro y se las dejó por un periodo de tiempo de 1, 3 y 5 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 hierro cada 1, 3, 5 y 6 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 hierro 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 dos 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 y Tabla 9-4.

Tabla 4-2: Recuento de colonias bacterianas sector Puente del cantón Guano

PUNTO 1	
PARQUE ECOLOGICO	
Tiempo de exposición a las nanopartículas de hierro	Medio de cultivo
Horas	Agar nutritivo
0	21
1h	21
1h	21
3h	8
3h	8
5h	5

5h	0
6h	0
6h	0

Realizado por: Cazco P., 2023

Tabla 4-3: Recuento de colonias bacterianas sector Cemento Chimborazo

PUNTO 2	
CEMENTO CHIMBORAZO	
Tiempo de exposición a las nanopartículas de hierro	Medio de cultivo
Horas	Agar nutritivo
0	14
1h	14
1h	14
3h	5
3h	5
5h	3
5h	0
6h	0
6h	0

Realizado por: Cazco P., 2023

A través de estos resultados obtenidos para las dos muestras recolectadas de los dos 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 hierro y a la luz solar dado a que, el caso de las muestras de agua tomadas del sector de la empresa Cemento Chimborazo de 14 colonias iniciales pasaron a 6 colonias en el transcurso de 1 y 3 horas y en un lapso de tiempo de 5. 6 horas se disminuyó totalmente a cero (Tabla 8-4), mientras que para las muestras del sector del parque Ecológico de 21 colonias inicialmente formadas pasaron a 8 colonias en el transcurso de 1 y 3 horas y en un lapso de tiempo de 5 y 6 horas se disminuyó totalmente a 0 (Tabla 9-4).

4.6.1.2. Determinación del crecimiento bacteriano en agar nutritivo de las muestras de agua sin nanopartículas de hierro cada 1, 3, 5 y 6 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 hierro 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 4-4: Recuento de colonias bacterianas sin nanopartículas de hierro

Punto de muestreo	n	Tiempo	Colonias bacterianas
Parque Ecológico	1	1h	21
	2	3h	21
	3	5h	21
	4	6h	21
Cemento Chimborazo	5	1h	14
	6	3h	14
	7	5h	14
	8	6h	14

Realizado por: Cazco P., 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 hierro en estado puro.

Para determinar si las nanopartículas de hierro 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 FeNPs. Después de transcurrir 48 horas de incubación a 37°C se obtuvo los resultados que se muestra en la Tabla 6-4.

Tabla 4-5: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de hierro

Cepas	Número de colonias	
	Con nanopartículas de hierro	Sin nanopartículas de hierro
Cepa 1	0	12
Cepa 2	0	6

Realizado por: Cazco P., 2023

La Tabla 11-4 muestra resultados de que no existe crecimiento de bacterias en presencia de las nanopartículas de hierro colocadas directamente mientras que, sí se evidencia crecimiento de bacterias sin las nanopartículas por lo que se deduce que las nanopartículas de hierro si tienen mucha influencia en el proceso.

Tabla 4-6: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de hierro

Cepas	Número de colonias	
	Con nanopartículas de hierro	Sin nanopartículas de hierro
Cepa 1	0	12
Cepa 2	0	6

Realizado por: Cazco P., 2023

La Tabla 6-4 muestra resultados de que no existe crecimiento de bacterias en presencia de las nanopartículas de hierro colocadas directamente mientras que, sí se evidencia crecimiento de bacterias sin las nanopartículas por lo que se deduce que las nanopartículas de hierro si tienen mucha influencia en el proceso.

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 dos tablas correspondientes a los resultados obtenidos en la parte experimental de las dos muestras de agua de los dos puntos de muestreo y a partir de estos datos se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 4-7:Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de hierro

Punto 1 (Parque Ecológico)		
AGAR NUTRITIVO		
n	Tiempo (horas)	Colonias
1	0	21
2	1	9
3	3	5
4	5	0
5	6	0
COEFICIENTE DE PEARSON (r)		-0.91410245

Realizado por: Cazco P., 2023

Tabla 4-8:Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de hierro.

Punto 2 (Cemento Chimborazo)		
AGAR NUTRITIVO		
n	Tiempo (horas)	Colonias
1	0	14
2	1	6
3	3	1
4	5	0
5	6	0
COEFICIENTE DE PEARSON (r)		-0.88008132

Realizado por: Cazco P., 2023

Una vez establecidos los resultados mediante el empleo del Coeficiente de Correlación de Pearson podemos decir que existe una correlación inversa entre las variables del tiempo establecido y el número de colonias tanto para la muestra del punto 1 (Parque Ecológico) tomadas en el Río Chibunga representa con un Coeficiente de Correlación de -0.91410245 ubicándose como Correlación Inversa. Mientras que para la muestra del punto 2 (Cemento Chimborazo) tomadas en el Río Chibunga representa con un Coeficiente de Correlación de -0,88008132 de igual forma se fija como Correlación Inversa.

4.6.3. *Influencia de las variables*

4.6.3.1. *Evaluación de efecto bactericida de las nanopartículas de hierro frente a bacterias*

En relación con la Tabla 4-2 y Tabla 4-3 se puede observar claramente que la adición de nanopartículas de hierro a las muestras de agua diluidas del Río Chibunga redujo significativamente la carga bacteriana, ya que la interacción con las nanopartículas de hierro redujo la población bacteriana, que se redujo por completo cuando no se modificó. Por otro lado, al comparar la Tabla 4-4 y la Tabla 4-5 en Agar Nutritivo ocurre lo mismo.

Sin embargo, los resultados de la Tabla 4-4 y Tabla 4-5, mostraron que la adición de nanopartículas inhibió directa y completamente el crecimiento bacteriano, ya que después de un proceso de incubación de 48 h, la placa en la que se colocaron las nanopartículas no mostró signos de crecimiento bacteriano, mientras que la placa sin nanopartículas había crecido, si lo había.

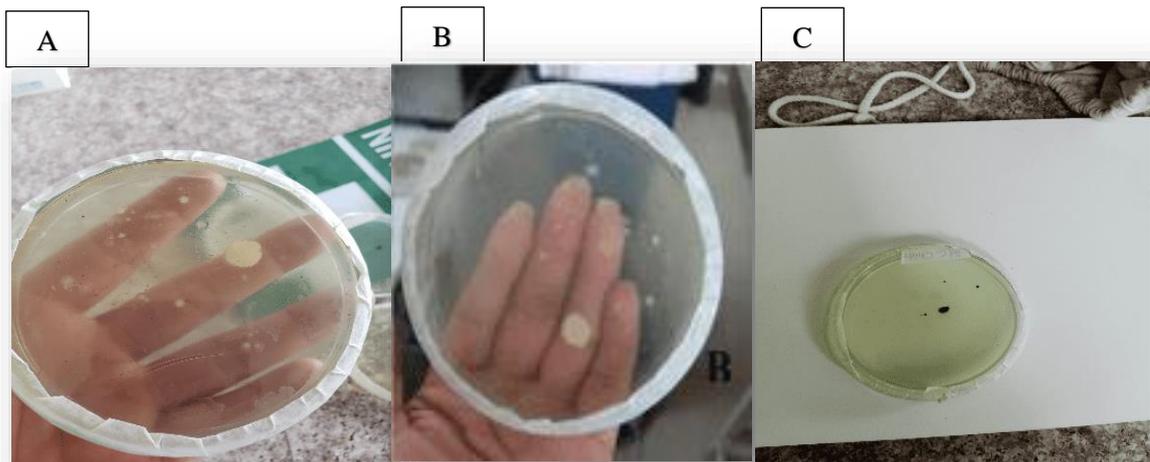


Ilustración 4-14: (A) Crecimiento bacteriano sin nanopartículas; (B) Disminución de colonias 1h de exposición; (C) Disminución total de la carga bacteriana

Realizado por: Cazco P, 2023

Por otro lado, el análisis comparativo de la Tabla 4-5 y Tabla 4-6, indica que las nanopartículas de hierro mediante su aplicación de manera directa y en estado 100% puro se observa que inhibe completamente el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Mientras que, en las placas donde se colocó las nanopartículas de hierro al cabo de 48 horas de incubación no se presenció crecimiento bacteriano mientras que si hubo crecimiento en aquellas placas que no contenían nanopartículas de hierro (Figura 4-14).

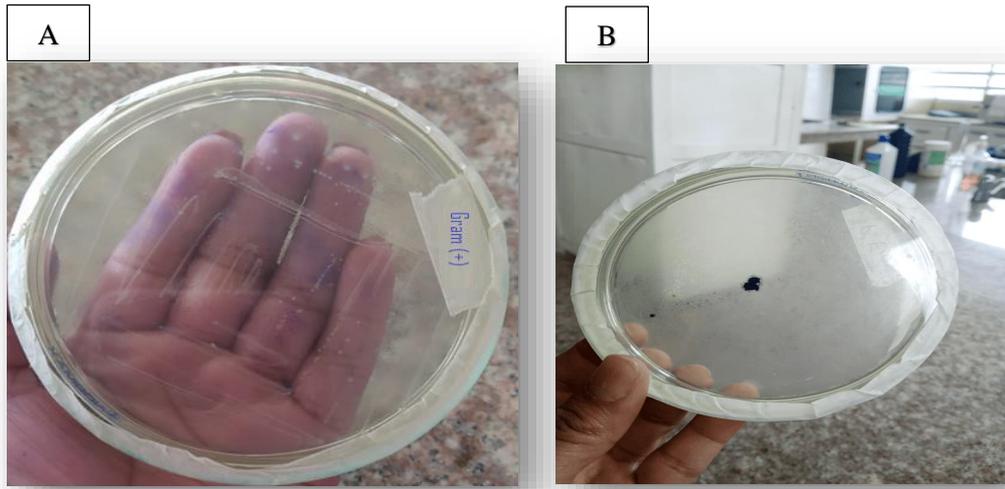


Ilustración 4-15: (A) Crecimiento de colonias Gram positivas sin NPs; (B) Placa con nanopartículas de hierro sin crecimiento

Realizado por: Cazco P., 2023

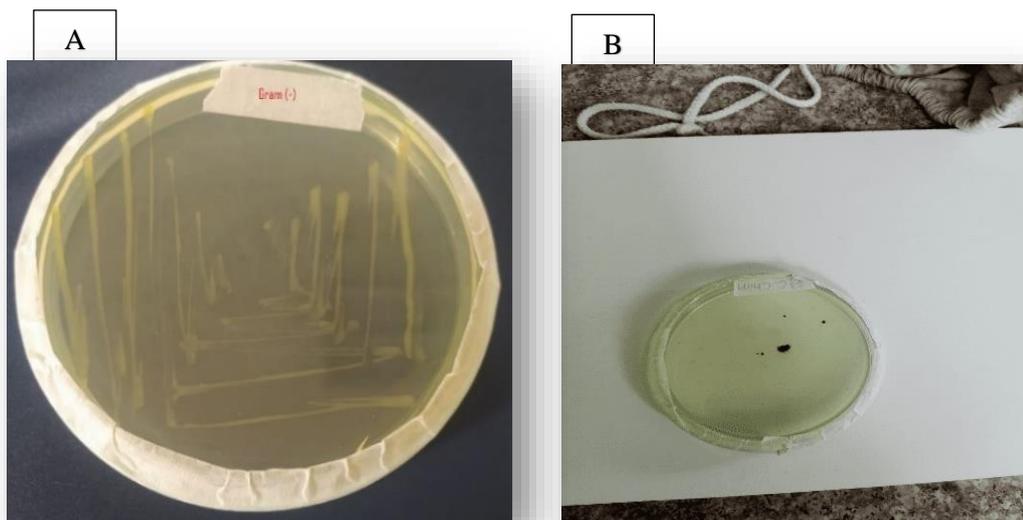


Ilustración 4-16: (A) Crecimiento de colonias Gram negativas sin NPs; (B) Placa con nanopartículas de hierro sin crecimiento

Realizado por: Cazco P., 2023

A partir de estos resultados, podemos demostrar que las nanopartículas de hierro sintetizada a partir del extracto acuoso de *Piper aduncum* es un potencial bactericida contra bacilos Gram negativos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella entérica*, *Salmonella paratyphi*, *Shigela flexnery*, *Proteus mirabilis* y *Edwardsiella 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.

4.6.3.2. *Evaluación del efecto del tiempo de exposición de las muestras de agua de Río a las nanopartículas de hierro.*

En relación con la Tabla 4-2, existió una disminución considerable de las bacterias ya que, el número de colonias bajó de 21 a 0 en 6 horas expuestas totalmente al sol, al igual con la tabla 4-3, el número de colonias bajó de 14 a 0 en 6 horas expuestas totalmente al sol, lo que nos permite deducir que el tiempo de interacción entre el agua y las nanopartículas es esencial dentro de la investigación y mientras mayor sea el tiempo de exposición existirá un bajo número de bacterias, teniendo una relación inversamente proporcional. 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.

4.6.3.3. *Evaluación del efecto de la luz solar sobre las muestras de agua de Río con nanopartículas de hierro.*

En relación con la Tabla 4-2 y Tabla 4-3, se verificó que las nanopartículas de hierro puestas al sol presentan su actividad fotocatalítica, lo que contribuyó a la reducción de la carga bacteriana, de tal forma que los resultados obtenidos son bastantes buenos. Por otro lado, la Tabla 4-2 y Tabla 4-3, reflejan una disminución de las bacterias al combinar con las nanopartículas de hierro. Sin embargo, las nanopartículas que fueron exhibidas al sol, la disminución de bacterias fue baja.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- Se ha demostrado que el extracto de *Piper aduncum* (matico) es muy eficaz para la elaboración de nanopartículas de hierro debido a su buena estabilidad en solución y a las longitudes de onda UV-Vis que presenta, las nanopartículas de hierro muestran un comportamiento resonante. Además, presentan una alternativa sostenible para el tratamiento de muestras de agua del Río Chibunga.
- Las nanopartículas de hierro se caracterizaron por espectroscopia UV-Vis arrojando como resultado un pico de 194 nm y de absorbancia de 3.307 los mismos que se encuentran dentro de los rangos establecidos. Por lo tanto, se puede confirmar que el compuesto sintetizado es hierro y es una muestra pura, también se identificó la morfología de las nanopartículas de hierro mediante el empleo del microscopio electrónico de barrido.
- Se evaluó la capacidad antimicrobiana de nanopartículas de hierro mediante pruebas de inhibición bacteriana corroborando que sí presentan actividad bactericida, ya que la carga bacteriana se redujo significativamente cuando las muestras de agua del Río Chibunga se expusieron a la presencia de nanopartículas de hierro.

RECOMENDACIONES

- Una vez que se prepara un extracto verde, se recomienda realizar una evaluación exhaustiva para obtener una comprensión más segura de los compuestos químicos presentes en la planta puesto que estos cumplen una función muy importante como agentes estabilizantes y reductores de las nanopartículas.
- Para el análisis en el SEM, se recomienda secar las nanopartículas utilizando métodos alternativos, como por ejemplo la liofilización que es útil para evitar que las nanopartículas se aglomeren.
- Se recomienda profundizar más sobre el tema, en base al estudio de los mecanismos de reducción y estabilización de nanopartículas con espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), ampliando así la información para nuevos estudios de validación y caracterización de nuevos compuestos.
- Se recomienda caracterizar las nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) para obtener el tamaño exacto del núcleo metálico de las nanopartículas de hierro, que forma parte de la cadena de nanopartículas agregadas.

BIBLIOGRAFÍA

ABARCA LEÓN, G., et al. (2019). Síntesis y caracterización de nanopartículas de hierro para la remoción de aguas de suelo en Bolivia. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad Continental, Facultad de Ciencias de la Salud. (Bolivia). 2018. pp. 7-64 [Consulta: 13 de octubre 2022]. Disponible en: https://repositorio.continental.edu.pe/bitstream/20.500.12394/7198/3/IV_FCS_508_TI_Abarca_León_2018.pdf

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: 10 de diciembre 2022]. Disponible en: https://repositorio.continental.edu.pe/bitstream/20.500.12394/7198/3/IV_FCS_508_TI_Acosta_Mejia_Zanabria_2018.pdf

ADENIYI OWOADE, A., et al. "Biodegradation kinetics of hidrocarbons in soil during land treatment of oily sludge". *Bioremediation Journal* [En línea], 2018, (España) 7(3), pp. 45-62. [Consulta: 25 de diciembre 2022]. ISSN 2405-8440. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Desktop/ARTICULOS%20AJUSTE%20PH/NPS%202%20comparar.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-nanopartículas-de-origen-natural>

ALBERS HIDALGO, P. et al. "Green synthesis of iron nanoparticles using Bougainvillea leaves aqueous extract and antibacterial activity evaluation". *Chemistry International* [En línea], 2019, (Jordania) 7(3), pp. 155-162. [Consulta: 11 de diciembre 2022]. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Desktop/ARTICULOS%20AJUSTE%20PH/NPS%202%20comparar.pdf>

ALLOWAY, B. "Land contamination and reclamation". An introduction to Environmental Chemistry and Pollution [En línea], 2020, (Nicaragua) 10(2), pp. 19-28. [Consulta: 17 de Agosto 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 nanopartículas 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%2520de%2520agua.pdf>

ALVARES MANILLA ACEVEZ, Antonio, Y MARTINEZ PEÑA , Gabriela. Metodología para saneamiento de acuíferos profundos por derrame de hidrocarburos. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado). UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA, Quito, Ecuador. 2020. pp. 1-134. [Consulta: 15 de enero 2023]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/5725/MTcecuna.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

AZPILCUETA SANTILLANA , M, et al. Importancia de la sostenibilidad del agua como recurso natural. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias de la Salud. (Colombia). 2019. pp. 1-109 [Consulta: 1 de octubre -2022]. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Downloads/2224-Texto%20del%20art%C3%ADculo-10586-1-10-20210816.pdf>

BARRANTES, R., & GONZÁLES, L. "Impacto de las nanopartículas de hierro y plata en la germinación de semillas y diferencias en la biodisponibilidad durante la exposición en suspensión acuosa y suelo. [En línea], 2020, (Chile) 40(60), pp. 346-376. [Consulta: 14 de noviembre 2022]. ISSN 1697-2473. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Downloads/2224-Texto%20del%20art%C3%ADculo-10586-1-10-20210816.pdf>

BRAULT, J., & MARMANILLO, I. "Obtenido de tres soluciones para una mejor gestión de las aguas residuales en Guayaquil, Ecuador". Banco Mundial . [En línea], 2020, (Guayaquil-Ecuador) 1(5), pp. 12-20. [Consulta: 1 de julio 2022]. ISSN 946-957. Disponible en: [file:///C:/Users/IDC/Downloads/moralesvju,+04_Articulo+NPs+\(Nanopartículas+y+antibióticos\).pdf](file:///C:/Users/IDC/Downloads/moralesvju,+04_Articulo+NPs+(Nanopartículas+y+antibióticos).pdf)

BRAVO LINARES, C., & OVANDO FUENTEALBA, L. "Comparative evaluations of five plant extracts and juices for nanoiron". *Science of the Total Environment*. [En línea], 2020, (España) 3(5), pp. 10-70. [Consulta: 1 de julio 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/MTcecuca.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

COLCHA CHAVARRA, 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.espech.edu.ec/bitstream/123456789/15058/1/86T00155.pdf>

ESPINOSA, E., et al. "Métodos caracterización nanopartículas: microscopia electrónica de barrido (SEM). *Química pura* [En línea], 2019, (Brasil) 36(1), pp. 298-324. [Consulta: 25 de julio 2022]. ISSN 0120-7531. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v36n1/2011-7531-sun-36-01-298.pdf>

FERNÁNDEZ M., et al. "Residual impact of aged nzvi on heavy metal-polluted soils". *Total Environ.* [En línea], 2018, (Argentina) 10(16), pp. 190-270. [Consulta: 25 de septiembre 2022]. ISSN 0120-7531. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v36n1/2011-7531-sun-36-01-298.pdf>

GÓMEZ TONDA, P., 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 diciembre 2022]. ISSN 2604-1227. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmof/v94n5/0187-4519-rmo-94-5-221.pdf>

GONZALES RABBIOSI, Luis. "Los contaminantes emergentes de las aguas residuales de las industrias farmaceuticas y su tratamiento por medio de la ozonización ". *Repertorio de Medicina y Cirugía* [En línea], 2019, (España) 27(2), p. 249-263. [Consulta: 3 de junio 2022]. ISSN 777-7780. Disponible en: <https://www.fucsalud.edu.co/sites/default/files/2018-08/Art-1.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: 197 de junio 2022]. ISSN 2588-073x. Disponible en: <https://www.recimundo.com/index.php/es/issue/view/21/4>

GUANOLUISA YEPEZ, Marta. 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>

GUTIERREZ, L., et al. *Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico* [En línea]. Zaragoza México: UNAM SEF. [Consulta: 02 de diciembre 2022]. 2018. Disponible en: <https://www.zaragoza.unam.mx/wpcontent/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Tinciones.pdf>

IRIARTE BECERRA, R., & ZORRILLA, C. "Caracterización de la estructura fina de nanopartículas de hierro de valencia cero para la descontaminación de nitritos y nitratos en aguas residuales y subterráneas". *Ciencia. Tecnología.* [En línea], 2020, (México) 1(1), pp. 10-37. [Consulta: 19 de agosto 2022]. ISSN 1104-0564. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Downloads/biomolecules-11-00564.pdf>

HEREDIA BECERRA, R., & ZORRILLA, C. "Electron microscopy characterization of biosynthesized iron oxide nanoparticles: An Update on Their Applications in Biomedicine,

Mechanisms, and Toxicity". *Biomolecules* [En línea], 2020, (México) 1(1), pp. 10-37. [Consulta: 19 de agosto 2022]. ISSN 1104-0564. Disponible en: file:///C:/Users/IDC/Downloads/biomolecules-11-00564.pdf

KUKLINSKI, Claudia. *FARMACOGNOSIA estudio de las drogas y sustancias medicamentosasde origen natural* [en línea]. Barcelona, España: OMEGA, 2000. [Consulta: 11 de noviembre dicimebre 2022]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/280112637/100352432-Farmacognosia-C-Kuklinski-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 nanoparticulas 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, preservacion, y transporte de muestras de agua de consumo humano para análisis de laboratorio". *Salud Ambiental* (2019), (Colombia) p. 19.

MACHADO, Santiago (ed.). " Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts". *Science of the total Environment*. [En línea]. (República Dominicana), 2019. [Consulta: 11 de noviembre 2022]. Disponible en: file:///C:/Users/IDC/Downloads/valeria_sias,+Journal+editor,+con-14.pdf e

MAKAROV, S. *FBiosynthesis of Stable Iron Oxide Nanoparticles in Aqueous Extracts of Hordeum vulgare and Rumex acetosa Plants*". [En línea]. 2ª ed. España: Díaz de Santos, 2019. [Consulta: 30 de julio 2022]. Disponible en: file:///C:/Users/IDC/Downloads/biomolecules-11-00564.pdf

MEDINA TORRES, Rodrigo Alfonso. ANanopartículas: estructura, propiedades, preparación y comportamiento en medios ambientales. *Ecotoxicología*. [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>

MOLLOGÓN, T., et al. *Efectos del nanohierro transmitido por el agua en medaka (Oryzias latipes): actividad enzimática antioxidante, peroxidación lipídica e histopatología*. [En línea]. 2ª ed. España: Díaz de Santos, 2018. [Consulta: 30 de julio 2022]. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Downloads/biomoleculas-11-00564.pdf>

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

MOTAKEF, S., et al., "*Papel importante que desempeñan los rios para el desarrollo de la sociedad*". [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad de Cordoba, Facultad de Ciencias Básicas (Córdoba-España). 2029. pp. 1-35 [Consulta: 10 de julio 2022]. Disponible en: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/3572/viloriasotomariafernanda-maderalopezdaniela.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

NTE INEN 2226:2013. Agua. Calidad del agua. Muestreo. Diseño de los programas de muestreo. [En línea], [Consulta: 01 de febrero 2023]. Disponible en: <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2226-1.pdf>

OMS. (2021). *Resistencia Bacteriana*. [En línea]. Ecuador: Organización Mundial de la Salud, 2021. [Consulta: 06 de agosto 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>

ORTEGA, D., et al. *Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability.* *Reinar.Ciencia .Tecnologia.* [blog]. España. [Consulta: 10 de agosto 2010]. Disponible en: <https://www.servindi.org/actualidad-cronica-noticias-radioteca-audios/09/03/2020/de-las-aguas-cristalinas-España>

PALACIOS FARIAS, Silvia Elizabeth. Frecuencia de *Escherichia coli* resistente a antibioticos aisladas del agua del rio de Piura, Perún 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 bentonicos en el Rio 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

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.

REYES , P, et al. Un enfoque ecológico y sencillo para la síntesis de nanopartículas de magnetita. [En línea]. Madrid-España: Editorial Elearning, S.L, 2020. [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., "Pruebas microbiológicas para el análisis de bacterias rrecurrentes en muestras de agua en la Ciudad de Santiago de Chile: Metodo de Difusión Agar: (Chile). *Revista Microbiologia.* [En línea], 2018, 29(1), pp. 9-12. [Consulta: 15 de diciembre 2022]. ISSN 1669-6840. Disponible en: <file:///C:/Users/IDC/Downloads/2779-8642-2-PB.pdf>

ROJAS MAYORGA, J., & MONTOYA AGUILAR, R. "Propuesta al tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Yaguachi (Ecuador)". *Revista Ciencia e Ingenieria.* [En línea], 2020, (Ecuador) 1(8), pp. 1-25. [Consulta: 16 de junio 2022]. 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%20C3%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.iberomx.mx/bitstream/handle/iberomx/2387/016807s.pdf?sequence=1>

SALGADO, Pablo., MÁRTIRE, Daniel., & VIDAL, Gladys. "Efecto bactericida de nanopartículas de hierro de valencia cero en *Escherichia coli*. *Reinar.Ciencia.Tecnologia.* [En

línea], 2019, (Chile) 21(48), pp. 10-55. [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>

SANTORUM DELGADO, Lilia itzel. Metodos caracterización de nanoparticulas de Fe y FeO: Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV). [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestria) Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. (Saltillo-México). 2019. pp. 35-78. [Consulta: 02 de diciembre 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-NSF.pdf>

TORRES, M., & TRUJILLO, D. Aplicación de nanoparticulas de Fe(0) sintetizadas con extracto de mora (*Rubus glaucus*) en suelos contaminados artificialmente con fenantreno para su remoción". [En línea]. (Sangolqui - Ecuador). 2021. pp.90-100. [Consulta: 15 de agosto 2022]. Disponible en: <http://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/3630/1/IGLIN-255065-0522-522-Jacqueline%20Torres%20Lima%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.

VERA MARTÍNEZ, Carlos., & LÓPEZ GARCIA, Martha. "Síntesis verde de nanopartículas de óxido de hierro. Desarrollo de materiales Híbridos magnéticos para la eliminación eficiente de As(V)". *Rev. Química*. [En línea], 2029, (Colombia), 15(26), pp. 35-56. [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>

WANG TING, & JIN XIAOYING. " Green synthesis of Fe nanoparticles using eucalyptus leaf extracts for treatment of eutrophic wastewater". *Mundo nano* [En línea], 2019, (China) 11(21), pp. 20-44. [Consulta: 18 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: 25 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

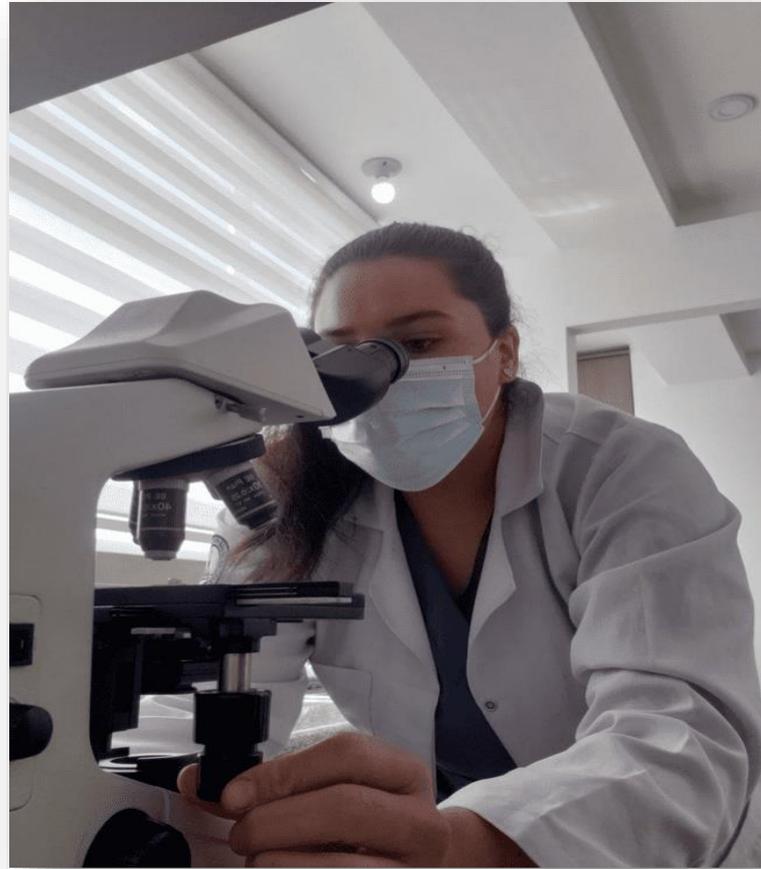
ANEXO A: DILUCIONES DE LAS MUESTRAS DE AGUA TOMADAS EN LOS PUNTOS DIFERENTES DEL RÍO CHIBUNGA



ANEXO B: REALIZACIÓN DE LA TINCION GRAM



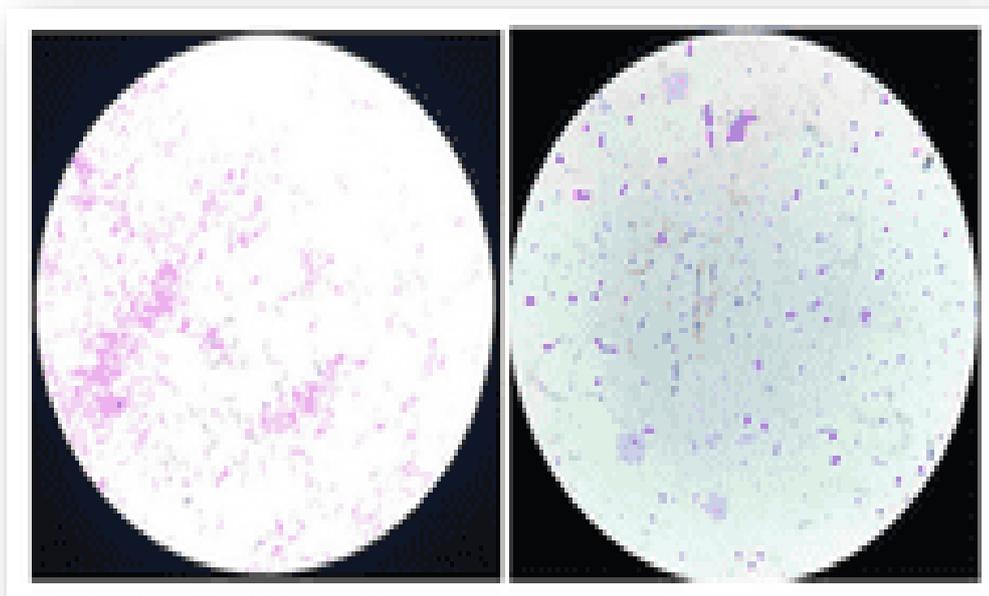
ANEXO C: VISTA AL MICROSCOPIO DE LAS COLONIAS BACTERIANAS PARA SU IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA



ANEXO D: SIEMBRA EN AGAR NUTRITIVO DENTRO DE LA CAMARA DE FLUJO



ANEXO E: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS Y COCOS GRAM POSOTIVOS



ANEXO F: REPORTE URKUND

Document Information

Analyzed document	PAMELA CAZCO 2.pdf (D159615280)
Submitted	2/27/2023 5:06:00 PM
Submitted by	MISHELL MORENO
Submitter email	mishell.moreno@epoch.edu.ec
Similarity	5%
Analysis address	mishell.moreno.epoch@analysis.orkund.com

Sources included in the report

SA	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO / Pamela Cazco.pdf Document Pamela Cazco.pdf (D159289542) Submitted by: mishell.moreno@epoch.edu.ec Receiver: mishell.moreno.epoch@analysis.orkund.com	 2
SA	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO / ErikaYanchapanta.pdf Document ErikaYanchapanta.pdf (D130719653) Submitted by: mishell.moreno@epoch.edu.ec Receiver: mishell.moreno.epoch@analysis.orkund.com	 2
SA	TESIS MOGOLLON-VELOZ A..pdf Document TESIS MOGOLLON-VELOZ A..pdf (D112437776)	 1
SA	ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO / DayanaAlvarez.pdf Document DayanaAlvarez.pdf (D120404102) Submitted by: mishell.moreno@epoch.edu.ec Receiver: mishell.moreno.epoch@analysis.orkund.com	 3



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: 15 / 12 / 2023

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

ESPOCH - DBRAI
PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS
BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL
17 JUL 2023
REVISIÓN DE RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA
Por: *Rafael Inty Salto Hidalgo* Hora: 17:05

1468-DBRA-UPT-2023