

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO CÚPRICO SUSPENDIDO EN PBS EN CEPAS
BACTERIANAS ESTÁNDAR**

Tesis para la obtención de Título de Licenciado en Biología

Liz Milagros Flórez Palacios

Lima, Perú

2017

DEDICATORIA

*A mis padres y a mi hermano,
agradezco todos los días por ser la familia que somos.*

*A mi tía Liz ya mi abuelo Rodolfo,
porque cada momento con ustedes me llena de felicidad.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padre por ser mi mayor ejemplo a seguir, es la prueba más grande que tengo de que todo se puede lograr con perseverancia y siempre manteniendo los principios y valores adelante. Agradezco a mi madre porque cada día durante esta travesía me ha dado mensajes de apoyo y fortaleza para seguir adelante, enseñándome que valore y saque el provecho a cada día. Gracias a los dos por el apoyo y amor que me dieron cuando tuve que irme a hacer la pasantía lejos de casa; siempre me han apoyado cuando se trata de mi desarrollo profesional y me hacen sentir muy privilegiada de tenerlos como padres.

Agradezco a MSc. Dora Maurtua que ha sido mi mentora no solo en este estudio; sino desde mis primeros pasos por un laboratorio. Gracias por acogerme desde mis primeros años de universidad y enriquecer mis conocimientos en microbiología a lo largo de los años. Siempre le tendré mucho cariño y respeto a Ud. y a todo el grupo del laboratorio.

Agradezco a la Facultad de Ingeniería Química y Textil de la Universidad Nacional de Ingeniería, por permitirme hacer uso del óxido cúprico en mi estudio.

JURADO CALIFICADOR

Presidenta: Dra. Jasmín Hurtado

Secretario: MSc. Jaime Languasco

Vocal: Dr. Raúl Loayza Muro

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS

LISTA DE GRÁFICOS

ABREVIACIONES

GLOSARIO

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. HIPÓTESIS.....	6
III. OBJETIVOS.....	6
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
V. RESULTADOS	15
VI. DISCUSIÓN.....	23
VII. CONCLUSIONES.....	31
VIII.RECOMENDACIONES.....	32
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la prueba confirmativa del número de ufc/mL de las cepas utilizadas en este estudio.

Tabla 2. Susceptibilidad de cuatro cepas bacterianas ATCC a nanopartículas de óxido cúprico.

Tabla 3. Diámetro de halo de inhibición del óxido cúprico en cada cepa bacteriana.

Tabla 4. Susceptibilidad de cuatro cepas bacterianas ATCC a la suspensión desinfectante a partir de nanopartículas de óxido cúprico.

Tabla 5. Coeficiente fenólico del desinfectante frente a las 4 cepas bacterianas.

Tabla 6. Porcentaje de mortalidad total obtenido de la prueba de toxicidad realizada usando dafnias neonatas luego de 48 h.

Tabla 7. Diámetro del halo de inhibición de la suspensión desinfectante frente a cuatro diferentes temperaturas.

Tabla 8. Resultados de ANOVA sobre el efecto de la temperatura y la cepa bacteriana en el diámetro del halo de inhibición y la interacción de ambos.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráfica en función Probit siendo eje X el log [CuO] y el eje Y (Probit).

Gráfico 2. Efecto de los tratamientos en el número de individuos muertos (ANOVA, $p=0.000002$). Diferentes letras indican diferencia significativa (test de LSD, $p < 0.05$)

Gráfico 3. Diámetro del halo de inhibición a 3 temperaturas: 25, 37 y 42°C para cada cepa bacteriana. Diferentes letras indican diferencia significativa (test de LSD, $p < 0.05$)

ABREVIACIONES

ATCC - American Type Culture Collection

CL₅₀ - Concentración letal al 50%.

CF - Coeficiente Fenólico

CuO - Óxido de cobre (I) u óxido cúprico.

IAAS - Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud

LIA - Lysine Iron Agar

MIC - Minimal Inhibitory Concentration

MR-VP - Methyl Red Voges Proskauer Broth

NPs - Nanopartículas

PBS - Phosphate Buffered Saline

SIM - Sulfide, Indol, Motility Medium

TSA - Trypticase Soy Agar

TSB - Trypticase Soy Broth

TSI - Triple Sugar Iron Agar

UFC - Unidades formadoras de colonia

GLOSARIO

CL₅₀: Concentración en la cual una sustancia es capaz de causar la muerte del 50% de una población de organismos.

Coeficiente Fenólico: Valor que indica la potencia de una solución como desinfectante usando al fenol como control.

Cladóceros: Suborden de crustáceos que comprende 400 especies, casi todas de agua dulce, siendo las más conocidas las pulgas de agua (*Daphnia* sp.)

Daphnias o dafnias: Género de crustáceos planctónicos del orden Cladóceras comúnmente usados en estudios de toxicidad y/o ecotoxicología. Son conocidas por el nombre de “pulgas de agua” porque su forma de nadar es saltando; sin embargo, no guardan relación biológica con las pulgas de tierra.

Nanopartículas: Partículas con una dimensión menor a los 100nm.

Peroxidación lipídica: Es un proceso de degradación oxidativa a través del cual los radicales libres reaccionan con los lípidos de la membrana celular ocasionando el efecto conocido como reacción en cadena de un radical libre.

Suspensión: Es una mezcla heterogénea formada por un sólido en polvo, que se dispersa en un medio líquido.

RESUMEN

El cobre es un metal muy conocido y estudiado por poseer una potente actividad antimicrobiana. Su uso como sustancia es complicado por su difícil disolución; motivo por el cual en este estudio se usaron nanopartículas de óxido cúprico (CuO), sintetizadas a partir de acetato de cobre, suspendidas en Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7.4 para crear una sustancia desinfectante capaz de eliminar microorganismos causantes de infecciones intrahospitalarias. Primero se probó la actividad de las nanopartículas de óxido cúprico en cuatro cepas bacterianas ATCC comunes en ambientes intrahospitalarios (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) usando el Método Modificado de Pozos. Luego, se preparó el desinfectante haciendo una suspensión del óxido cúprico en PBS y se calculó su Mínima Concentración Inhibitoria (MIC), Coeficiente de Fenol (CF), toxicidad y temperatura. El desinfectante resultante tuvo un CF entre 1 y 2, indicando que puede ser hasta dos veces más potente que el fenol (desinfectante estándar). La MIC de esta suspensión fue de 16 mg/mL y en la prueba de toxicidad se determinó que la concentración letal del CuO que causa muerte en 50% de una población de dafnias fue de 57.4 mg/mL; por lo tanto, la concentración usada para el desinfectante está muy por debajo de la CL₅₀. Por último, el rango de temperatura en el cual el desinfectante actuó frente a las cepas fue desde los 25°C hasta los 42°C; indicando una mejor actividad a 37°C. Debido a su alta actividad antimicrobiana y a su inocuidad para el ambiente, las nanopartículas del óxido cúprico tienen un gran potencial para ser empleado como suspensión desinfectante.

Palabras clave: nanopartícula, óxido cúprico, Coeficiente de Fenol, CL₅₀

ABSTRACT

Copper is a metal known for its high antimicrobial activity. The use of copper as a substance is complicated because of its low dissolution. For this reason, in this study, nanoparticles of copper oxide or cupric oxide (CuO), synthesized from copper acetate, were suspended in Phosphate Buffered saline (PBS) pH 7.4 to obtain a disinfectant capable of killing bacteria causing hospital-acquired infections. First, the antimicrobial activity of cupric oxide was tested in four ATCC bacterial strains commonly found in hospital environments (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) using the antibiogram test. After preparing the disinfectant as a suspension of the cupric oxide in PBS, its Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Phenol Coefficient, toxicity and temperature were measured. The resulting disinfectant showed a Phenol Coefficient of 1 and 2, indicating twice the potency of phenol (standard disinfectant). The solution showed a MIC of 16 mg/mL, which was below the lethal dose that causes a 50% death in a population of daphnias (LC₅₀ = 57.4 mg/mL). Finally, the temperature in which the solution acted against the strains ranged from 25°C to 42°C, being 37°C the temperature in which the solution showed the best activity. Due to its high antimicrobial activity and environmental safety, the nanoparticles of cupric oxide have a great potential to be used as a hospital disinfectant.

Keywords: nanoparticle, cupric oxide, Phenol coefficient, LC₅₀

I. INTRODUCCIÓN

Desde el siglo XVIII y mucho antes del descubrimiento de los microorganismos causantes de enfermedades en el siglo XIX (1), se usaban sustancias conocidas como “desinfectantes” elaboradas a partir de agentes químicos y físicos. Desde ese entonces, el uso de los desinfectantes fue un área de estudio ampliamente descrita, desde la sola consideración de una sustancia como tal, hasta las clasificaciones que fueron apareciendo con el paso de los años.

En el presente, se sabe que un desinfectante es un agente capaz de matar microorganismos causantes de enfermedades, el cual es aplicado en objetos y superficies inertes (2). Existen tres clases de desinfectantes: químicos, físicos y biológicos, siendo la última, una clasificación reciente que considera a un desinfectante biológico porque la desinfección se realiza a través de un proceso biológico (p.ej., enzimático) (1).

Dentro de los desinfectantes químicos encontramos al cloro y sus compuestos, el fenol y sus compuestos fenólicos, bromo, alcoholes, yodo, ozono, compuestos amoniacales cuaternarios y a los metales pesados (3). Estos últimos han sido usados desde tiempos antiguos cuando los marineros se percataron de que las algas y hongos no crecían en el casco de los barcos que estaban enfundados en cobre (4).

En la actualidad, Chile, el primer productor de cobre en el mundo, está haciendo uso del cobre en la elaboración de prendas de ropa, toallas, cremas y champús, ya que es el único metal aprobado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (U.S. EPA, por sus siglas en inglés) como antimicrobiano y considerado amigable con el planeta (5). En el Perú, la Universidad Nacional de Ingeniería viene realizando estudios en la funcionalización de tejidos de algodón con nanopartículas de óxidos

semiconductores (óxido de zinc y de cobre) con el fin de ofrecer propiedades antimicrobianas y de protección UV luego de ser funcionalizados ya sea a través de un proceso de agotamiento o impregnación en los textiles (6).

En la actualidad, existen estudios relacionados con la actividad antimicrobiana del cobre en bacterias, virus y hongos, y se ha podido comprobar que este metal es capaz de matarlos sin ningún problema (7 - 10). Si nos enfocamos en su mecanismo de acción, se han encontrado varias formas por las cuales el cobre puede actuar sobre las bacterias. Uno de ellos es que el cobre tiene la capacidad de donar y aceptar electrones haciendo que se encuentre en constante oxidación y reducción (11), lo que permite que pueda alterar la estructura y función de las proteínas y lípidos que se encuentran tanto en la pared celular como en el medio intracelular de la bacteria. Asimismo, existen estudios que explican el mecanismo por el cual el cobre puede alterar la permeabilidad de la membrana celular de la bacteria (12). Esta alteración se da por la peroxidación del metal que induce al daño oxidativo de los lípidos de la membrana celular afectando el intercambio de proteínas desde el interior al exterior y viceversa, y los procesos metabólicos. El cobre no solo actúa a nivel de proteínas, sino también a nivel de los ácidos nucleicos alterando la estructura helicoidal del ADN (13). Si bien, el cobre ocasiona que la bacteria pierda su capacidad de replicarse al alterar su estructura molecular, se sabe que no genera mutaciones en el ADN (14).

Cualquiera de estos mecanismos afecta la supervivencia de las bacterias, pero dependerá de la concentración del metal para ver el efecto bacteriostático o bactericida. Sin embargo, existen cepas que pueden oponer resistencia (15), como *Xhantomonas campestris*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Thiobacillus* spp, *Pseudomonas syringae* y algunas variantes de *Escherichia coli*; siendo la causa más común de este fenómeno, la presencia de mutaciones que presentan las bacterias en los genes de susceptibilidad al cobre (16).

La actividad del cobre se ha visto comparada con la de la plata, ya que en ambos se observa una alta vulnerabilidad de las bacterias en comparación con otros metales, como el níquel. Existen estudios donde se demuestra que superficies de cobre y plata son las únicas que evitan la supervivencia de patógenos como *Escherichia coli* (17) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (18), aunque el cobre tiene una mejor actividad bactericida que la plata (19, 20).

El cobre, como muchos metales, no es fácil de disolver en cualquier solución (21) y sus propiedades fisicoquímicas y bactericidas se pueden ver mitigadas cuando entra en contacto con ciertos disolventes (22, 23). Es por esto que en varios estudios se ha empezado a utilizar el óxido cúprico (CuO), que aparte de ser más económico, puede mezclarse fácilmente con polímeros y seguir mostrando una fuerte actividad antimicrobiana (24). Ren y col. evaluaron el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de varios metales y óxidos de metales en *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus spp*, y se observó que las nanopartículas de óxido cúprico tuvieron un efecto bactericida tan bueno como las de cobre (25).

Las nanopartículas de óxido cúprico pueden ser sintetizadas a partir de diferentes compuestos, como sulfato de cobre, carbonato de cobre, nitrato de cobre, entre otros (26). En la actualidad, se vienen realizando estudios por la Facultad de Ingeniería Química y Textil de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) sobre la síntesis de nanopartículas de óxido cúprico a partir de acetato de cobre monohidratado y sulfato de cobre pentahidratado (27).

Las nanopartículas de óxido cúprico se encuentran en estado sólido como nanopolvo y son capaces de suspenderse en algunas sustancias. Sin embargo, algunos solventes, como el amoniaco, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y otros ácidos minerales pueden influenciar su actividad antimicrobiana (28). El dimetilsulfoxido (DMSO) al 5% es capaz de ayudar a las nanopartículas del óxido cúprico a suspenderse sin inhibir su actividad antimicrobiana (29). Sin embargo, por varias décadas, se ha sabido que el DMSO es una sustancia muy tóxica y

dañina para el ser humano, por lo cual su uso diario como parte de un desinfectante, afectaría la salud humana y, a la larga, el medio ambiente. En múltiples estudios se ha visto que el DMSO actúa como activador de células tumorales del colon (30) y que genera un potencial daño a células progenitoras hematopoyéticas (31), neuronales de la retina (32) y endoteliales de la córnea humana (33).

No existen muchas sustancias que pueden suspender el óxido cúprico y aquellas que sí pueden, disminuyen su actividad antimicrobiana e incluso pueden ser tóxicas para el ambiente. El buffer fosfato salino (PBS) ha sido utilizado en algunos estudios como sustancia dispersante o dispersora de nanopartículas de óxido de metales, como plata, zinc y cobre, y se ha visto que no afecta la efectividad de estos metales (25). Sin embargo, su toxicidad en conjunto con el óxido cúprico todavía no ha sido comprobada.

En la actualidad, se ha investigado sobre la actividad bactericida del óxido cúprico en microorganismos causantes de infecciones asociadas a la atención de la salud (34), donde se evidenció la capacidad antimicrobiana de las NPs de óxido cúprico frente a cepas intrahospitalarias aisladas del Centro de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Cayetano Heredia (34).

Las infecciones adquiridas en el hospital pueden volverse frecuentes si es que no se toman las medidas de seguridad e higiene correspondientes. Se asume fácilmente que es suficiente la protección de las manos con guantes quirúrgicos para prevenir el ingreso de bacterias a nuestro organismo. Sin embargo, estas también pueden ingresar por la vía respiratoria, parenteral y dérmica (35). Hay que considerar que la transmisión no solo se da con el ingreso y la estadía de un paciente, sino también cuando se reciben muestras de sangre, orina y heces del paciente. Cabe la probabilidad de que la parte externa del envase que contiene la muestra se encuentre contaminada.

Resino et al (2004) menciona una lista extensa de bacterias encontradas en laboratorios donde existen 8 agentes patógenos presentes en el 50% de los casos de infecciones adquiridas en ambientes intrahospitalarios: *Brucella spp.* (brucelosis), *Pseudomonas aeruginosa* (neumonía grave), *Coxiella burnetti* (fiebre Q), *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea), *Escherichia coli* (diarreas, náuseas y vómitos) *Francisella tularensis* (tularemia), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *Salmonella typhimurium* (diarreas, vómitos, náuseas) y *Chlaydophila psittaci* (psitacosis) (35). En la actualidad, la mayoría de desinfectantes comerciales ha demostrado que son capaces de inhibir a cepas bacterianas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (36,37). Sin embargo, no existen desinfectantes que eliminen bacterias como las mencionadas previamente en este estudio.

En este estudio, se elaborará un desinfectante, a partir de nanopartículas de óxido cúprico suspendidas en buffer PBS, que se espera que muestre potencia en la eliminación de bacterias relacionadas a IAAS y que, a su vez, no afecte el ambiente.

I. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de óxido cúprico suspendidas en buffer PBS actuarán como desinfectante en ambientes hospitalarios si demuestran su potencia frente a bacterias relacionadas a IAAS y su inocuidad al ambiente.

II. OBJETIVOS:

a. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la actividad de nanopartículas del óxido cúprico como desinfectante de ambientes hospitalarios frente a cepas de microorganismos ATCC relacionadas a IAAS.

b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la MIC de las nanopartículas del óxido cúprico.
2. Medir la susceptibilidad de las cuatro cepas bacterianas (*Salmonella typhimurium* ATCC 700720, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa*. ATCC 10145 y *Escherichia coli* ATCC 25922) al óxido cúprico a través del Método Modificado de Pozos.
3. Preparar la suspensión desinfectante usando las NPs de CuO y PBS pH 7.4
4. Obtener la MIC del desinfectante elaborado a partir de las NPs de óxido cúprico suspendido en PBS (pH 7.4)
5. Determinar la potencia de la suspensión de óxido cúprico como desinfectante realizando la prueba de Coeficiente de Fenol.
6. Realizar la prueba de toxicidad, usando dafnias como indicadores biológicos, a la suspensión desinfectante y obtenerlos valores del porcentaje de mortalidad y la CL₅₀.
7. Determinar si la MIC de la suspensión desinfectante es tóxica, comparando su valor con la CL₅₀.
8. Diferenciar la actividad de la suspensión desinfectante a diferentes temperaturas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Estandarización de las cepas de estudio a una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland

Para someter el óxido cúprico y la posterior suspensión desinfectante a las diferentes pruebas, se utilizaron cuatro cepas bacterianas que están en la lista de los patógenos más relacionados a IAAS (35) obtenidas del Laboratorio de Bacteriología (LID, UPCH) y Laboratorio de Microbiología (Pabellón Central, UPCH): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Salmonella typhimurium* ATCC 25241. Las cepas fueron sembradas en sus medios correspondientes: MacConkey agar, Manitol, Ceftriaxona Agar Base y XLD Agar, respectivamente. Se hizo la identificación de cada cepa siguiendo las siguientes pruebas bioquímicas convencionales: TSI, LIA, citrato, MR-VP, SIM y urea, las cuales permiten determinar la presencia de enzimas y/o el uso de vías metabólicas que realiza cada microorganismo en particular.

Luego de ser identificadas y antes de su uso en cada prueba, las cepas fueron activadas y estandarizadas a la escala de 0.5 de McFarland (1.5×10^8 ufc/mL) (38). Para activarlas, se cultivaron las cepas iniciales (no activas) por 24 h en caldo TSB. Pasado este tiempo, se centrifugó la cepa por 1 min y se decantó la solución quedando solo el pellet bacteriano al cual se le agregó 6 mL de buffer KH_2PO_4 pH 7.4. Se repitió este paso una vez más quedando un pellet bacteriano al cual se le volvió a agregar 6 mL de buffer y se homogenizó.

Para comprobar que la cepa tuviera una turbidez de 10^8 ufc/mL, se colocó una muestra de este cultivo con buffer (proporción 1:100) en cubetas que fueron leídas por el espectrofotómetro donde la solución debía mostrar una absorbancia de 0.28 ± 0.01 a una longitud de onda de 475 nm, definido por la norma 2149-01 de los estándares ASTM (39). Si la muestra presentaba una menor absorbancia, se

agregaba más cepa bacteriana y si presentaba una mayor absorbancia se agregaba más buffer hasta obtener la absorbancia requerida.

Como prueba confirmativa, se realizó la técnica de siembra en superficie en Agar Plate Count (PCA) para el recuento de colonias con el fin de obtener un valor específico de ufc/mL. Se hicieron 5 diluciones de cada cepa, se colocó 0.1 mL de cada dilución en la superficie del agar PCA y se dispersó usando un asa de Drigalsky (asa en L). Luego de la incubación de las placas en la estufa a 37°C por 24 h, se hizo el recuento de colonias de las placas que mostraban entre 30 a 300 ufc y se aplicó la siguiente fórmula:

$$ufc/ml = \frac{\# \text{ de colonias} \times \text{Inversa de dilución}}{\text{Vol de inóculo}}$$

Si el número obtenido es igual o cercano a 1.5×10^8 ufc/mL, entonces la cepa se encuentra estandarizada y apta para su uso en las siguientes pruebas.

Mínima Concentración Inhibitoria de NPs de óxido cúprico

Las nanopartículas de óxido cúprico utilizado en este estudio fueron proporcionadas por la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería. La síntesis se realizó a partir de acetato de cobre y se comprobó la presencia de las nanopartículas por medio de un análisis de microscopia electrónica de barrido (SEM). Todas las nanopartículas presentaban un tamaño menor a 100 nm (6)

Para poder determinar la MIC de las nanopartículas de óxido cúprico se realizaron cinco concentraciones de CuO: 4, 8, 16, 32 y 64 mg/mL. Se realizó la prueba de MIC en placas de microtitulación Marienfeld de 96 pozos con fondo plano. Se emplearon las cuatro cepas bacterianas previamente mencionadas (8 réplicas por cada cepa) las cuales pasaron por 7 tratamientos: 5 concentraciones de CuO, un

control positivo (medio de cultivo con cepa bacteriana) y un control negativo (sólo medio de cultivo). Una vez realizado, las placas de microtitulación fueron incubadas en la estufa por 24 h a 37°C. Pasada este tiempo, se tomó un inóculo de cada pocillo de la placa de microtitulación y se sembró en una placa de agar TSA, para confirmar los resultados de crecimiento bacteriano (Anexo 1 y 2). Para verificar la validez de la prueba, los pocillos del control positivo debían salir con crecimiento bacteriano y los pocillos del control negativo debían salir sin crecimiento alguno. Posteriormente, los resultados fueron expresados en mg/mL (40).

Confrontación del óxido cúprico con las cepas bacterianas

Se aplicó el Método Kirby-Bauer en agar TSA para determinar la susceptibilidad y/o resistencia de las cepas aisladas al óxido cúprico. Este método es comúnmente usado para ver susceptibilidad o resistencia a antibióticos (41). Se sembraron las cuatro cepas bacterianas (en escala 0.5 de McFarland), se hicieron 10 réplicas por cada cepa y se sembró en la superficie del agar siguiendo la técnica de diseminación en superficie. Para aplicar las nanopartículas de CuO en el centro del agar se utilizó un cilindro de acero de 6mm de diámetro, de modo que el nanopolvo sólo se distribuyó dentro del diámetro del cilindro. Pasada las 24 h, se midieron los halos de inhibición obtenidos usando una regla Vernier (Bel Art, Dyal Type 6932).

Preparación de la suspensión desinfectante

Para la preparación del desinfectante se utilizó Buffer PBS a pH 7.4 como dispersante, usado antes para la suspensión de nanopartículas de óxidos de metales (42). El PBS contenía 8 gr de NaCl 137 mM, 0.2 gr de KCl 2.7mM, 0.24 grKH₂PO₄ 1.8 mM y 1.44 gr Na₂HPO₄ 10 mM (43). Se probó que el pH del buffer fuese igual a 7.4 y en caso requiriera un ajuste se agregaba HCl o NaOH hasta

conseguir el pH adecuado. El buffer se esterilizó en una autoclave por 20 min a 121°C.

Se preparó el desinfectante suspendiendo el óxido cúprico (MIC: 16mg/ml) en buffer PBS pH 7.4, siguiendo la proporción mg/mL. Luego, se sonicó la mezcla para asegurar una dispersión óptima de las nanopartículas (25) (Anexo 3). Se usó el sonicador Braun-Sonic 2000 realizando 6 pulsos de sonicación de 3 s cada uno con un descanso entre pulsos de 1 segundo.

Determinación de la potencia, toxicidad al ambiente y temperatura de acción de la suspensión desinfectante.

Una vez realizada la suspensión se procedió a realizar las pruebas paramétricas para determinar la actividad de las nanopartículas del óxido cúprico como desinfectante:

1. Mínima Concentración Inhibitoria de la suspensión desinfectante
2. Prueba del coeficiente de fenol (potencia)
3. Prueba de toxicidad usando dafnias (toxicidad)
4. Prueba de temperatura

Mínima Concentración Inhibitoria de la suspensión desinfectante

Para determinar la MIC de la suspensión desinfectante, se aplicó el Método de Difusión en Pozos usando el óxido cúprico suspendido en buffer PBS a diferentes concentraciones: 4, 8, 16, 32 y 64 mg/mL. Se realizó la prueba de MIC en una placa microtitulación Marienfeld. Se hicieron 10 réplicas para cada cepa aplicando 7 tratamientos: 5 concentraciones del desinfectante, un control positivo (medio de cultivo con cepa bacteriana) y un control negativo (medio de cultivo). Las placas fueron incubadas en la estufa por 24 h a 37°C.

Pasadas las 24 h, se cultivó una muestra de cada pocillo de la placa de microtitulación en una placa de agar TSA. Para verificar la validez de la prueba, los pocillos del control positivo debían salir con crecimiento bacteriano, indicando que la cepa está activa y los pocillos del control negativo debían salir sin crecimiento alguno, indicando que el agar no estaba contaminado. Posteriormente, los resultados fueron expresados en mg/mL (40).

Coeficiente de Fenol de la suspensión desinfectante

Para determinar la potencia del desinfectante, es necesario que pase por la prueba del Coeficiente de Fenol. Esta prueba consiste en comparar la potencia del posible desinfectante con la del fenol, considerado desinfectante estándar (44). El fenol fue preparado mezclando 45 gr. de fenol en 0.5 L de agua estéril a 20°C (43). Se hicieron 5 diluciones del desinfectante (1:100, 1:50, 1:200, 1:250, 1:300) y 5 del fenol (1:25, 1:50, 1:75, 1:100, 1:125) en tubos y se pusieron en contacto con las cepas bacterianas.

Se puso un inóculo de la cepa en escala 0.5 de McFarland en cada dilución tanto para el fenol como para la suspensión desinfectante. Luego de 5 min del primer contacto bacteria-desinfectante o bacteria-fenol, se tomó un inóculo del tubo y se pasó a otro tubo con medio de cultivo líquido estéril y se realizó este procedimiento en todas las diluciones. Se repitió este proceso a los 10 y 15 min de contacto (44, 46).

Se realizaron 5 réplicas por cada tratamiento (Fenol, Desinfectante) y para cada cepa (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Salmonella typhimurium* ATCC 25241). Los tubos fueron llevados a la estufa por 24 h a 37°C y pasado este tiempo se observó el crecimiento bacteriano a través de la turbidez que mostraban los tubos.

Para obtener el coeficiente de fenol del desinfectante se aplicó una fórmula en base a los resultados obtenidos luego de las 24 h (47):

$$CF = \frac{\text{Dilución del fenol que mató a los 10 min pero no a los 5 min}}{\text{Dilución del desinf. que mate a los 10 min pero no a los 5 min}}$$

El valor del CF (Coeficiente Fenólico) puede ser mayor o menor a 1. Si el valor es menor a 1, nos indica que es menos potente que fenol y si el valor es mayor a 1, dependiendo del número, nos indicará dos cosas; primero, por cuánto la suspensión desinfectante es más potente que el fenol (desinfectante estándar) (46,48) y segundo, hasta cuantas veces se puede diluir la suspensión desinfectante para que siga teniendo la capacidad de matar a una cepa determinada (47).

Toxicidad

Debido a que no existe evidencia de la toxicidad del PBS en conjunto con el óxido cúprico al medio ambiente, fue necesario realizar la prueba de toxicidad. Para ello se usaron dafnias como indicadores biológicos, ya que por muchos años han sido usadas como modelo en el área de la toxicología (48,49). Se realizó el ensayo de toxicidad aguda establecido por Martínez-Jerónimo (2008). El individuo de estudio fue la especie *Daphnia magna*, proveniente del Acuario Neptuno SRL. Para la identificación de la especie se usaron 4 guías taxonómicas y un estudio de Toyota K y col, (50 - 54). Los individuos de esta especie son crustáceos macroscópicos de 2 a 5 mm de tamaño, de coloración entre amarillenta y anaranjada, con una carcasa transparente y una garra post-abdominal que presenta dientes uniformados en la zona posterior de la garra (Anexo 4, 5 y 6).

Estos individuos fueron sometidos a 6 tratamientos que consistieron de 5 concentraciones diferentes del óxido cúprico diluido en PBS: 8, 16, 32, 64, 128 mg/mL; más 1 control (sin óxido cúprico). Se hicieron 3 réplicas por cada

tratamiento y en cada réplica se usaron 10 dafnias neonatas. Se consideraron a dafnias neonatas las que tenían 24 h de nacidas (55,56).

Todos los tratamientos consistían de 25 mL de agua de pecera (donde estuvieron previamente las dafnias) y 25 mL del desinfectante. En el caso del control, se colocaron 50 mL de agua de pecera (Anexo 7 y 8). Cada 24 h se tomaba apuntes del número de dafnias vivas y muertas por cada tratamiento durante 2 días (55,57).

Luego se determinó el porcentaje de mortalidad a las 48 h y la CL_{50} del desinfectante (57), para lo cual se usó el método de análisis Probit ajustando los datos de mortalidad obtenidos en el experimento. Para ello, el porcentaje de mortalidad se expresó en proporciones (e.i. 20% = 0.2) y se ejecutó la función Probit en Excel (58). Una vez obtenido el valor de la CL_{50} , se determinó si la suspensión desinfectante era tóxica comparando el valor de la MIC con la de la CL_{50} .

Se realizó un ANOVA de una vía para determinar la influencia de la concentración del óxido cúprico (tratamientos) en la mortalidad de los individuos. Posteriormente, se hizo un test LSD para determinar si había diferencias significativas entre tratamientos, incluyendo el control.

Temperatura

Esta prueba se hizo con el fin de observar la actividad de la suspensión desinfectante a diferentes temperaturas. Primero, se cultivaron las cuatro cepas bacterianas (haciendo 12 réplicas por cepa) en una estufa por 24 h a 37°C. Pasado este tiempo se aplicó el Método Modificado de Pozos en agar. Este método es similar al método Kirby-Bauer que es usado para ver susceptibilidad o resistencia a antibióticos (41). En el trabajo realizado por López et al (2005) se ha comprobado que hay una diferencia significativa en la sensibilidad de ambos

métodos; habiendo resultados más confiables usando el Método Modificado de Pozos (59). En el centro de cada placa se hizo un agujero con un cilindro de metal esterilizado (diámetro: 6 mm), se colocó 25 uL de la suspensión desinfectante en el interior del agujero y se incubaron las placas en la estufa a 37°C por 24 h.

Luego fueron llevadas 3 placas (réplicas) de cada cepa a una temperatura diferente. Se hizo la prueba en cuatro temperaturas (5, 25, 37 y 42°C) por 24 h (60). Pasado este tiempo, se midió los halos de inhibición usando una regla de Vernier (Bel Art, Dyal Type 6932) y se apuntaron los datos.

La influencia de la temperatura y la cepa bacteriana en el diámetro del halo de inhibición fue determinada a través de un ANOVA de dos factores (Temperatura: 3 niveles, Cepa: 4 niveles). También se observó si ocurría interacción entre estos, usando el mismo análisis, para ver si ocurría un efecto aditivo. Luego, se hizo un test LSD para ver si había diferencias significativas entre cepas y entre temperaturas.

IV. RESULTADOS

1. Resultado de la estandarización del tamaño de inóculo de las cepas.

La prueba confirmativa demostró que las cuatro cepas bacterianas presentaban entre 1.45 a 1.52×10^8 ufc/mL (Tabla 1) y se encontraban aptas para su uso en las próximas pruebas.

Tabla 1 Resultados de la prueba confirmativa del número de ufc/mL de las cepas utilizadas en este estudio.

CEPA	ufc / mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1.45×10^8
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1.51×10^8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1.52×10^8
<i>S. typhimurium</i> ATCC 25241	1.5×10^8

2. Mínima Concentración Inhibitoria del óxido cúprico

La MIC del óxido cúprico fue 16 mg/mL para las cuatro cepas utilizadas (Tabla 2), lo que indica la resistencia de la cepa en concentraciones menores a 16 mg/mL. No hubo variación entre las 8 réplicas de cada cepa bacteriana, por consiguiente, no hubo desviación estándar en los datos.

Tabla 2 Susceptibilidad de las cuatro cepas bacterianas ATCC a nanopartículas de óxido cúprico.

Cepas ATCC	Concentraciones en mg/mL		
	Rango evaluado	MIC	%
<i>E. coli</i>	4 - 64	16	100
<i>S. aureus</i>	4 - 64	16	100
<i>P. aeruginosa</i>	4 - 64	16	100
<i>S. typhimurium</i>	4 - 64	16	100

3. Confrontación de óxido cúprico con las cepas bacterianas

La actividad del óxido cúprico se comprobó en las cuatro cepas bacterianas. El mayor halo de inhibición se pudo observar para *Escherichia coli* con una media de 15.78 mm \pm 0.45 (Tabla 3) mientras que la cepa que opuso más resistencia fue *Pseudomonas aeruginosa* (14.6 mm \pm 0.08) (Anexo 9). Es importante resaltar que los datos más dispersos se encontraron en *E. coli* mientras que en *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. typhimurium*, los datos se encontraron más cercanos a la media

Tabla 3 Diámetro de halo de inhibición del óxido cúprico en cada cepa bacteriana.

Tratamiento (16 mg)	Halo de Inhibición (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
Media \pm D.S.	15.78 \pm 0.45	14.92 \pm 0.16	14.6 \pm 0.08	15.28 \pm 0.10

4. Determinación de la potencia y eficacia de la suspensión desinfectante

4.1 Mínima Concentración Inhibitoria

La MIC de la nueva suspensión desinfectante fue de 16 mg/mL para *E.coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Siete réplicas de la cepa *S. typhimurium* se mostraron resistentes a esta concentración y susceptibles a 32 mg/mL de óxido cúprico; sin embargo 3 réplicas se mostraron susceptibles a la concentración de 16 mg/mL (Tabla 4). Además el 80% de las cepas de *S. aureus* fueron susceptibles a 16 mg/mL, a diferencia de *E. coli* y *P. aeruginosa* que mostró susceptibilidad del 100% de las cepas a esa concentración.

Tabla 4 Susceptibilidad de cuatro cepas bacterianas ATCC a la suspensión desinfectante a partir de nanopartículas de óxido cúprico.

Cepas ATCC	Concentraciones en mg/mL <small>n = 40</small>		
	Rango evaluado	MIC	%
<i>E. coli</i>	4 – 64	16	100
<i>S. aureus</i>	4 – 64	16	80
<i>P. aeruginosa</i>	4 – 64	16	100
<i>S. typhimurium</i>	4 – 64	32	70

4.2 Coeficiente de Fenol

Se hizo la prueba del Coeficiente de Fenol usando las cuatro cepas bacterianas. En *E. coli* se observó que en la dilución 1:50 el fenol logró matar a los microorganismos a los 10 min, mas no a los 5 min en todas las réplicas, y lo mismo ocurrió en la dilución 1:100 del desinfectante, lo cual indica un coeficiente fenólico de 2 (Tabla 5). En las tres cepas restantes (*S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S.*

typhimurium), se observó un resultado diferente a *E. coli*, ya que la dilución en la que tanto el fenol como el desinfectante lograron matar a los microorganismos a los 10 min y no a los 5 min fue de 1:50. Por lo tanto, el coeficiente fenólico en estas tres cepas del desinfectante fue de 1.

Tabla 5 Coeficiente fenólico del desinfectante frente a las 4 cepas bacterianas.

Cepa	Fenol	Desinfectante	CF*
<i>E. coli</i>	1:50	1:100	2
<i>S. aureus</i>	1:50	1:50	1
<i>P. aeruginosa</i>	1:50	1:50	1
<i>S. typhimurium</i>	1:50	1:50	1

* N° de veces que la sustancia es más potente que un desinfectante estándar

4.3 Toxicidad

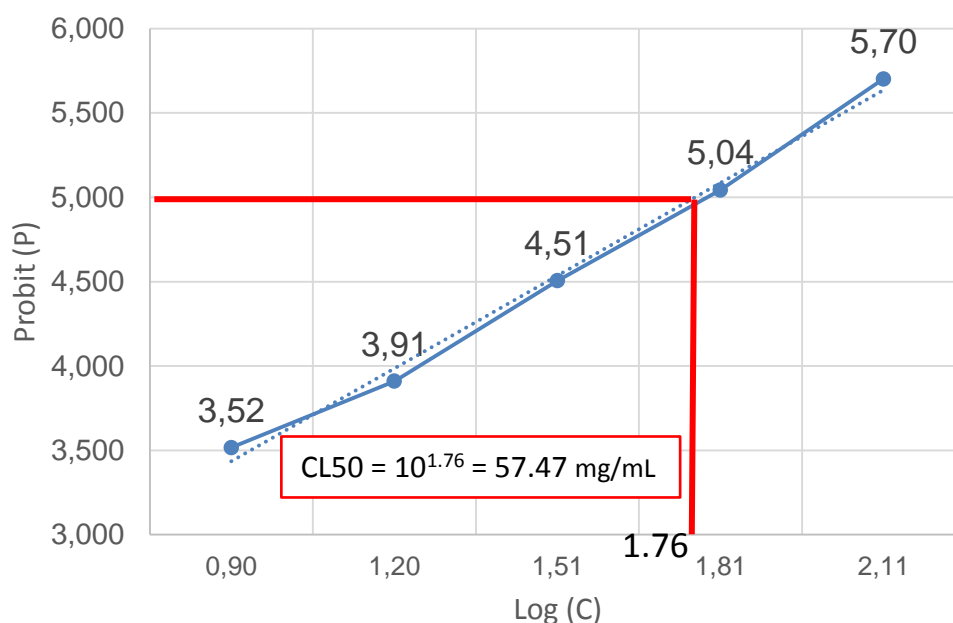
El porcentaje de mortalidad de las dafnias neonatas a las 48 h en el control negativo fue de 3.33%. La concentración de óxido cúprico usada para la preparación del desinfectante (16 mg/mL) fue el tratamiento D2, el cual mostró un 16.67% de mortalidad (Tabla 6), que es un valor considerado aceptable ya que no excede el 30% de mortalidad según lo preestablecido por Díaz et al (2008) (53).

Tabla 6 Porcentaje de mortalidad de las tres réplicas juntas obtenido de la prueba de toxicidad realizada usando dafnias neonatas luego de 48 h.

Tratamiento	CuO (mg/mL)	# vivos	# muertos	% de mortalidad
Control	0	29	1	3.33
D1	8	27	3	10.00
D2	16	25	5	16.67
D3	32	20	10	33.33
D4	64	14	16	53.33
D5	128	7	23	76.67

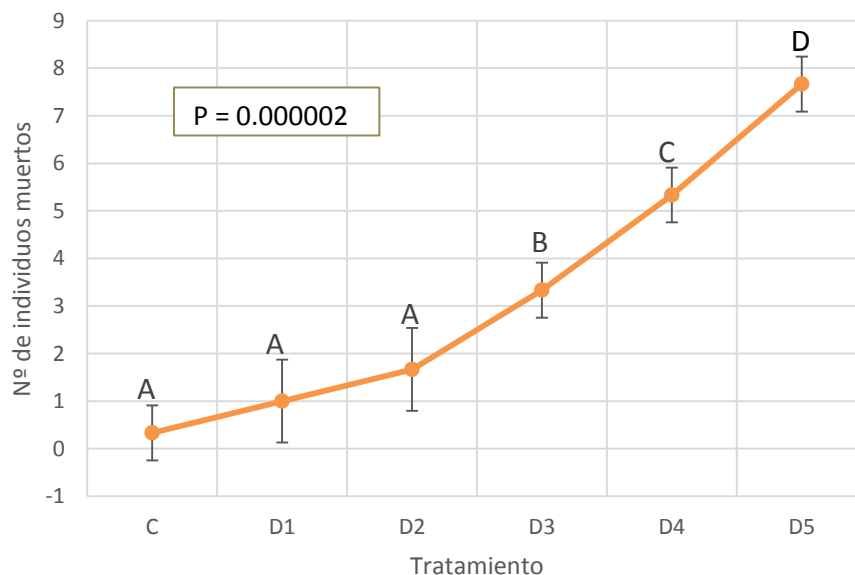
La CL₅₀ se pudo determinar de dos formas: matemática y gráfica; de forma matemática usando la función Probit en Excel que dio un valor de 57.4465mg/mL para la CL₅₀. Así también, este valor se pudo observar en el Gráfico 1, en la intersección en la línea logarítmica donde se unen el número “5” (50%) del eje Y (Función Probit) con el número del eje X (log [CuO]) dando un valor de “1.76”, que coincidía con lo obtenido de manera matemática en Excel (Anexo 10). Para obtener la CL₅₀, se sacó la inversa del logaritmo de este valor ($10^{1.76}$) siendo 57.47 mg/mL.

Gráfico 1 Gráfica en función Probit siendo eje X el log [CuO] y el eje Y (Probit).



El número de individuos muertos se vio influenciado por el tratamiento (ANOVA, $p=0.000002$). No hubo diferencias significativas entre el control, D1 y D2 (test LSD, $p>0.08$), pero si hubo diferencias entre el control, D1, D2 con los tratamientos D3, D4 y D5 (test LSD, $p<0.04$). Los tratamientos D3, D4 y D5 también fueron diferentes entre sí (test LSD, $p<0.02$).

Gráfico 2 Efecto de los tratamientos en el número de individuos muertos (ANOVA, $p=0.000002$). Diferentes letras indican diferencia significativa (test de LSD, $p < 0.05$)



4.4 Temperatura

La suspensión desinfectante mostró actividad desde los 25°C hasta los 42°C (Tabla 7). A los 5°C no hubo inhibición del óxido cúprico, ni tampoco crecimiento bacteriano. En las cuatro cepas se observó la mejor actividad antimicrobiana a los 37°C, dando la mejor inhibición para *E. coli* (15.33 ± 0.31) y la menos buena para *P. aeruginosa* (14.79 ± 0.18). Sin embargo, la actividad a los 25°C fue casi tan buena como a los 37°C; los halos de inhibición solo difirieron por 1 mm o menos en las cuatro cepas y a esta temperatura, la bacteria que mejor se inhibió fue *S. aureus*, seguida de *E. coli* y *S. typhimurium*. A los 42°C, la suspensión desinfectante tuvo una baja actividad antimicrobiana con valores entre 8.48 hasta 11.25 mm de diámetro de halo de inhibición (Tabla 7). Además se observó uniformidad con los datos, ya que mostraban D.S. menores a 1.

Tabla 7 Diámetro del halo de inhibición de la suspensión desinfectante frente a cuatro diferentes temperaturas.

Temperatura	Halo de Inhibición (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
5°C	0	0	0	0
25°C	14.48 ± 0.31	14.68 ± 0.26	13.9 ± 0.16	14.41 ± 0.25
37°C	15.33 ± 0.31	15.07 ± 0.13	14.79 ± 0.18	15.12 ± 0.28
42°C	11.25 ± 0.04	9.08 ± 0.47	10.07 ± 0.3	8.48 ± 0.41

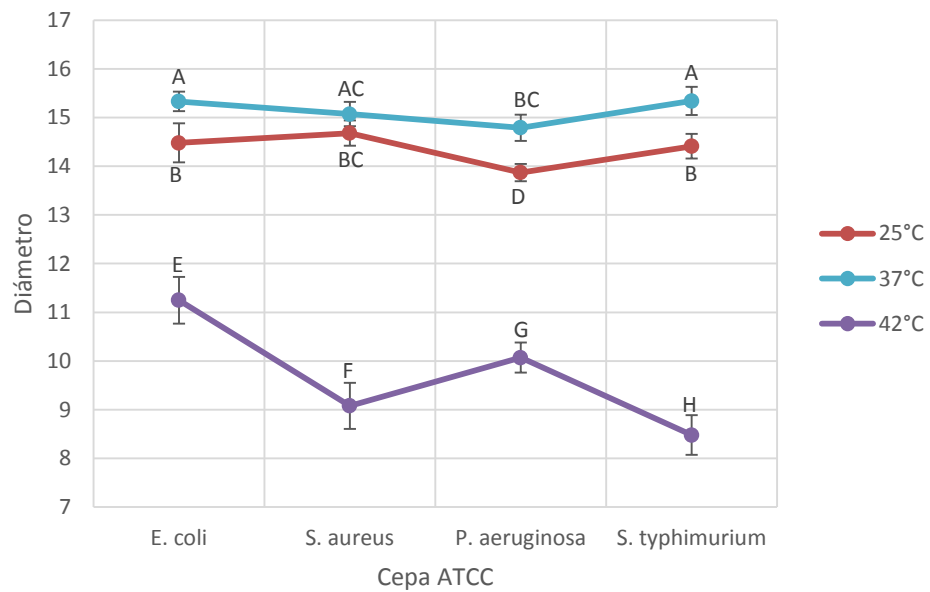
Nota: Cada valor está expresado como la media ± desviación estándar

El diámetro de inhibición se ve influenciado por la cepa (ANOVA, $p=0.0000$) y por la temperatura ($p=0.0000$). Además se observa una interacción entre ambos factores ($p=0.0000$) lo cual se puede interpretar como un efecto no aditivo de ambas variables. Los diámetros de inhibición se mostraron diferentes significativamente entre las temperaturas 25, 37 y 42°C para cada cepa ($p<0.001$), con excepción de *S. aureus* que no mostró diferencia significativa entre 25°C y 37°C ($p=0.1166$). A 25°C, se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos de *P. aeruginosa* comparado con las otras tres cepas ($p<0.04$). Por último, a 42°C, se observaron valores de inhibición diferentes entre las cuatro cepas ($p=0.0000$).

Tabla 8 Resultados de ANOVA sobre el efecto de la temperatura y la cepa bacteriana en el diámetro del halo de inhibición y la interacción de ambos.

	GL	MS	F	P
Cepa	3	5.29	17.40	0.000000
T°	2	342.81	1128.25	0.000000
Cepa*T°	6	5.65	18.58	0.000000
Error	108	0.30		

Gráfico 3 Diámetro del halo de inhibición a 3 temperaturas: 25, 37 y 42°C para cada cepa bacteriana. Diferentes letras indican diferencia significativa (test de LSD, $p < 0.05$)



V. DISCUSIÓN

La pregunta fundamental de este estudio está enfocada en la actividad de las nanopartículas de óxido cúprico como desinfectante para evidenciar sus propiedades antimicrobianas se usaron cuatro cepas bacterianas ATCC: *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 y *Salmonella typhimurium* 25241.

Estas cepas se usaron por pertenecer a la lista de agentes causales de IAAS (61), las cuales se generan por el alto nivel de contaminación presente en los ambientes del hospital. Esta contaminación se viene dando por varios factores, como la mala higiene del personal encargado de los pacientes, una descuidada limpieza de las superficies, ropas y demás implementos, y principalmente, la inefectividad de los desinfectantes usados frente a los microorganismos hospitalarios (62). Es por tal motivo que este estudio buscó evaluar la potencial actividad de las nanopartículas de óxido cúprico como desinfectante para estas cepas.

La primera prueba de la Mínima Concentración Inhibitoria se realizó para determinar la capacidad antimicrobiana del óxido cúprico puro – no suspendido en PBS - y se pudo observar que fue capaz de matar a los cuatro microorganismos a una concentración de 16mg/mL (Tabla 2). Esto concuerda con algunos estudios realizados previamente, donde se trabajó con nanopartículas de cobre, óxido cúprico (I) y óxido cuproso (II); y se comprobó su capacidad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus* (26). En el mismo estudio, se comprobó la actividad del óxido cúprico frente a *P. aeruginosa* pero se requirió mayor cantidad de CuO para ver el efecto. Cabe resaltar que en aquel estudio se utilizó 5×10^9 ufc/mL para cada cepa bacteriana mientras que en este estudio se utilizó 1.5×10^8 ufc/mL.

Estudios sobre la relación entre *S. typhimurium* y el óxido cúprico no se han evidenciado; sin embargo se tienen estudios sobre la respuesta (peroxidación

lipídica) de esta bacteria al estrés oxidativo ocasionado por el contacto con el cobre y todos los genes involucrados en este proceso (63). El gen *scs* ha sido encontrado en diversas especies bacterianas gram negativas y se sabe que le confiere resistencia al cobre a muchas de estas. Sin embargo, no le confiere la misma función a *S. typhimurium* (64). Este fundamento sería apoyado por el resultado obtenido en este estudio que indica que *S. typhimurium* no muestra resistencia frente a las nanopartículas de óxido cúprico en una concentración de 16 mg/mL. Por otro lado, *S. typhimurium* sí mostró resistencia a 16 mg/mL cuando las nanopartículas se encontraban suspendidas en PBS (Tabla 4), lo cual podría deberse a la presencia del buffer como parte del desinfectante. El PBS, con o sin reacción con el CuO, aporta iones cloruro que dificultarían su adherencia a cierto tipo de bacterias ya que las cargas negativas del ion cloruro se repelerían con las cargas negativas de los grupos fosfato de los fosfolípidos de la membrana externa de bacterias gram negativas, en este caso *S. typhimurium* (65). En consecuencia, el desinfectante no podría realizar sus mecanismos de actividad antimicrobiana dentro de la bacteria. Sin embargo, esto no ocurrió para las otras bacterias gram negativas: *E. coli* y *P. aeruginosa*.

En el mismo estudio de Gupta et al (1997) se observó que si bien el gen *scs* no le confiere función de resistencia al cobre a *S. typhimurium* como si lo hace con otras bacterias gram negativas; una de las proteínas elaboradas por este gen, conocida como ScsA podría estar funcionando como peroxidasa la cual previene la formación de radicales hidroxilos y por lo tanto, evitando el estrés oxidativo. Sin embargo, hay muchos factores que considerar antes de hacer esta suposición, como la cepa utilizada en el estudio mencionado se usó *S. typhimurium* SE5312 y SE5221 mientras que en este estudio se utilizó *S. typhimurium* 25241 (64).

Siguiendo con la prueba de la MIC, *S. typhimurium* fue susceptible a la suspensión desinfectante a 32mg/mL mientras que las otras tres cepas bacterianas lo fueron a 16 mg/mL. Es preciso señalar que el 70% de las réplicas de *S. aureus* fueron susceptibles a 16 mg/mL y hubo un 30% que fue susceptible recién a 32 mg/mL.

Esta variación puede ocurrir ya que existen estudios recientes que evidencian que la MIC de *S. aureus* para nanopartículas de CuO suspendidas en 100 mL de medio nutritivo y agua destilada puede ser incluso mayor a 25 mg/mL (60,66).

En su totalidad, los resultados son favorecedores ya que permiten considerar a las nanopartículas de óxido cúprico en PBS como suspensión desinfectante frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* que son agentes causales de las IAAS (67).

Para tener un valor cuantitativo de la inhibición del óxido cúprico frente a las cepas, se realizó un antibiograma utilizando el valor de la MIC del CuO (16 mg/mL) obtenida en el primer ensayo realizado. En previos estudios, ya se han hecho antibiogramas a las cuatro cepas para probar su resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos, plantas medicinales y desinfectantes (68).

Con respecto a metales, se ha utilizado el método de Dilución en Agar (69) donde diferentes concentraciones del metal son mezcladas con el medio de cultivo y luego de solidificar, se siembra la cepa y pasadas las 24 h se observa en qué concentraciones (placas) la cepa logró crecer. No obstante, en el estudio de Miranda et al (2006), se determinó el halo de inhibición siguiendo el fundamento del Método de Kirby-Bauer (discos de antibióticos), por lo que se procedió a utilizar el Método Modificado en Pozos, colocando el óxido de metal dentro de un pozo perforado en el centro del agar y pasadas las 24 h se midió el halo de inhibición (70). Este método modificado se ha usado en plantas medicinales y algunos antibióticos (42), mas no en metales. Debido a esto, no existen resultados previos sobre el halo de inhibición de las nanopartículas de óxido cúprico en microorganismos, por lo cual, no se puede obtener un criterio exacto sobre la susceptibilidad de estas cepas.

Es difícil tratar de extrapolar los resultados obtenidos en este óxido de metal con los comúnmente encontrados en antibióticos. Por un lado, las cuatro cepas

bacterianas estudiadas han sido muy empleadas para la determinación de susceptibilidad frente a antibióticos, pero por otro, el diámetro de inhibición de cada cepa varía debido a que cada antibiótico posee diferentes componentes siendo algunos más específicos que otros (71,72). No obstante, la mayoría de los diámetros obtenidos para los antibióticos más comunes (estreptomina, gentamicina, ampicilina, cefalexina y cloranfenicol) (73) frente a cepas bacterianas estándares suelen dar valores mayores a 14 mm de diámetro en cepas susceptibles o de nivel intermedio, lo cual estaría en congruencia con los resultados obtenidos con las nanopartículas de óxido cúprico que dieron halos de inhibición desde 14.6 hasta 15.78 mm de diámetro. Esta especulación solo se fundamenta en base a lo descrito previamente, ya que no existe norma que determine cuando una bacteria es resistente o susceptible a un metal y/o óxido de metal. Aun así, es importante resaltar que no es la primera vez que se está comparando la actividad del óxido cúprico con la de un antibiótico. En un estudio realizado por Azam et al (2012), se comparó la actividad de nanopartículas de óxido cúprico - sintetizadas a partir de nitrato de cobre trihidratado y ácido cítrico usando el método de combustión en gel – con la tetraciclina, y también se encontraron halos de inhibición con diámetros similares entre ambos tratamientos (74).

Para la prueba de coeficiente de fenol, la suspensión de nanopartículas de óxido cúprico mostró dos valores de CF: 2 para *Escherichia coli* y 1 en las tres cepas restantes (*S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*) (Tabla 5). Estos valores aparte de ser favorecedores en cumplir el objetivo de este estudio, son más fiables ya que se hizo la prueba en cuatro cepas bacterianas; a diferencia de lo que comúnmente se hace, que es medir el coeficiente fenólico solo en *E. coli* (75-77).

Al ser el valor del CF igual a 1 (*S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*) y mayor a 1 (*E. coli*), nos estaría indicando que la suspensión a base de nanopartículas de óxido cúprico tiene igual o mayor potencia como desinfectante que el fenol; es decir, su potencia está por encima de un desinfectante estándar

(47). El valor CF en otros desinfectantes ha oscilado desde 1 hasta 40, pero es importante recalcar que la concentración que se está usando para elaborar el desinfectante es la mínima inhibitoria. Por lo tanto, si se usara una mayor cantidad de nanopartículas de óxido cúprico, posiblemente el valor del CF sería mucho mayor. Sin embargo, se decidió usar 16 mg/mL, porque una baja concentración de óxido cúprico también implica; menos exposición de este óxido de metal al ambiente.

En relación al ambiente, fue necesario determinar la toxicidad de la sustancia que se está elaborando para controlar su liberación y evitar cualquier posible daño. La prueba de toxicidad fue esencial ya que no serviría de nada tener un desinfectante potente contra las bacterias y que a la vez dañe el medio ambiente y la salud humana. Según Díaz et al (2008), para considerar una sustancia como poco tóxica, debe generar menos del 30% de mortalidad en la población de dafnias. Debido a que en la concentración de 16mg/mL (D2) se obtuvo una mortalidad de 16.67%, podemos indicar que la suspensión desinfectante es inocua al ambiente (58).

Además del porcentaje de mortalidad, también fue necesario determinar la CL_{50} de las nanopartículas de óxido cúprico para conocer a qué concentración el CuO podría ser muy letal. Se obtuvo un valor de 57.47 mg/mL indicando que a esta concentración de óxido cúprico, muere el 50% de la población de estudio y por lo tanto, no debería ser usada para la elaboración de ningún producto, ya sea un desinfectante, textiles funcionalizados con nanopartículas de óxido cúprico, entre otros. La concentración usada para la elaboración del desinfectante fue de 16 mg/mL por lo que está bastante alejada de la CL_{50} .

Los resultados estadísticos también evidenciaron que la concentración usada no es tóxica para el ambiente ya que no había diferencia significativa en el número de individuos muertos entre el control y D2 (16 mg/mL), mientras que si había

diferencia entre el control y los tratamientos con concentraciones de óxido cúprico más altas (32, 64 y 128 mg/mL).

Como última prueba se analizó la acción del óxido cúprico a diferentes temperaturas. El análisis estadístico realizado indicó que la temperatura influye en la medida del halo de inhibición. La temperatura ya ha estado relacionada con la actividad antimicrobiana de metales (78) ya que el calor puede actuar como favorecedor de ciertas reacciones químicas haciendo que el metal pierda su capacidad bactericida.

Se determinó el rango de temperatura en la cual actúa el óxido cúprico, que va desde los 25°C hasta los 42°C (Tabla 7). La mejor actividad se observó a 37°C; lo cual indica que el óxido cúprico sería muy útil para matar a bacterias cerca y/o dentro de nuestro cuerpo. Los valores a 25°C estuvieron bastante cercanos a los de 37°C; sin embargo, el análisis estadístico nos indica que si hay diferencia significativa entre ambas temperaturas, siendo la única excepción *S. aureus*. A diferencia de las demás cepas, *S. aureus* presenta una curva de crecimiento en la cual se mantiene constante entre 14°C y 36.5°C (79) lo que podría explicar porque la inhibición no difirió entre 25°C y 37°C, de modo que el desinfectante actuará con la misma potencia frente a *S. aureus* en estas dos temperaturas.

Todavía no se han realizado estudios directos sobre la actividad de las nanopartículas de óxido cúprico a diferentes temperaturas. Sin embargo, se ha comparado la actividad antimicrobiana del óxido cúprico a diferentes temperaturas de templado (annealing) durante su proceso de síntesis (74). En ese estudio, se usaron cuatro temperaturas de templado (400°C, 500°C, 600°C y 700°C) que dieron diferentes tamaños de nanopartículas de óxido cúprico, y se pudo observar que la actividad antimicrobiana del óxido cúprico sí dependía de la temperatura y por consiguiente, del tamaño de las nanopartículas también. A menor temperatura, se obtuvieron tamaños más pequeños de nanopartículas de óxido cúprico,

característica que le brindaba facilidad al metal de ingresar a la bacteria y por lo tanto ocurría una mejor actividad antimicrobiana.

Comparando los resultados con los valores vistos en susceptibilidad a antibióticos (71), los valores obtenidos a 25°C y a 37° indicarían susceptibilidad de la cepa a la suspensión desinfectante por mostrar valores de diámetro de inhibición mayores a 14 mm, con excepción de *P. aeruginosa* a 25°C que dio un valor de 13.9 mm y que, según el análisis estadístico, difiere significativamente de todas las cepas a la misma temperatura ($p < 0.04$). Esta resistencia probablemente se debe más a la interacción del óxido cúprico con el PBS que a la temperatura debido que a 25°C, *P. aeruginosa* no evidencia tanto crecimiento como a 37°C (76). Lo que pudo haber ocurrido es la presencia de carga negativa como producto de la interacción del óxido cúprico con el PBS, la cual generaría repulsión con la carga negativa de los lípidos en la membrana, de modo que la inhibición sería un proceso más difícil para el desinfectante (65).

Según los Estándares de Desempeño para Test de Susceptibilidad a Antibióticos (38) los diámetros de inhibición a 42°C que fueron menores a los 12 mm para las cuatro cepas indicarían resistencia al óxido cúprico, sin embargo, los valores obtenidos a esta temperatura difirieron entre cepas. Cabe resaltar que a esa temperatura, las cuatro cepas crecen de manera distinta, siendo la temperatura óptima entre 40 – 45°C para *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium*; mientras que para *P. aeruginosa*, es una temperatura a la cual se la hace difícil crecer (80,81), motivo por el cual, el desinfectante actuó mejor. Sin embargo, *E. coli* fue la cepa que más inhibición obtuvo, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la prueba de coeficiente de fenol donde el desinfectante mostró tener un efecto bactericida el doble de potente en *E. coli* en comparación con las otras cepas.

La suspensión a base de nanopartículas de óxido cúprico ha mostrado tener un gran potencial como desinfectante, mostrando una alta actividad bactericida, un rápido tiempo de actuación y un amplio rango de temperatura. Por último y muy

importante, el óxido cúprico se evidenció como no tóxico al ambiente, estando por debajo del nivel de la concentración letal al 50% y mostrando un bajo porcentaje de mortalidad en la población evaluada.

VI. CONCLUSIONES

- Las cepas *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* fueron susceptibles a 16 mg/mL de nanopartículas de óxido cúprico.
- *Salmonella typhimurium* mostró resistencia a 16 mg/mL de la suspensión de nanopartículas de óxido cúprico en PBS (desinfectante), a diferencia de las otras cepas. Sin embargo, fue susceptible a la concentración de 32 mg/mL.
- A través de la prueba del Coeficiente de Fenol, la suspensión resultante mostró valores iguales y mayores (CF 1 y 2) al fenol (CF: 1), lo que indica que su actividad antimicrobiana es tan buena como la de un desinfectante estándar.
- La suspensión a partir de nanopartículas de óxido cúprico pasó la prueba de toxicidad por dos motivos: el porcentaje de mortalidad de la suspensión es menor al 30 % y la concentración utilizada (16 mg/mL) está por debajo de la concentración letal que causa muerte en 50% de una población de dafnias (CL50 = 57.4 mg/mL).
- El rango de temperatura en el cual el desinfectante actúa frente a las cepas va desde los 25 hasta los 42°C, indicando la mejor actividad frente a las cuatro cepas a 37°C.

VII. RECOMENDACIONES

Debido al buen desempeño del óxido cúprico a 37°C, podría darse otro uso a las nanopartículas. Por ejemplo, por muchos años se vienen usando las gasas de yodoformo en el tratamiento de heridas y quistes dérmicos infectados (82). Debido a la infección, estas heridas se dejan abiertas y por dentro son empaquetadas con estas tiras medicadas que matan al agente de infección, las cuales son cambiadas y reemplazadas cada cierto tiempo. Las nanopartículas de óxido cúprico impregnadas en la gasa podrían actuar al igual que el yodoformo, inhibiendo el crecimiento de bacterias en las heridas y matando a los agentes ya presentes en el cuerpo de manera óptima por encontrarse a 37°C.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Blancou, J. History of disinfection from early times until the end of the 18th century. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*. 1995;14(1): 21-39.
- [2] Block SS. Disinfection, sterilization, and preservation. Lippincott Williams & Wilkins. 2001; 16(3): 37-43.
- [3] UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO DEL AGUA. Desinfección. <http://cidta.usal.es/cursos/ETAP/modulos/libros/DESINFECCION.pdf> [Citado el 20 de junio del 2016].
- [4] Glover, TJ. Copper–nickel alloy for the construction of ship and boat hulls. *British Corrosion Journal*. 1982; 17(4): 155-158.
- [5] Hospital de Cobre de Codelco “Dr. Salvador Allende Gossens”. Cobre Antimicrobiano: científicamente comprobado. Una propiedad milenaria que revoluciona hoy el mercado de la salud. 2010.
- [6] Gómez M, Uribe C, Maurtua D, Román E, Castro F, Amézquita J. Desarrollo de Tejido Plano de Algodón Antimicrobiano con Protección UV Obtenidos Mediante Funcionalización con Nanopartículas Semiconductoras. [Proyecto en Ejecución] Innovate Perú. Contrato 368-PNICP-PIAP-2014.
- [7] Melnik M, Auderova M, Hol'Ko M. Copper (II) carboxylates and their antimicrobial effect. *Inorganic Chemistry Act*. 1982 Jan 1; 67: 117-20.
- [8] Anjaneyulu Y, Rao RP. Preparation, characterization and antimicrobial activity studies on some ternary complexes of Cu (II) with acetyl acetone and various salicylic acids. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*. 1986 Jan 1; 16(2):257-72.
- [9] Berners-Price SJ, Johnson RK, Giovenella AJ, Faucette LF, Mirabelli CK, Sadler PJ. Antimicrobial and anticancer activity of tetrahedral, chelated, diphosphine silver (I) complexes: comparison with copper and gold. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1988 Aug 31;33(4):285-95.

- [10] Geraghty M, Cronin JF, Devereux M, McCann M. Synthesis and antimicrobial activity of copper (II) and manganese (II) α , ω -dicarboxylate complexes. *BioMetals*. 2000 Mar 1;13(1):1-8.
- [11] Gordon AS, Howell LD, Harwood V. Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations. *Canadian journal of microbiology*. 1994 May 1;40(5):408-11.
- [12] Hong R, Kang TY, Michels CA, Gadura N. Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*. 2012 Mar 15;78(6):1776-84.
- [13] Thurman RB, Gerba CP, Bitton G. The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Critical reviews in environmental science and technology*. 1989 Jan 1;18(4):295-315.
- [14] Tkeshelashvili LK, McBride T, Spence K, Loeb LA. Mutation spectrum of copper-induced DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*. 1991 Apr 5;266(10):6401-6.
- [15] Brown NL, Rouch DA, Lee BT. Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid*. 1992 Jan 31;27(1):41-51.
- [16] Cooksey DA. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *Fems microbiology reviews*. 1994 Aug 1;14 (4):381-6.
- [17] Wilks SA, Michels H, Keevil CW. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *International journal of food microbiology*. 2005 Dec 15;105(3):445-54.
- [18] Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *Journal of Hospital Infection*. 2006 Jul 31;63 (3):289-97.
- [19] Delgado K, Quijada R, Palma R, Palza H. Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent. *Letters in applied microbiology*. 2011; Jul 1;53 (1):50-4.
- [20] Palza H, Quijada R, Delgado K. Antimicrobial polymer composites with copper micro-and nanoparticles: Effect of particle size and polymer matrix. *Journal of*

- Bioactive and Compatible Polymers: Biomedical Applications. 2015 Jul 1;30(4):366-80.
- [21] Jinturkar P, Guan YC, Han KN. Dissolution and corrosion inhibition of copper, zinc, and their alloys. *Corrosion*. 1998 Feb;54(2):106-14.
- [22] Alodan M, Smyrl W. Effect of thiourea on copper dissolution and deposition. *Electrochimica Acta*. 1998 Sep 15;44(2):299-309.
- [23] Luo Q, Mackay RA, Babu SV. Copper dissolution in aqueous ammonia-containing media during chemical mechanical polishing. *Chemistry of materials*. 1997 Oct 16;9(10):2101-6.
- [24] Stoimenov PK, Klinger RL, Marchin GL, Klabunde KJ. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*. 2002 Aug 20; 18(17): 6679-86.
- [25] Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. Characterization of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International journal of antimicrobial agents*. 2009 Jun 30;33(6):587-90.
- [26] Safarifard V, Morsali A. Sonochemical syntheses of a nano-sized copper (II) supramolecule as a precursor for the synthesis of copper (II) oxide nanoparticles. *Ultrasonics sonochemistry*. 2012 Jul 31;19(4):823-9.
- [27] Condori C, Vivas D. Obtención a nivel industrial de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) a partir de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y su aplicación en tejidos textiles como actividad antimicrobiana. [Tesis de Licenciado] Universidad Nacional de Ingeniería. 2016.
- [28] Wellens, S, Vander Hoogerstraete, T, Möller, C, Thijs, B, Luyten, J, & Binnemans, K. Dissolution of metal oxides in an acid-saturated ionic liquid solution and investigation of the back-extraction behavior to the aqueous phase. *Hydrometallurgy*. 2014: 144, 27-33.
- [29] Steed CJ. Antibiotic and Disinfectant Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. 2009
- [30] Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biological and pharmaceutical bulletin*. 2002;25 (12):1600-3.

- [31] Rowley SD, Anderson GL. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. Bone marrow transplantation. 1993 May;11(5):389-93.
- [32] Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent Dymehylsulfoxide. TheFasebJournal. 2014 Mar 1;28(3):1317-30.
- [33] Sperling S, Larsen IG. Toxicity of dimethylsulfoxide (DMSO) to human corneal endothelium in vitro. Act ophthalmological. 1979 Oct 1;57(5):891-8.
- [34] Castro F. Efecto antimicrobial de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) sobre bacterias intrahospitalarias aisladas de superficies inertes de tres áreas de cuidados intensivos del Hospital Nacional Cayetano Heredia. [Tesis de Licenciado] Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2016.
- [35] Resino S. Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas. La Ley. 2004;5(15):1.
- [36] Clorox® Quaternary Disinfectant Cleaner | Clorox Healthcare [Internet]. Cloroxprofessional.com. 2016 [citado 29 Septiembre, 2016]. Available from:https://www.cloroxprofessional.com/products/clorox-broad-spectrum-quaternary-disinfectant-cleaner/at-a-glance/?gclid=CJPE_LrX3ccCFUhvAodGBgB0A.
- [37] Stringfellow K, Anderson P, Caldwell D, Lee J, Byrd J, McReynolds J, Carey J, Nisbet D, Farnell M. Evaluation of disinfectants commonly used by the commercial poultry industry under simulated field conditions. Poultry science. 2009 Jun 1;88(6):1151-5.
- [38] CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard- third edition 2008; 28 (8).
- [39] E2149-01: Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions, in Annual Book of ASTM Standard 2002. International, A., Ed.; West Conshohocken, PA. 2002; pp 1597 – 1600.

- [40] Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 2001 Jul 1;48 (Suppl. S1):5-16.
- [41] Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016 Apr 30; 6(2):71-9.
- [42] Midander K, Cronholm P, Karlsson HL, Elihn K, Möller L, Leygraf C, Wallinder IO. Surface Characteristics, Copper Release, and Toxicity of Nano- and Micrometer-Sized Copper and Copper (II) Oxide Particles: A Cross-Disciplinary Study. *Small*. 2009 Feb 6; 5 (3): 389-99.
- [43] Phosphate-buffered saline (PBS): Cold Spring Harbor Protocols. 2006; 2006 (1): pdb.rec8247.
- [44] Brewer CM. Variations in Phenol Coefficient Determinations of Certain Disinfectants. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*. 1943 Mar;33(3):261-4.
- [45] Hoja de Datos de Seguridad Fenol Cristalizado [Internet]. CTR scientific. [1 de Octubre, 2016]. Available from: <http://www.ctr.com.mx/pdfcert/Fenol.pdf>
- [46] Reybrouck G. The testing of disinfectants. *International biodeterioration & biodegradation*. 1998 Dec 31;41(3):269-72.
- [47] Rao s. Testing of disinfectants [Internet]. Micro Rao. 2016 [citado el 30 de Set. de 2016]: http://www.microrao.com/micronotes/pg/testing_of_disinfectants.pdf
- [48] England, JW. The phenol coefficient method of testing disinfectants. *J. Pharm. Sci*. 1973; 2: 955–958.
- [49] Shaw JR, Pfrender ME, Eads BD, Klaper R, Callaghan A, Sibly RM, Colson I, Jansen B, Gilbert D, Colbourne JK. Daphnia as an emerging model for toxicological genomics. *Advances in Experimental Biology*. 2008 Dec 31;2:165-328.
- [50] Clare J. Daphnia: An Aquarist Guide [Internet]. Caudata.org. 2017 [cited 10 Jan 2017]. Available from: <http://www.caudata.org/daphnia/>
- [51] Elenbas M. Daphnia magna [Internet]. Animal Diversity Web. 2017 [cited 15 Jan 2017]. Available from: http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/

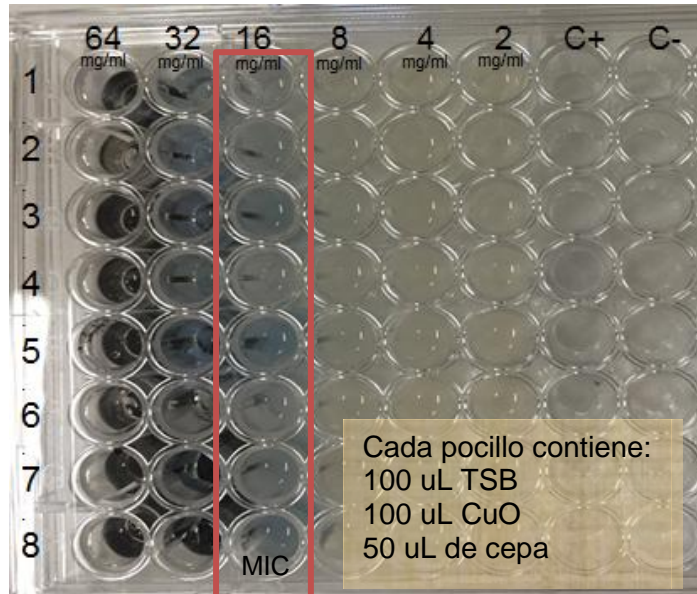
- [52] Miller C. *Daphnia pulex* [Internet]. Animal Diversity Web. 2017 [cited 16 Jan 2017]: http://animaldiversity.org/site/accounts/information/Daphnia_pulex.html
- [53] Erdem B. *Daphnia magna* vs. *Daphnia pulex* [Internet]. Baburerdem.deviantart.com. 2017 [cited 16 January 2017]. Available from: <http://baburerdem.deviantart.com/art/Daphnia-magna-vs-Daphnia-pulex-323949137>
- [54] Toyota K, Miyagawa S, Ogino Y, Iguchi T. Microinjection-Based RNA Interference Method in the Water Flea, *Daphnia pulex* and *Daphnia magna*. 2016 April 16; Figure 3AB.
- [55] Martínez-Jerónimo F, Espinosa-Chávez F, Villaseñor R. Effect of culture volume and adult density on the neonate production of *Daphnia magna*, as a test organism for aquatic toxicity tests. *Environmental toxicology*. 2000 Jan 1;15(3):155-9
- [56] Martínez-Jeronimo F. Ensayo de toxicidad aguda con cladóceros de la familia Daphnidae. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México*. 2008:99-115.
- [57] Díaz B., Pica G. Y. Y Ronco A. Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna*. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en Mexico*. 2008:17-32.
- [58] Currell G. *Scientific Data Analysis*. Oxford University Press, USA; 2015. Logit&Probit Video available: <https://www.youtube.com/watch?v=mkX6NEqy-lo>
- [59] López AJ, García AM, Rojas JJ. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*. 2005.
- [60] lañez Pareja E. Desinfectantes y antisépticos [Internet]. *Biologia.edu.ar*. 2016 [citado 29 de setiembre, 2016]: http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/19_micro.html
- [61] Duce G. *Prevención de las infecciones nosocomiales. Guía práctica 2da Edición*. Organización Mundial de la Salud; 2003.
- [62] Rutala, WA, & Cole, EC. Ineffectiveness of hospital disinfectants against bacteria: a collaborative study. *Infection Control*. 1987; 501-506.

- [63] Farr SB, Kogoma T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological reviews*. 1991 Dec 1;55(4):561-85.
- [64] Gupta SD, Wu HC, Rick PD. A *Salmonella typhimurium* genetic locus which confers copper tolerance on copper-sensitive mutants of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1997 Aug 1;179(16):4977-84.
- [65] Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2009;27(1), 44-52.
- [66] Kumar H, Rani R. Antibacterial Study of Copper Oxide Nanoparticles synthesized by Micro emulsion. *Recent advances in Biomedical& Chemical engineering and Material sciences*. 2014 Mar; 15:197.
- [67] Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *New England Journal of Medicine*. 2010 May 13; 362 (19): 1804-13.
- [68] Ajila LM. Elaboración de una crema a partir de un extracto vegetal con acción antimicrobiana, de dos plantas medicinales de mayor consumo en la provincia de El Oro 2014. 2014
- [69] Yang QW, Xu YC, Xie XL, Wang H. Antimicrobial resistance surveillance on hospital-and community-acquired pathogens in 10 teaching hospitals in china [j]. *Chinese Journal of Nosocomiology*. 2009; 9, 055.
- [70] Miranda MC, Pére F, Zuluaga T, Olivera MDR, Correa A, Reyes SL & Villegas MV. Antimicrobial resistance in gram negative bacteria isolated from intensive care units of Colombian hospitals, WHONET 2003, 2004 and 2005. *Biomédica*. 2006; 26(3), 424-433.
- [71] Mchugh GL, Moellering R, Hopkins C, Swartz M. *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin: A new threat in burn units. *The Lancet*. 1975 Feb 1;305(7901):235-40.
- [72] Mantilla J, Pulido M, Jaime J. Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2010 Dec;57(3):168-77.

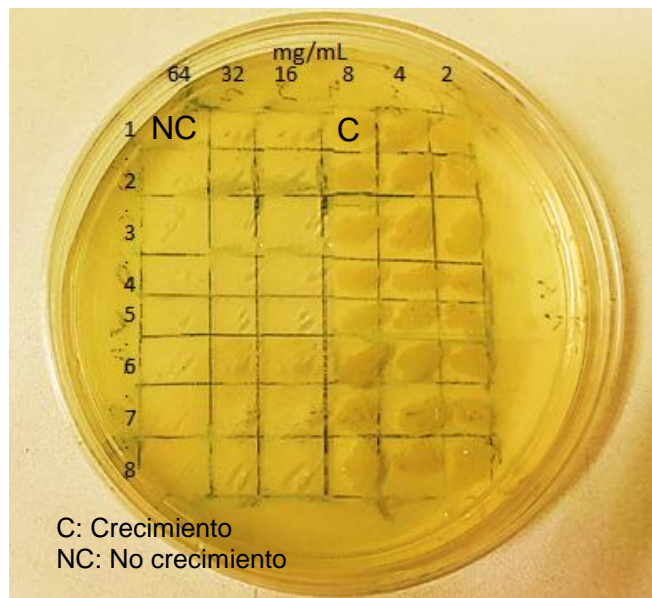
- [73] García J, Silva MC. Temario específico de técnico especialista de laboratorio Vol II. Centros Hospitalarios de alta resolución de Andalucía (CHARES). 2006 May 1; (5):283-285.
- [74] Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Memic A. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and-negative bacterial strains. *Int. J. Nanomed.* 2012 Jan 1;7:3527-35.
- [75] Tilley FW. Phenol Coefficients. *Am J Public Health (NY)* 1921 Jun; 11(6): 513–519.
- [76] Reddish GF. The resistance to phenol of *Staphylococcus aureus*. *American Journal of Public Health.* 1925 Jun;15(6):534-8
- [77] Vallejos Castro YS. Valoración de la efectividad antimicrobiana de un desinfectante de amonio cuaternario de última generación. 2009; 3 (3): 26
- [78] Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007; 3(1), 95-101.
- [79] Fujikawa H, Morozumi S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology.* 2006; 23(3), 260-267.
- [80] Haynes WC. *Pseudomonas aeruginosa*---its Characterization and Identification. *Microbiology.* 1951 Dec 1;5(5):939-50.
- [81] Kropinski AM, Lewis VA, Berry DE. Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of bacteriology.* 1987 May 1;169(5):1960-6.
- [82] Mizokami F, Murasawa Y, Furuta K, Isogai Z. Iodoform gauze removes necrotic tissue from pressure ulcer wounds by fibrinolytic activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2012;35(7):1048-53.

ANEXOS:

Anexo 1. Resultados de la MIC en la placa de microtitulación a las 24 h



Anexo 2. Crecimiento de la siembra de cada uno de los pocillos de la placa de microtitulación en Tripticasa de Soya Agar

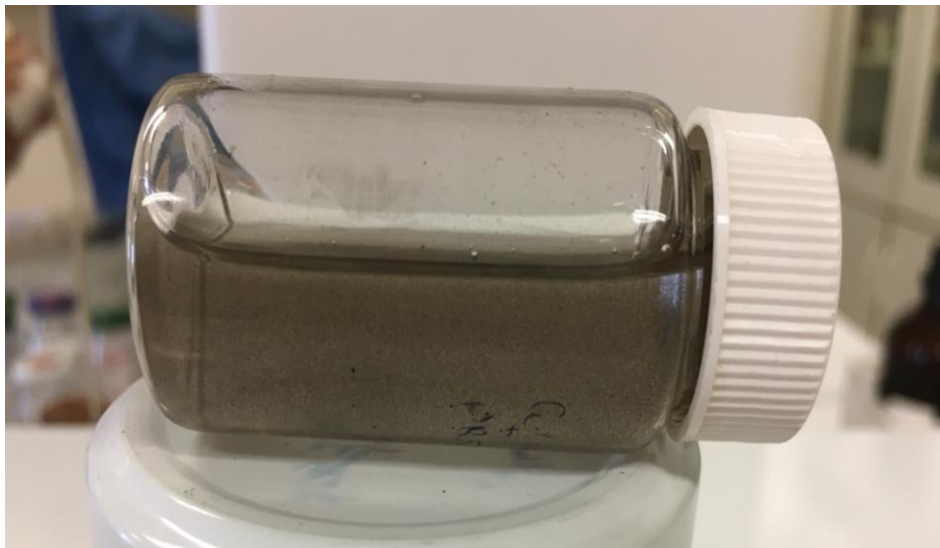


Anexo 3. Foto antes y después de la sonicación del CuO con PBS

ANTES



DESPUÉS



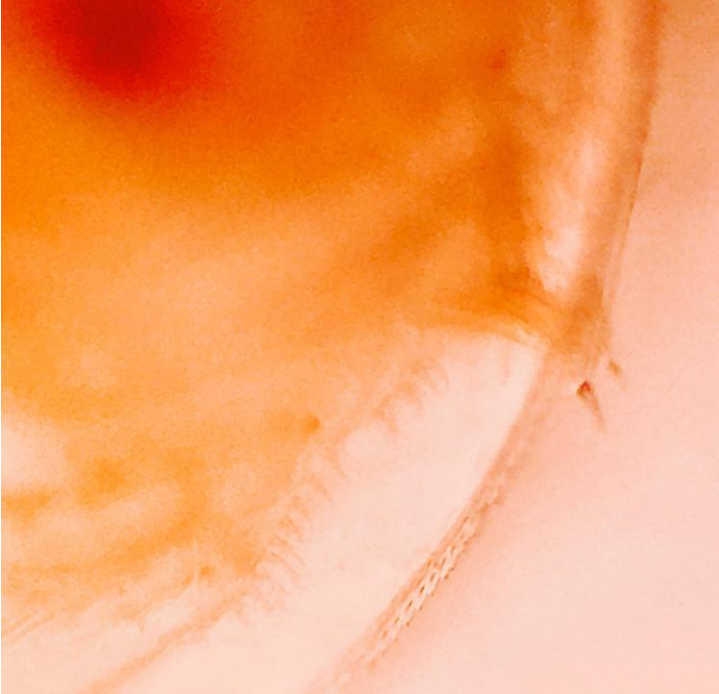
Anexo 4. Especie de estudio: *Daphnia magna*. Imagen al estereoscopio (4x)



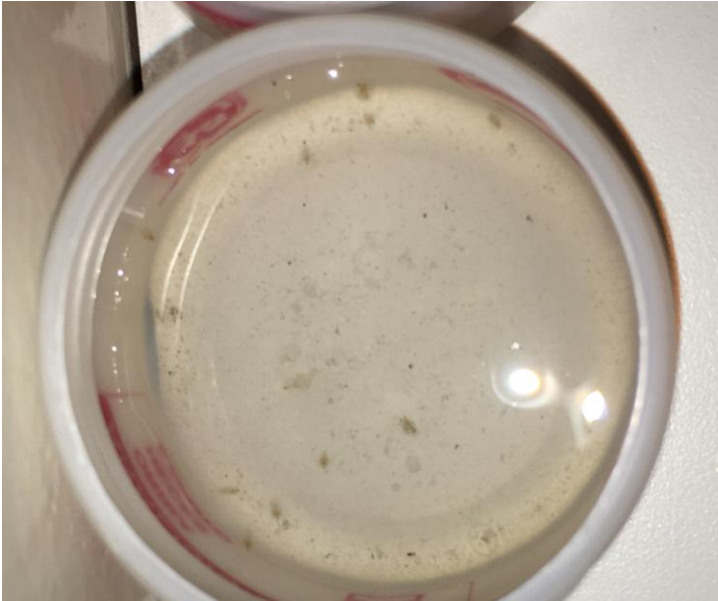
Anexo 5. *Daphnia magna* con embriones. Imagen al estereoscopio (10x)



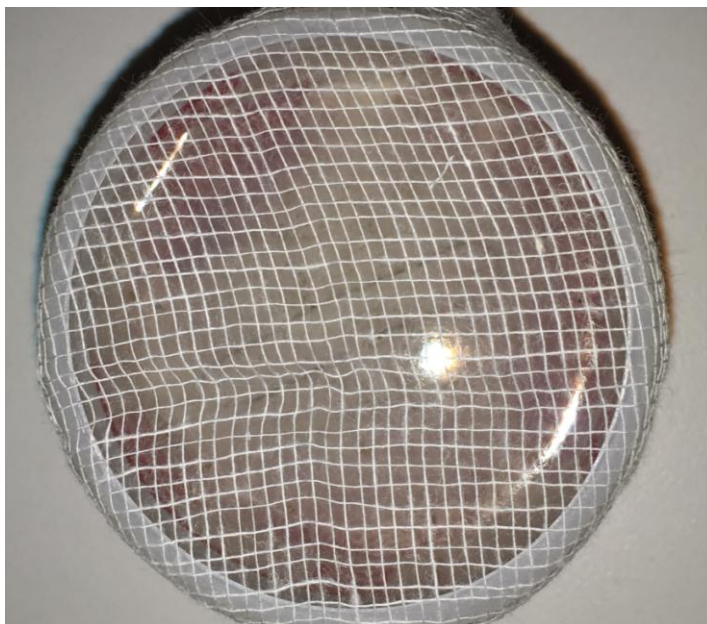
Anexo 6. Garra post-abdominal de *D. magna*. Imagen al microscopio (100x)



Anexo 7. Muestra de tratamiento con *D. magna* para la Prueba de Toxicidad

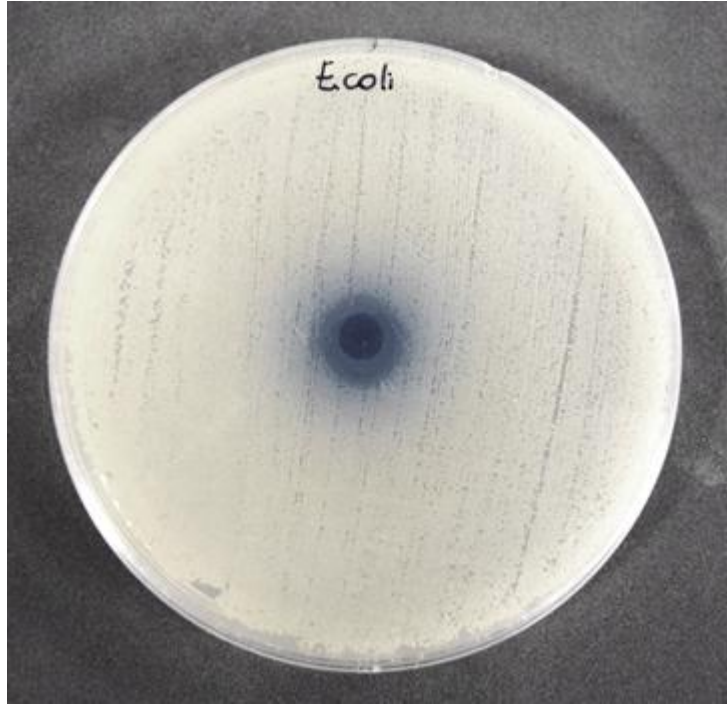


Anexo 8. Envase con dafnias cubierto con una gasa para permitir el flujo de aire y evitar el ingreso de otros organismos.

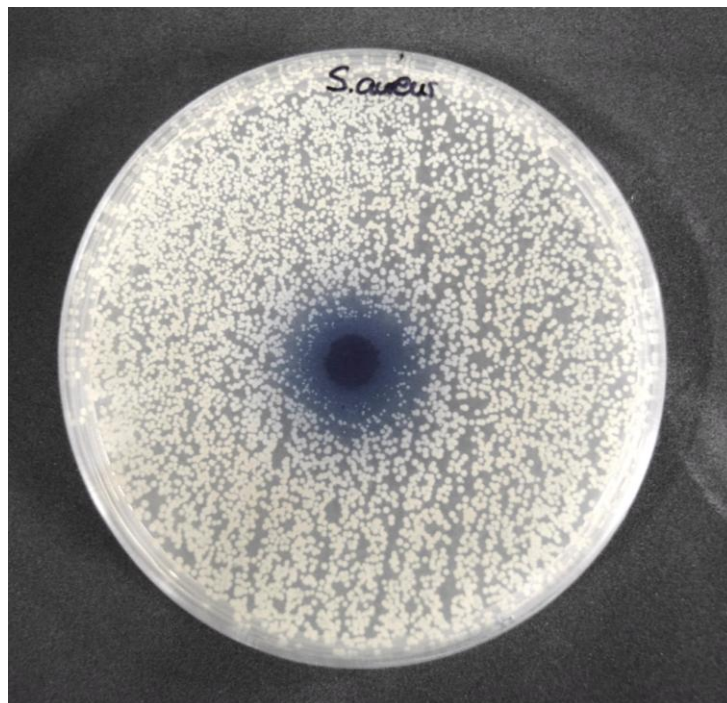


Anexo 9. Confrontación de las NPs de CuO frente a las cepas bacterianas:

Escherichia coli



Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa



Salmonella typhimurium



Anexo 10. Análisis realizado en Excel para la obtención del CL₅₀ a partir del porcentaje de mortalidad.

