



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

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE ALUMINIO A PARTIR DE *Cyphomandra betaceae* PARA
EVALUAR SU ACTIVIDAD BACTERICIDA EN EL RÍO
CHIBUNGA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: IVETTE SALOMÉ ACOSTA PANIMBOZA

DIRECTOR (A): BQ. CI. MISHHELL MORENO

Riobamba – Ecuador

2024

© 2024, Ivette Salomé Acosta Panimboza

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, Ivette Salomé Acosta Panimboza, 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 autor/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, 08 de mayo de 2024



Ivette Salomé Acosta Panimboza

185099506-7

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

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, **SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ALUMINIO A PARTIR DE *Cyphomandra betaceae* PARA EVALUAR SU ACTIVIDAD BACTERICIDA EN EL RÍO CHIBUNGA**, realizado por la señorita: **IVETTE SALOMÉ ACOSTA PANIMBOZA**,, 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
Ing. Hugo Javier Sánchez Moreno PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2024-05-08
BQCL. Mishell Carolina Moreno Samaniego DIRECTOR(A) DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2024-05-08
Ing. Violeta Maricela Dalgo Flores ASESOR(A) DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2024-05-08

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con cariño a Dios, cuya presencia y amor me ha guiado en este viaje académico hasta alcanzar con éxito mi meta anhelada. A mí amada madre, María Panimboza, un especial reconocimiento por su sacrificio y amor incondicional. Por ser mi luz en los momentos más difíciles, un ejemplo viviente de dedicación y esfuerzo, por ser el motor que ha impulsado mi vida hacia adelante, además, a mis hermanos: Santiago y Anthony Acosta, quienes han sido mis compañeros de aventuras y mi apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. Con gratitud infinita, les dedico este logro, pues sin su amor y aliento, este camino habría sido más difícil, gracias por ser mi familia, mi roca y mi razón para seguir adelante.

Ivette.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi querida Universidad por haberme dado la gran oportunidad de formarme como profesional y humanista. A mis profesores y mentores, por su elevado espíritu de abnegación, sabiduría u orientación que han enriquecido mi aprendizaje, de manera especial deseo expresar mis agradecimientos, a mi querida tutora BQCl. Mishell Moreno, por su orientación experta, apoyo constante y sabias sugerencias que fueron fundamentales para dar forma a este trabajo.

A mí querida familia por ser un pilar fundamental en mi educación y por enseñarme que todos mis sueños se pueden cumplir con esfuerzo y dedicación, finalmente a mis amigos, por sus palabras de aliento en los momentos difíciles. Este trabajo es el resultado del esfuerzo conjunto de muchas personas, y le estoy profundamente agradecido a cada una de ellas por su invaluable contribución

Ivette.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1	DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA	2
1.1	Planteamiento del problema.....	2
1.6	Objetivos	4
1.6.1	<i>Objetivo general</i>	4
1.6.2	<i>Objetivos específicos</i>	4
1.7	Justificación	5
1.8	Hipótesis.....	6

CAPÍTULO II

2	MARCO TEÓRICO	7
2.1	Antecedentes de la investigación.....	7
2.2	Referencias teóricas	9
2.2.1	<i>Agua</i>	9
2.2.2	<i>Demanda y uso del agua</i>	9
2.2.3	<i>Fuentes de agua</i>	10
2.2.4	<i>Contaminación</i>	11
2.2.5	<i>Agua de río</i>	12

2.2.6	<i>Calidad del agua de río</i>	12
2.2.7	<i>Río Chibunga y su confluencia con el Río Chambo</i>	13
2.2.8	<i>Principales contaminantes del agua</i>	14
2.2.9	<i>Bacterias</i>	15
2.2.10	<i>Principales bacterias bioindicadores de la calidad de agua de río</i>	17
2.2.11	<i>Mecanismos de resistencia</i>	18
2.2.12	<i>Crecimiento bacteriano</i>	19
2.2.13	<i>Métodos de medición del crecimiento</i>	21
2.2.14	<i>Placas Compact Dry</i>	23
2.2.15	<i>Medios de cultivo</i>	23
2.2.16	<i>Antibióticos</i>	25
2.2.17	<i>Mecanismos de acción de los antibióticos</i>	25
2.2.18	<i>Nanotecnología</i>	26
2.2.19	<i>Métodos de caracterización de las nanopartículas</i>	27
2.2.20	<i>Síntesis de nanopartículas</i>	28
2.2.21	<i>Síntesis verde</i>	29
2.2.22	<i>Nanopartículas de óxido de aluminio</i>	30
2.2.23	<i>Tomate de árbol (Cyphomandra betaceae)</i>	32

CAPÍTULO III

3	MARCO METODOLÓGICO	34
3.1	Enfoque de investigación	34
3.2	Modalidad de la investigación	34
3.3	Diseño de investigación	34
3.3.1	<i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i>	34
3.3.2	<i>Según la perspectiva temporal</i>	35
3.4	Tipo de estudio	35
3.5	Método de investigación	35

3.6	Diseño experimental.....	36
3.6.1	<i>Metodología para realizar el análisis estadístico mediante el coeficiente de Pearson</i>	36
3.7	Población y Planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra.....	37
3.7.1	<i>Población y planificación</i>	37
3.7.2	<i>Selección y cálculo de la muestra</i>	38
3.8	Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	40
3.8.1	<i>Materiales, reactivos y equipos</i>	40
3.8.2	<i>Metodología del experimento</i>	41
3.8.3	<i>Síntesis de nanopartículas</i>	41
3.8.4	<i>Caracterización de las nanopartículas de óxido de aluminio</i>	43
3.8.5	<i>Selección de la muestra de agua</i>	44
3.8.6	<i>Evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de aluminio</i>	46
3.8.7	<i>Pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana</i>	46

CAPÍTULO IV

4	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	48
4.1	Obtención del extracto acuoso de <i>Cyphomandra betacea</i> (tomate de árbol)	48
4.1.1	<i>Análisis del extracto acuoso de <i>Cyphomandra betacea</i> (tomate de árbol)</i>	49
4.2	Síntesis de nanopartículas de óxido de aluminio	52
4.2.1	<i>Experimentos para la obtención de nanopartículas de óxido de cobre</i>	52
4.3	Síntesis verde de las nanopartículas de óxido de aluminio.....	56
4.4	Resultados de la caracterización de nanopartículas de óxido de aluminio	57
4.4.1	<i>Espectroscopia Uv-vis</i>	57
4.4.2	<i>Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR)</i>	58
4.4.3	<i>Microscopía electrónica de barrido</i>	60
4.5	Resultados de la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de aluminio	60

4.5.1	<i>Identificación de bioindicadores de calidad de agua mediante placas Compact dry.</i>	62
4.5.2	<i>Determinación del número de colonias en Agar Nutritivo</i>	64
4.6	Pruebas microbiológicas	65
4.6.1	<i>Determinación del número de colonias en Agar Nutritivo</i>	65
4.6.2	Análisis del estudio estadístico experimental	70
4.6.3	<i>Influencia de las variables</i>	72

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Principales contaminantes que afectan la calidad del agua en ríos.....	14
Tabla 2-2: Actividad antimicrobiano de las Al ₂ O ₃ -NPs en diferentes concentraciones	31
Tabla 3-1: Variables independientes.....	35
Tabla 3-2: Consideraciones de la Correlación de Pearson.....	37
Tabla 4-1: Características del extracto hidroalcohólico de <i>Cyphomandra betacea</i>	48
Tabla 4-2: Resultados del Test de FeCl ₃	49
Tabla 4-3: Análisis de la Espectrometría infrarroja (IR) del extracto de <i>Cyphomandra betacea</i>	51
Tabla 4-4: Condiciones de síntesis de Al ₂ O ₃ NPs experimento 1.....	52
Tabla 4-5: Rendimiento experimental de la síntesis de nanopartículas de Al ₂ O ₃	57
Tabla 4-6: Resultado del análisis por espectroscopía UV-vis.....	57
Tabla 4-7: Resultados de las bacterias bioindicadores de la calidad de agua en placas Compact Dry	63
Tabla 4-8: Recuento de colonias bacterianas de la muestra madre del 18 de enero 2024	66
Tabla 4-9: Recuento de colonias bacterianas de la muestra madre del 18 de febrero de 2024..	66
Tabla 4-10: Recuento de colonias bacterianas sin nanopartículas de Al ₂ O ₃	69
Tabla 4-11: Recuento de colonias bacterianas sin nanopartículas de Al ₂ O ₃	69
Tabla 4-12: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de Al ₂ O ₃	71
Tabla 4-13: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de Al ₂ O ₃	71

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1: Punto de confluencia del río Chibuga y río Chambo	14
Ilustración 2-2: Morfología bacteriana	16
Ilustración 2-3: Clasificación de las bacterias	16
Ilustración 2-4: Curva de crecimiento bacteriano.....	20
Ilustración 2-5: Determinación de células viables.....	22
Ilustración 2-6: Determinación de células viables.....	30
Ilustración 2-7: Representación esquemática de los principales mecanismos	32
Ilustración 2-8: Tomate de árbol (<i>Cyphomandra betaceae</i>)	33
Ilustración 3-1: Mapa de la ubicación de la microcuenca del río Chibunga	38
Ilustración 3-2: Punto de toma de muestras de agua del río Chibunga	39
Ilustración 4-1: Obtención del extracto acuoso de <i>Cyphomandra betacea</i> (tomate de árbol). (A) Solución hidroalcohólica 1:1; (B) macerado y filtrado al vacío; (C) sonicado de la muestra; (D) Rotavapor.....	48
Ilustración 4-2: Presencia de compuestos fenólicos: cambio de color amarillo pálido a marrón intenso a negro (A) Extracto puro; (B) Extracto más $FeCl_3$	49
Ilustración 4-3: Espectrometría infrarroja (IR) del extracto acuoso de <i>Cyphomandra betacea</i> Realizado por: Acosta, I., 2024.	50
Ilustración 4-4: Durante la síntesis. (A) Solución de sulfato de aluminio 18 hidratado (B) sal precursora más extracto.....	53
Ilustración 4-5: Después de la síntesis, (A) solución de la sal más extracto (B) Formación de nanopartículas-precipitado	53
Ilustración 4-6: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.025 M.....	54
Ilustración 4-7: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.05 M.....	54
Ilustración 4-8: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.5 M.....	55
Ilustración 4-9: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 1 M.....	55

Ilustración 4-10: Síntesis de nanopartículas de óxido de aluminio. (A) Solución de la sal (B) Sal 0.025M más extracto (C) Sal 0.025M más extracto al final de la síntesis (D) nanopartículas ...	56
Ilustración 4-11: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de aluminio 0.025 M	58
Ilustración 4-12: Espectroscopia de infrarrojo de nanopartículas de Al ₂ O ₃ 0.5 M	59
Ilustración 4-13: Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas.....	60
Ilustración 4-14: Toma de muestra. (A) Punto de descargo del río Chibunga al río Chambo; (B) Toma de la muestra; (C) Etiquetado de la muestra	61
Ilustración 4-15: Siembra de las muestras madre y de la dilución de las muestras de agua del punto de descargo del río Chibunga y río Chambo.....	61
Ilustración 4-16: Coliformes Totales y Fecales - E. coli. (A) Resultados del muestreo 1. (B) Resultados del muestreo 2.....	62
Ilustración 4-17: Pseudomonas aeruginosa (A) Resultados del muestreo 1. (B) Resultados del muestreo 2.....	63
Ilustración 4-18: Colonias bacterianas formadas de la muestra madre (A) 18 de enero (B) 18 de febrero.....	65
Ilustración 4-19: Representación gráfica de la actividad bactericida de Al ₂ O ₃ NPs	68
Ilustración 4-20: Representación gráfica de la actividad bactericida de Al ₂ O ₃ NPs	68
Ilustración 4-21: (A) Crecimiento de colonias bacterianas sin NPs solo con exposición a luz solar (A) 18 de enero; (B) 18 de febrero.....	72
Ilustración 4-22: Placa con Al ₂ O ₃ NPs (A) 1h; (B) 2 hrs; (C) 3 hrs de exposición.....	73

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: CÁLCULO DEL PESO MOLECULAR DEL COMPUESTO $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$

ANEXO B: CÁLCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LA SAL PRECURSORA.

ANEXO C: EVIDENCIA DE COPILATIO

ANEXO D: PROCESO DE SECADO, TRITURADO Y PESADO DEL FRUTO DE TOMATE DE ÁRBOL

ANEXO E: PROCESO DE SECADO, TRITURADO Y PESADO DEL FRUTO DE TOMATE DE ÁRBOL

RESUMEN

El uso indiscriminado de antibióticos ha provocado el desarrollo de mecanismos de resistencia en las bacterias. El agua proveniente de ríos contaminados desempeña un papel crucial en la propagación de este fenómeno. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue llevar a cabo la síntesis verde y caracterización de nanopartículas de óxido de aluminio como posible agente bactericida para el tratamiento de aguas en el punto de confluencia de los ríos Chibunga y Chambo. La obtención de las nanopartículas de Al_2O_3 se realizó mediante el uso de un extracto acuoso de tomate de árbol *Cyphomandra betacea* como agente reductor y sulfato de aluminio como sal precursora. La caracterización se efectuó mediante Espectroscopía Uv-vis, Espectroscopía de infrarrojo (IR) y Microscopía electrónica de barrido (SEM), mientras que la actividad bactericida se evaluó mediante pruebas de inhibición bacteriana, realizando siembras en agar nutritivo en intervalos de una hora de exposición de las muestras de agua a las nanopartículas. El análisis estadístico mediante la Correlación de Pearson reveló correlación negativa alta entre el número de colonias y el tiempo de exposición, ya que se observó una reducción considerable de la carga bacteriana desde la primera hora de contacto con las nanopartículas. Además, se determinó que las condiciones óptimas para la formación de las nanopartículas a una concentración de 0.025 M de la sal precursora y 80°C de temperatura. Las Al_2O_3 NPs resultantes mostraron un tamaño promedio entre 65 y 71 nm, con forma ovalada según el análisis de microscopía electrónica de barrido, características que favorecieron su efectividad bactericida. Por esta razón se concluye que las Al_2O_3 NPs presentan una notable actividad bactericida frente a colonias farmacorresistentes en las muestras de agua del río, destacándose como una alternativa eficaz para la descontaminación del agua.

Palabras clave: <RESISTENCIA BACTERIANA>, <SINTESIS VERDE>, <NANOPARTICULAS DE ÓXIDO DE ALUMINIO >, <BACTERICIDA >, <COLIFORMES FECALES >, <COLIFORMES TOTALES >, <RIO CHIBUNGA>, <RÍO CHAMBO >

0628-DBRA-UPT-2025



ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics has led to the development of resistance mechanisms in bacteria. Water from contaminated rivers plays a crucial role in the propagation of this phenomenon. Therefore, the objective of the present investigation was to carry out the green synthesis and characterization of aluminum oxide nanoparticles as a possible bactericidal agent for water treatment at the confluence point of the Chibunga and Chambo rivers. The Al₂O₃ nanoparticles were obtained using an aqueous extract of tomato tree *Cyphomandra Betacea* as a reducing agent and aluminum sulfate as a precursor salt. The characterization was performed by Uv-vis spectroscopy, infrared spectroscopy (IR), and scanning electron microscopy (SEM). Meanwhile, bacterial inhibition tests evaluated bactericidal activity by performing sowings in nutrient agar at one-hour intervals of exposure of the water samples to the nanoparticles. Statistical analysis, using Pearson's correlation, revealed a high negative correlation between the number of colonies and the exposure time, since a considerable reduction in the bacterial load was observed from the first hour of contact with the nanoparticles. In addition, optimal conditions for nanoparticle formation were determined at 0.025 M concentration of the precursor salt and 80°C temperature. According to the scanning electron microscopy analysis, the resulting Al₂O₃NPs showed an average size between 65 and 71 nm with an oval shape, characteristics that favored their bactericidal effectiveness. For this reason, it is concluded that Al₂O₃NPs present a remarkable bactericidal activity against drug-resistant colonies in river water samples. This stands out as an effective alternative for water decontamination.

Keywords: <BACTERIAL RESISTANCE>, <GREEN SYNTHESIS>, <ALUMINIUM OXIDE NANOPARTICLES >, <BACTERICIDE >, <FECAL COLIFORMES>, < TOTAL COLIFORMES >, <CHIBUNGA RIVER>, <CHAMBO RIVER >.



Ing. Romel Francisco Calles Jiménez
C.I. 0603877713

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana se ha convertido en una amenaza significativa a nivel global, poniendo en peligro la eficacia de los antibióticos que han salvaguardado la vida de millones de personas, la resistencia que se presenta en un organismo puede difundirse de manera activa o impredecible, por ejemplo, el intercambio de material genético entre distintas bacterias, es un mecanismo adaptado de resistencia dada por la bacteria, disminuyendo la eficacia de la terapia antibiótica en un amplio espectro de infecciones y enfermedades. Las bacterias farmacorresistentes suelen extenderse en poblaciones de seres humanos y animales a través de alimentos, agua o el entorno. La transmisión llega a presentarse debido a factores como el comercio, los viajes, la migración humana y la trashumancia. Además, es posible encontrar bacterias resistentes en animales destinados a la alimentación y en productos alimentarios destinados al consumo humano.

De acuerdo con información presentada por la OPS (2021), más de 700 mil muertes anuales se presentan cada año en el mundo debido a infecciones por bacterias resistentes a los antimicrobianos. Además, en América Latina se considera uno de los principales desafíos de la medicina contemporánea, dado el aumento global de los diversos mecanismos de resistencia bacteriana debido a que se estima que aproximadamente el 78% de los antibióticos se adquieren sin receta médica. Las estadísticas revelan que, en el país, un alto porcentaje de la población consume antibióticos sin receta médica, lo que agrava aún más la situación de resistencia antibacteriana. Además, elevadas tasas de resistencia a los antibióticos se presentan en las zonas rurales de Ecuador alcanzando tasas globales de un 33 % en el año 2018 con respecto a los antibióticos de primera línea utilizados para su tratamiento (Ross et al, 2020).

Por esta razón de acuerdo a revisión bibliográfica, la provincia de Chimborazo se convierte en un punto focal de preocupación, debido a su diversidad demográfica y a la presencia del Río Chibunga, un importante recurso hídrico que ha sido afectado por la contaminación generada por los desechos de la producción agropecuaria y el inadecuado manejo de los residuos, en base a esto la relación entre la contaminación de los ríos y la resistencia de las bacterias a los antibióticos se basa en varios mecanismos interconectados que pueden contribuir a la propagación, en respuesta a esta problemática, la nanotecnología emerge como una herramienta prometedora en el tratamiento de aguas y ríos. Sus propiedades catalíticas ofrecen una alternativa potencialmente efectiva a las técnicas convencionales como la floculación, coagulación y adsorción, lo que podría contribuir significativamente a mitigar los problemas de contaminación.

CAPÍTULO I

1 DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

Actualmente, el incremento de la resistencia bacteriana se ha desarrollado rápidamente, aunque durante varios años se ha estudiado e identificado a las bacterias, estas han desarrollado varios tipos de resistencia a los antibióticos; influyendo en la eficacia de los tratamientos estándar, generando un problema mundial. Dentro de las principales causas de resistencia, se encuentra el uso irracional de los medicamentos, incumplimiento de los tratamientos y prescripción incorrecta de medicamentos por falta de estudios previos de inhibición bacteriana en cultivos (OMS, 2021). Además, la industria de los cárnicos debido a sus diversos procesos para poder expender el producto se ha vuelto una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo en la actualidad, involucrando aspectos negativos como: mayores gastos en salud, estancias hospitalarias prolongadas y aumento de la mortalidad. De acuerdo con un informe realizado en el 2016, se evidenció que cada año mueren 700.000 personas en todo el mundo por infecciones producidas por bacterias resistentes a los antibióticos, por otra parte, de acuerdo con un estudio presentado por Reino Unido se advierte que las infecciones producidas por las bacterias resistentes podrían ser la principal causa de muerte a nivel mundial en el año 2050 (OPS, 2021).

En Ecuador, los recursos hídricos tienen un papel crucial en la sustentabilidad ambiental y en el desarrollo de la sociedad, pero, la contaminación del agua ha surgido como una amenaza significativa para estos recursos esenciales. La diversidad geográfica del país, desde la región amazónica hasta la costa y la sierra, subraya la importancia de los ríos o de los cuerpos de agua en actividades cruciales como la agricultura, el desarrollo de energía y la distribución de agua potable. Lamentablemente, la contaminación derivada de descargas industriales, vertidos agrícolas y residuos urbanos ha generado un impacto negativo en la calidad del agua en diversas regiones ecuatorianas. Este deterioro no solo amenaza la salud de los ecosistemas acuáticos y la biodiversidad, sino que también contribuye a la resistencia bacteriana debido a que las bacterianas a lo largo de su línea evolutiva han generado mecanismos específicos para poder sobrevivir a diferentes medios, específicamente el agua de los ríos es una de las fuentes hídricas que se ha convertido en un ambiente idóneo para estos microorganismos, permitiendo la interacción directa con otros para lograr transferir genes resistentes o generar nuevos mecanismos de resistencia.

Por ende, es crucial destacar la aparición y propagación a nivel global de nuevos mecanismos de resistencia, siendo la contaminación del agua del río una vía significativa de diseminación hacia el medio ambiente y la población. En este contexto, es preciso realizar investigaciones en muestras de agua del punto de descargo del río Chibunga al río Chambo, situado en el cantón Riobamba, cuyo curso atraviesa 25 comunidades cercanas (Ilustre Municipio de Riobamba, 2015). De acuerdo a varias investigaciones sobre la contaminación del río Chibunga se destaca 4 áreas afectadas críticamente: la comunidad Gatazo, el parque Lineal Chibunga, la parroquia San Luis y el sector de descarga del río Chibunga al río Chambo, además se menciona que este cuerpo de agua se considera uno de los afluentes más contaminados del país y el principal de la Zona 3 (Guamán 2023: pp.30-46).

Lamentablemente el río Chibunga es el principal afluente del río Chambo, el cual enfrenta la influencia negativa de elementos, como la empresa Cemento Chimborazo, actividades agrícolas o ganaderas y la proximidad a centros educativos o recreacionales, convirtiéndose en una de las vertientes con un alto porcentaje de contaminación, dando como resultado una alteración del índice de calidad del agua (ICA), principalmente por presencia de coliformes fecales, oxígeno disuelto, detergentes, etc. (Guamán, 2023: pp.30-46). Además, la descarga de aguas residuales de zonas aledañas a las vertientes ha generado problemas de salud causando preocupación a las entidades competentes ya que el río Chambo es la principal fuente de riego para diferentes cultivos. Por ende, se concluye que el punto de confluencia del río Chibunga y el río Chambo emerge como una de las principales fuentes de propagación de nuevos mecanismos de resistencia bacteriana.

1.2 Limitaciones y delimitaciones

1.3 Limitaciones

Limitación en la toma de la muestra de agua: dado que, este estudio es una investigación de campo pueden existir condiciones ambientales que influyen en la toma de las muestras de agua, la variabilidad del muestreo puede afectar la evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas.

Parámetros en la síntesis de las nanopartículas: factores como el pH, la temperatura y la concentración pueden influir directamente en la interacción de la sal precursora con el extracto.

Condiciones de laboratorio: dado que el presente estudio se realiza en laboratorios de la universidad, existe la posibilidad que los resultados obtenidos no representan la eficacia real de la actividad bactericida de las nanopartículas, debido al entorno.

1.4 Delimitaciones

La presente investigación se realizará en los laboratorios de análisis instrumental, investigación, calidad de agua y productos naturales de la Facultad de Ciencias en el periodo octubre 2023 - marzo 2024.

1.5 Problema general de la investigación

¿Cuál es el efecto bactericida de las nanopartículas de óxido de aluminio sintetizadas mediante una ruta verde, frente a colonias resistentes a antibióticos presentes en muestras de agua del punto de descarga del río Chibunga al río Chambo?

Dado que el agua de estos ríos sufre el descargo inconsciente de contaminantes, se vuelve un medio propicio donde las bacterias pueden adquirir resistencia por diferentes mecanismos disminuyendo así la eficacia de los antibióticos, por ende, se plantea la pregunta de si las nanopartículas sintetizadas mediante el extracto de *Cyphomandra betaceae* con una sal precursora, podrían ser una alternativa debido a su efectividad bactericida.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de óxido de aluminio para evaluar su potencial bactericida en muestras de agua provenientes del punto de descarga del río Chibunga hacia el río Chambo, ubicado en el cantón Riobamba.

1.6.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de óxido de aluminio usando como agente reductor extracto de tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae*) mediante el método de química verde.

- Caracterizar nanopartículas de óxido de aluminio mediante técnicas de Espectroscopía ultravioleta visible (Uv-vis), Espectroscopía de Infrarrojo y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- Determinar la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de aluminio mediante pruebas *in vitro* con colonias bacterianas presentes en muestras de aguas provenientes del punto de descarga del río Chibunga hacia el río Chambo, mediante el método de Compact dry.

1.7 Justificación

La contaminación de los recursos hídricos afecta a toda la sociedad ya que, ríos, cuencas hidrológicas, vertientes y acuíferos, se consideran recursos naturales necesarios para desarrollar todas las formas de vida, debido a esto la salud humana se ha visto afectada por la presencia de sustancias o agentes potencialmente perjudiciales en el agua, convirtiéndolos en un medio propicio para la transmisión de diversas enfermedades.

De acuerdo a este enfoque el río Chibunga es considerado un caudal de suma importancia ya que diferentes investigaciones han señalado que los habitantes aledaños utilizan el agua para el riego de los cultivos como hortalizas e inclusive para el consumo humano, exactamente en el punto de descarga del río Chibunga al río Chambo que constituye otro afluente significativo del cantón es crucial analizar debido a que, los dos cauces son foco de contaminación por el vertido directo de aguas servidas. Además, son nulas las estrategias implementadas para su protección ya que no cuentan con protección jurídica por parte del GAD municipal (Veloz y Carbonell, 2018: pp. 14-15). Por lo que es esencial implementar nuevos mecanismos para evitar que los ríos se conviertan en una fuente de resistencia bacteriana, lo cual podría tener un impacto significativo en la salud y contribuir al deterioro del medio ambiente. Como respuesta a esta problemática surge la necesidad de realizar investigaciones que formen parte de una alternativa que ayude a cuidar y mitigar la contaminación de estos recursos hídricos.

El uso de nanomateriales es una de las alternativas más propicias que ayudan a generar una solución a esta problemática. La nanotecnología ha demostrado que es posible sintetizar nanopartículas con propiedades bactericidas, por su tamaño nanométrico se le atribuye un gran potencial en este ámbito, por eso varios estudios demuestran que la nanotecnología es una alternativa prometedora (Acosta, 2020; pp. 1-3). Además, sus métodos de obtención son varios dentro de los cuales la síntesis verde destaca por ser un proceso simple, rápido y rentable, siendo eco amigable con el ambiente, ya que se usa extractos vegetales en los cuales se encuentran

metabolitos primarios, y secundarios bioactivos que actúan como agentes estabilizadores y reductores (Mourato et al, 2011: pp. 2-8).

Por lo expuesto, es importante evaluar la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de aluminio sintetizadas a partir de *Cyphomandra betaceae*, siendo un método respetuoso con el medio ambiente ya que no emite ningún tipo de contaminante químico hacia el mismo, generando una posible solución para tratar microbiológicamente las aguas del punto de interconexión del río Chibunga y el río Chambo y de esta manera prevenir el desarrollo de nuevos o antiguos mecanismos de resistencia por parte de las bacterias, todos estos procesos son ejecutados en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo con la colaboración técnica del grupo de investigación GIMA.

1.8 Hipótesis

Hipótesis nula (H₀): Las nanopartículas de óxido de aluminio no presentan actividad bactericida frente a colonias bacterianas farmacorresistentes provenientes de muestras de agua del punto de descargo del río Chibunga al río Chambo.

Hipótesis alternativa H_a: Las nanopartículas de óxido de aluminio no presentan actividad bactericida frente a colonias bacterianas farmacorresistentes provenientes de muestras de agua del punto de descargo del río Chibunga al río Chambo.

CAPÍTULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

El fenómeno de resistencia bacteriana representa un problema grande a nivel de la salud pública, su crecimiento acelerado ha producido la reducción de la eficacia de los antibióticos que se emplean para tratar patologías infecciosas. Actualmente, la farmacorresistencia se la ha estudiado en salud; pero, según investigaciones realizadas, se ha determinado que las fuentes hídricas, especialmente las contaminadas, favorecen la supervivencia de microorganismos farmacorresistentes y facilitan la propagación al ser humano (Chiriboga, 2019: pp. 5).

Por esta problemática, actualmente se buscan alternativas para frenar el fenómeno, la nanotecnología es una de las alternativas más prometedoras para ello, pues permite sintetizar nanopartículas con propiedades bactericidas como las nanopartículas de óxido de aluminio.

En Irak, en el año 2021, en la Universidad Al-Qasim Green, se llevó a cabo la investigación titulada “Efecto de citotoxicidad y actividad antibacteriana de nanopartículas de óxido de aluminio”. El trabajo tuvo como objetivo determinar la citotoxicidad y los efectos antibacterianos de las nanopartículas de óxido de aluminio sobre *Streptococcus Pyogenes* y *Proteus vulgaris*. Las Al_2O_3 -NPs empleadas para este fin eran de forma esférica, de 68 nm y con dispersión notable. Para determinar la actividad bactericida se empleó el método de difusión en disco, para ello primero se realizó la siembra de *Streptococcus Pyogenes* y *Proteus vulgaris* en agar Muller-Hinton, después se preparó soluciones a concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de polvo de Al_2O_3 -NP sobre 1 ml de agua destilada y dichas soluciones se colocaron en disco de antibiótico estándar los cuales se impregnaron sobre la superficie del agar dejando incubar por 24 h/37 C° para finalmente medir el halo de inhibición. Se obtuvo como resultado que las Al_2O_3 -NPs mostraron tener mayor actividad antibacteriana a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ formando un halo de inhibición de 18 y 17 mm para *P. vulgaris* y *S. pyogene* respectivamente. Concluyendo así que las nanopartículas si presentan actividad anti bacterianos y citotóxicos, dicha actividad se asoció a que las nanopartículas forman especies reactivas de oxígeno sobre la superficie bacteriana durante el proceso de fotocatalisis cuando se expone a la luz lo que conduce a la peroxidación de fosfolípidos y, finalmente, a la muerte bacteriana (Sabri et al., 2021: pp. 42-48).

En Egipto, Saleh et al. (2023) realizaron otro estudio titulado “Síntesis verde y caracterización de nanopartículas de óxido de aluminio a partir del extracto de semilla de *Phoenix dactylifera*”. Esta

investigación también tuvo como objetivo determinar la actividad bactericida y fitotóxica de las Al_2O_3 -NPs frente a cinco cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Para este fin también se empleó el método de difusión de disco. Una vez obtenidas las Al_2O_3 -NPs se dispersó en agua destilada a concentraciones de 0,05, 0,1 y 0,15 mg/ml y se colocaron en los discos de antibióticos y estos sobre las placas de agar inoculadas durante 24 h/37 °C. Transcurrido este tiempo se pudo observar que las Al_2O_3 -NPs a las concentraciones distintas exhibieron potencial antimicrobiano contra de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, mientras que en el caso de *P. aeruginosa* fue sensible solo a la concentración más alta de 5% de Al_2O_3 -NPs y en el caso de *K. pneumoniae* no se observó inhibición. Por lo tanto, se concluyó que las nanopartículas si presentan actividad antimicrobiana significativamente mayor contra *C. albicans* con un halo de inhibición de 21 mm, seguida de *S. aureus* y luego *E. coli* con halos de inhibición de 18 y 12 mm.

En la India, Sharma y Sharma, investigaron sobre los distintos métodos para la síntesis de nanopartículas de óxido de aluminio y sus aplicaciones. El objetivo de esta investigación fue determinar las ventajas que tiene la síntesis biológica sobre otros métodos. Determinaron que las nanopartículas de alúmina pueden ser obtenidas mediante métodos físicos, químicos y biológicos. Dentro de los métodos físicos, se encuentra el método de precipitación directa, de oxidación en vuelo y de ablación con láser; mientras que en los químicos se encuentra al método de Sol gel. En cuanto se refiere a los métodos biológicos se encuentra la síntesis verde. Los métodos físicos y los químicos tienen limitaciones; son costosos, de bajo rendimiento e involucran el uso de productos tóxicos, mientras que la síntesis verde se enfoca en extractos de plantas, no requiere de presión y energía altas y mucho menos de sustancias tóxicas. Por lo tanto, con este estudio se concluyó que la síntesis verde es un método con una alta tasa de rendimiento, de bajo costo y que no daña el ambiente. En cuanto a sus aplicaciones, se determinó que las Al_2O_3 -NPs por introducir daño oxidativo para inducir toxicidad en las bacterias son de gran interés para tratar aguas residuales (Sharma y Sharma 2020: pp.730-733).

En otro estudio en la universidad de la India en el año 2018, Duraisamy obtuvo nanopartículas de óxido de aluminio empleando los extractos de las hojas de *Aerva Lanta* y semillas de *Terminalia Chebula* como agentes reductores y nitrato de aluminio como sal precursora. Las nanopartículas producidas por las especies vegetales al ser analizadas por microscopía electrónica de barrido revelaron que el tamaño promedio de las Al_2O_3 -NPs del extracto de hojas era de un tamaño de 70 nm de forma esférica y se encontraban aglomeración mientras que las sintetizadas a partir de los extractos de semillas presentaban un tamaño promedio de 50 nm sin embargo estas era menos estables que las anteriores, además se determinó que las nanopartículas sintetizadas pueden tener

propiedades antibacterianas y antifúngicas por lo que es necesario que sean estudiadas en el futuro (Duraisamy, 2018: pp. 428-433).

En cuanto se refiere a Ecuador, se ha desarrollado la síntesis de nanopartículas de otros metales y óxidos metálicos los cuales han demostrado tener efectos bactericidas, por ejemplo en una investigación realizada por la Universidad Politécnica Salesiana de Ecuador denominada “Elaboración de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto de hojas de romero (*rosmarinus officinalis*) y su uso como conservante” menciona que, las nanopartículas pueden ser elaboradas a partir de diferentes fuentes, como plantas, algas o microorganismos, y de igual manera pueden ser obtenidas como subproductos de procesos de combustión. En este estudio, se exploró la síntesis de nanopartículas de plata (NPs-Ag) utilizando el extracto de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis L.*), con la finalidad de desarrollar un compuesto antimicrobiano para su uso como conservante en frutas. Las NPs-Ag fueron caracterizadas cualitativa y cuantitativamente mediante análisis fitoquímicos y espectroscopia UV-VIS, revelando una absorción en el rango de 389-418 nm, asociada a la resonancia de su plasmón superficial. La microscopía electrónica de barrido se utilizó para determinar el tamaño y la morfología de las NPs-Ag, mostrando una forma esférica con un diámetro de aproximadamente 10 nm. En cuanto a la evaluación de la actividad antimicrobiana de las NPs-Ag, se llevaron a cabo ensayos con dos cepas bacterianas: gram negativa *Escherichia coli* y la gram positiva *Staphylococcus aureus*. Se observó una destacada actividad antibacteriana, especialmente contra *E. coli*, donde se obtuvo un halo de inhibición de 3,21 mm. Posteriormente, se aplicaron las NPs-Ag en manzanas con el propósito de evaluar su efectividad como conservante, comparándolas con la cera de abeja utilizada como control y aplicada en la superficie de las frutas. Los resultados indicaron que las nanopartículas sintetizadas contribuyeron a alargar el tiempo de maduración de las frutas (Pardo, et al, 2022: pp.1-12).

2.2 Referencias teóricas

2.2.1 Agua

El agua, se considera un recurso hídrico compuesto químicamente por un átomo de oxígeno unido a dos de hidrógeno, juega un papel fundamental en el desarrollo de diversas formas de vida. Participa en diversos procesos biológicos y abarca más del 70% de la superficie terrestre. Además, está vinculada al desarrollo de actividades industriales, agrícolas y ganaderas (Cirelli, 2012: pp. 1-24).

2.2.2 Demanda y uso del agua

En referencia con la demanda y utilización del agua, un informe exhaustivo realizado por las Naciones Unidas señala que las actividades preeminentes que ejercen una influencia significativa y un elevado consumo de este recurso es la agricultura, acuicultura y la ganadería, representando específicamente el 69 %, sin dejar de lado las actividades industriales mismas que corresponde a un 19 % y finalmente a las actividades domésticas a un 12%, además de acuerdo a esta referencia estadística se estima que año 2050 exista una mayor demanda de agua y siga creciendo entre 20 y 30 % más que el nivel actual de consumo (Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recurso Hídricos, 2019: p. 14).

2.2.3 Fuentes de agua

2.2.3.1 Ríos

Un río se define como un flujo natural de agua que se desplaza en una dirección específica, generalmente desde una fuente, como un manantial o un glaciar, hacia un punto de desembocadura, que puede ser un océano, un mar, un lago o incluso otro río. Estos cuerpos de agua son componentes fundamentales de los sistemas hidrológicos del planeta y cumplen un papel crucial como proveedores de agua dulce a nivel global, esencial para el consumo humano, la agricultura, la industria y la vida silvestre. Ecuador tiene una extensa red de ríos, destacando el río Amazonas (Hernández, 2018: pp. 2-10).

2.2.3.2 Cuencas hidrológicas

Las cuencas hidrográficas, también llamadas cuencas fluviales o cuencas de drenaje, son regiones geográficas definidas por las divisiones naturales en la topografía, donde el flujo del agua converge hacia un punto en común, generalmente un río, lago o mar. Es crucial destacar que desempeñan un papel fundamental en el ciclo hidrológico al influir en la captación, almacenamiento y distribución del agua en la Tierra. Además, sirven como fuentes primarias de agua para el consumo humano, la agricultura, la industria y la vida silvestre (Aranque, et al 2019: pp. 18-30).

2.2.3.3 Acuíferos

Los acuíferos son las formaciones geológicas que contienen y almacenan agua y permiten el movimiento del agua a través de rocas o sedimentos permeables. Estos depósitos son esenciales

ya que pueden contener y transmitir cantidades significativas de agua, funcionando como reservorios subterráneos cruciales para el suministro de agua dulce, siendo explotados mediante pozos para diversos fines. En el caso de Ecuador, al igual que en muchos otros países, la dependencia de los acuíferos para el suministro de agua es significativa, los cuales desempeñan un papel vital en diversas actividades, como proporcionar agua potable a comunidades, facilitar el riego agrícola en áreas de cultivo y sostener los ecosistemas acuáticos (Burbano, et al 2015: pp. 10-14).

2.2.4 Contaminación

2.2.4.1 Contaminación del agua

La relación entre el ser humano y el ecosistema ha dado lugar a inquietantes problemáticas a escala global, generando una preocupación alarmante en cuanto a la contaminación del agua, suelo y aire, que son elementos esenciales para el equilibrio del ecosistema. La contaminación del agua se define como el acto de introducir algún material en este recurso, provocando alteraciones en su calidad y composición química. Conforme a la Organización Mundial de la Salud, el agua se considera contaminada "cuando su composición ha sido modificada de tal manera que ya no cumple con las condiciones necesarias para el uso al que estaba destinada en su estado natural" (Guadarrama et al, 2016: p. 12).

Además, la contaminación del agua está relacionada con desechos industriales, usos de insumos agrícolas, procesos de deforestación e inclusive el aumento de la temperatura.

2.2.4.2 Contaminación de los ríos

La contaminación de ríos es una problemática ambiental significativa que afecta la calidad e idoneidad del agua generando consecuencias negativas para los ecosistemas acuáticos y la salud humana. La principal causa de contaminación es la incorporación de materiales extraños como químicos, microorganismos, aguas residuales, residuos industriales u otros, que perjudican la calidad del agua, convirtiéndose en inaccesibles para los usos actuales como riego de cultivos, suministro de agua para animales, etc., (García, 2022: pp. 8-13).

2.2.4.3 Contaminación de acuíferos

La contaminación de acuíferos puede generar consecuencias graves con respecto a la calidad del agua potable o los ecosistemas acuáticos, dentro de las principales causas está el descargo inconsciente de aguas residuales domésticas ya sea por actividad humana o cuando se presentan fugas en los colectores de saneamiento, mismos que infiltran en el terreno y junto con los vertidos de agua residuales provocan una contaminación puntual, además, en cuanto a las actividades agrícolas también generan contaminación difusa debido al uso excesivo de insumos agrícolas (Guanquiza, et al.,2019: pp. 1-18).

2.2.4.4 Contaminación de las cuencas hidrológicas

La contaminación de las cuencas hidrográficas en Ecuador genera un problema ambiental significativo que afecta la idoneidad del agua y la salud de los entornos acuáticos, debido a que la red de drenaje en una cuenca está constituida por arroyos, ríos y afluentes que específicamente son ríos secundarios que vierten sus aguas al cauce principal, en este contexto la mayor problemática a abordar es la contaminación por diversos factores como actividades industriales, agrícolas, urbanas y de minería (Aranque et al, 2019: pp. 18-30).

2.2.5 Agua de río

Los ríos desempeñan un papel esencial como sistemas de circulación lineal transportando sedimentos y fluidos vitales a lo largo de las cuencas hidrográficas y sus desembocaduras. Mediante diferentes mecanismos, reacciones químicas, energéticas y bioquímicas, estos cuerpos tienen la capacidad de mantener la vida de diversas formas a lo largo de su recorrido (Campoblanco y Gomero, 2000: pp. 1-5). En la historia de la humanidad, los ríos se conocen por ser una fuente esencial, usada para actividades cotidianas como agrícolas, industriales y hasta la generación de energía (Carme, et al, 2018: p. 2).

Por ende, uno de los mayores problemas a discutir es el limitado acceso a este líquido vital, ya que con el tiempo se ha visto afectado por la contaminación y a su vez, se ha evidenciado la disminución de estos afectando así la disponibilidad de estos recursos hídricos, sin dejar de lado el desequilibrio ecológico que se da por esta situación.

2.2.6 Calidad del agua de río

La calidad de agua de un río implica analizar diferentes parámetros que indiquen su idoneidad para diversos usos, industriales, humanos, etc., y lo determinan factores naturales o por

concentración de sustancias en un momento específico, igual que en gran porcentaje introducen actividades humanas al utilizar al río como depósito de desechos (Pauta et al, 2019: p. 77).

De acuerdo con Guzmán (1997, p.125), los medios acuáticos están contaminados por aguas residuales y desechos industriales mismos que generan la presencia de contaminantes orgánicos, metales pesados, nutrientes y sales en dilución. En base a lo señalado Carretero y Pozo, (2007: pp. 370-375), mencionan que, el agua contaminada representa un gran riesgo al contener patógenos y sustancias tóxicas para la salud del ser humano.

2.2.7 Río Chibunga y su confluencia con el Río Chambo

El río Chibunga naes una de las vertientes que surgen de las faldas del volcán Chimborazo, descendiendo por los páramos de El Arenal hasta tocar zonas agrícolas y ganaderas por la parroquia San Juan, durante este transcurso se denomina río Chimborazo hasta llegar a unirse al río Cajabamba tomando ahí el nombre de río Chibunga su cauce se extiende a través de 38 Km, siendo el principal afluente del río Chambo (Veloz y Carbonell, 2018: pp. 14-15).

El río Chambo nace en la unión del río Cebadas y río Guamote, tiene una longitud de 273 Km y 30 afluentes, además, las actividades agropecuarias dominan esta cuenca (Arias & Pérez, 2018: pp. 3-17). Según la la Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas (2015) el promedio anual del caudal del río Chambo es de 62 m³/s de los cuales debido al tipo de consumo sus porcentajes de uso se representan entre: 71,91% riego y abrevadero, 9,56% consumo doméstico, 0,28% Piscicultura, 9,09% Hidroelectricidad, 5,14% Industrial y 4,02% recreativo (Béjar y Mendoza, 2018: pp. 15-20).

En la confluencia del río Chibunga y el río Chambo, no se evidencia mayor actividad antropogénica de la ya presentada durante su recorrido. No obstante, se observa un cambio, en la coloración del agua en el punto de unión de ambos ríos, señalando posibles impactos en la calidad del recurso hídrico por ende es importante destacar que las características del agua en este sitio de monitoreo no son adecuadas ni para el consumo humano ni para actividades agrícolas o ganaderas como se observa en la Figura 1-1.



Ilustración 2-1: Punto de confluencia del río Chibuga y río Chambo

Realizado por: Acosta, I., 2024.

2.2.8 Principales contaminantes del agua

La contaminación de los recursos hídricos de acuerdo con Godoy (2005; p. 68), es aquella; “Agregación al ambiente de elementos, en calidad o cantidad tales que causen un daño o deterioro al medio ambiente, es decir se presenta una alteración del ambiente resultante tras introducción de elementos extraños o indeseables.”

Entre los principales contaminantes tenemos contaminantes orgánicos, nutrientes, metales pesados, contaminación microbiológica, entre otras.

Tabla 2-1: Principales contaminantes que afectan la calidad del agua en ríos

Contaminantes	Descripción	Fuentes
Contaminantes Orgánicos	Son aquellos que se descomponen en el agua, disminuyen el oxígeno disuelto e inducen la eutrofización.	Fuentes industriales, domésticas, poblaciones aledañas.
Nutrientes	Podemos hablar de fosfatos y nitratos, que causan eutrofización. Principalmente provienen de desechos humanos, animales, detergentes y fertilizantes agrícolas.	Fuentes domésticas, industriales, agricultura.
Contaminación Microbiológica	Se trata de desechos domésticos no tratados, criaderos de animales (<i>E. coli</i> , protistas, amebas, etc.).	Fuentes municipales.

Compuestos Tóxicos Orgánicos	Aquí se trata de químicos industriales, plásticos, pesticidas agrícolas, hidrocarburos de petróleo, detergentes sintetizados por el hombre.	Fuentes industriales, asentamientos aledaños, actividades agrícolas.
Químicos Traza y Compuestos Farmacéuticos	Involucran desechos hospitalarios o sustancias peligrosas no tratadas por medio de tratamientos convencionales.	Fábrica química y farmacéutica.
Partículas Suspendidas	Pueden ser orgánicas e inorgánicas, originadas principalmente por prácticas agrícolas, cambio en el uso de la tierra, deforestación, etc.	Industrias, actividad agrícola o cambios en el uso de la tierra.
Salinización	Sucede ante la presencia de sales en suelos y drenajes inadecuados, también por el afloramiento de agua de zonas altas o riego con agua salobre.	Presencia de sales en los suelos, falta de drenaje, irrigación con agua salobre.
Acidificación	Relacionada con un bajo pH del agua, debido a la deposición sulfúrica por actividad industrial y emisiones urbanas.	Fuentes industriales y municipales.

Fuente: Escobar, 2002, p.11

Realizado por: Acosta, I., 2024.

2.2.9 Bacterias

Las bacterias habitan en el planeta hace millones de años, son organismos procariotas unicelulares que tienen un tamaño promedio que varía entre 0,5 a 5 μm , se pueden encontrar en cualquier ambiente como suelos, aguas, aire, como simbioses, parásitos, animales, plantas y patógenos del hombre, en cuanto a su reproducción, se da por fisión binaria, algunas presentan sistemas de deslizamiento, mismos que permiten su movilidad y diseminación, son los organismos más pequeños que poseen todo lo necesario para su autorreplicación y crecimiento, utilizando los recursos disponibles en el material nutritivo que les rodea (Marcano, 2008: pp. 63-65).

En cuanto a su estructura, presenta un citoplasma delimitado por una membrana citoplasmática, cubierta por una pared celular que varía según el tipo de bacteria; su genoma es un filamento largo de ADN, circular y cerrado, llamado nucleoide que no posee membrana, además de abundantes ribosomas o gránulos de inclusión en algunos casos como se observa en la Figura 2-2 (Corsini, 2018: pp. 8-10).

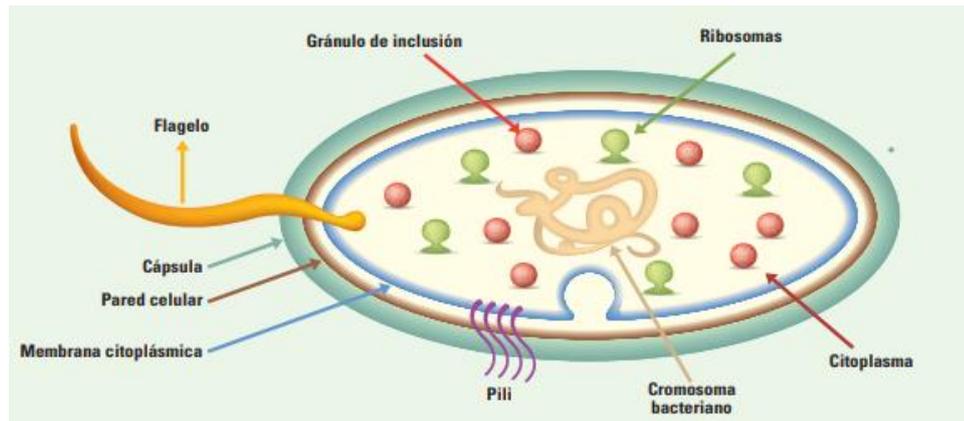


Ilustración 2-2: Morfología bacteriana

Fuente: (Baires,2012, p.21)

2.2.9.1 Morfología

La determinación de las formas de las bacterias está dada por diferentes factores, pero el principal es la rigidez de la pared celular. Los microorganismos se observan con un microscopio óptico o electrónico. Entre las formas básicas de las bacterias hay tres: cocos, que son esféricas, bacilos, bacterias alargadas y, por último, los espirilos, vibriones o espiroquetas, caracterizadas por su forma curvada y espiral (Vargas et al., 2014: pp. 2-6).

Además, las bacterias pueden clasificarse en cuanto a su nombre científico, tinción Gram, necesidad de oxígeno y composición genética como se detalla en la Figura 2-2.

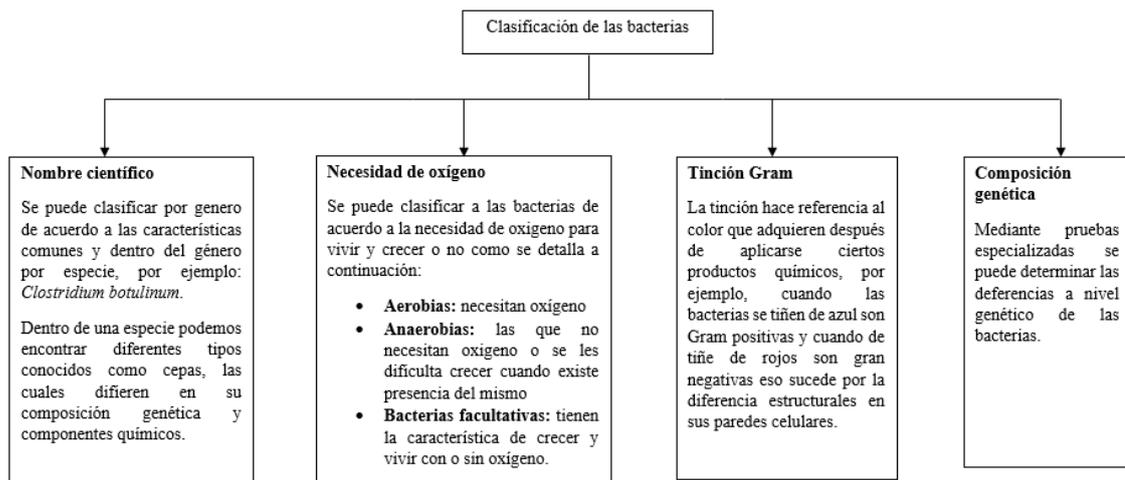


Ilustración 2-3: Clasificación de las bacterias

Fuente: (Bush, 2022, p. 5)

Realizado por: Acosta, I., 2024.

2.2.10 Principales bacterias bioindicadores de la calidad de agua de río

La principal preocupación que indica la alteración de la calidad del agua de los ríos se centra en la contaminación fecal (Álvarez, 2017: pp. 6-7). Por ende, es importante identificar la presencia de contaminación en las aguas y los bioindicadores comúnmente empleados para evaluar la contaminación fecal dentro de esto tenemos a las bacterias coliformes fecales, coliformes totales, enterococos para detectar la presencia de contaminación fecal y *Pseudomonas* como bacteria ubicua en las aguas que se detallan a continuación:

2.2.10.1 Coliformes totales

Los coliformes totales son microorganismos reconocidos como un indicador de contaminación bacteriana, dado que está en el tracto gastrointestinal humano y puede persistir en el agua durante períodos más prolongados que las patógenas. Entre los microorganismos que constituyen los coliformes totales se incluyen *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*, y en la actualidad, se han identificado cepas patógenas que pueden causar enfermedades graves en los seres humanos, como infecciones del tracto urinario, bacteriana y meningitis (Ríos et al., 2017: pp. 236-247).

2.2.10.2 Coliformes fecales y *Escherichia coli*

Los coliformes fecales son un subgrupo de los coliformes totales, estructuralmente son bacilos Gram negativos aerobios y anaerobios facultativos con capacidad de fermentar la lactosa a 44.5 °C, además, son conocidos como termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas elevadas. Relativamente el 95% del grupo de coliformes presentes en heces fecales, están formados por *Escherichia coli* y ciertas especies de *Klebsiella*. (Díaz et al, 2003: pp. 225 -230).

2.2.10.3 *Streptococcus fecales*

Los *Streptococcus fecales* son bacterias Gram positivas como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Estas bacterias se distinguen por su capacidad para prosperar en un entorno con aproximadamente el 6,5 % de NaCl, pH alcalinos de 9,6 y temperaturas que oscilan entre los 10 y 45 °C. Durante el proceso de control de calidad, si el agua no presenta coliformes y *Escherichia coli* pero muestra una cantidad significativa de *Streptococcus*, se puede inferir que

la contaminación es de larga data, ya que este género bacteriano exhibe una longevidad en el agua mayor que la de los coliformes (Marín, 2019: p. 132).

2.2.10.4 Pseudomonas

El género *Pseudomonas* es un bacilo gramnegativo, patógeno y oportunista que provoca infecciones en individuos con un sistema inmunológico debilitado. Se distribuye naturalmente en suelos y aguas tropicales, además de formar parte del microbiota intestinal normal en humanos (Marín, 2019: p. 133).

Además, como lo explica Marín (2019: p. 133), el género *Pseudomonas aeruginosa* ha sido identificado en cisternas, tuberías y sistemas de distribución de agua potable, demostrando su notable supervivencia incluso después de pasar por procesos de desinfección. Su resistencia a los tratamientos se debe a una capa gruesa de polisacáridos en su estructura celular, que actúa como una barrera fisicoquímica, protegiéndola de desinfectantes como el cloro.

2.2.11 Mecanismos de resistencia

El agua es un recurso necesario y vital para los humanos, al igual que es un hábitat natural de muchos organismos bacterianos. Por ende, las fuentes hídricas son un medio favorable para la aparición y diseminación de bacterias resistentes. Las bacterias son microorganismos con una exclusiva capacidad de adaptación, capaces de generar mecanismo de resistencia frente a los antibióticos, de acuerdo con bibliografía existen tres tipos de resistencia que se detallan a continuación:

2.2.11.1 Resistencia natural o intrínseca

La resistencia intrínseca también denominada primaria, se trata de una propiedad natural de cada grupo bacteriano, es decir, esta resistencia está codificada directamente por la bacteria, específicamente se trata de la capacidad para resistir la acción de ciertos antibióticos o agentes antimicrobianos como ejemplo se menciona la resistencia de las bacterias Gram negativas frente a la vancomicina (Navarro, 2012: p. 21).

2.2.11.2 Resistencia adquirida

La resistencia adquirida sucede cuando la resistencia bacteriana solo aparece en algunas de las cepas pertenecientes a una misma especie, esto sucede cuando existe mutación cromosómica o adquisición de nuevos genes (Navarro, 2021, p. 12-13).

Los fragmentos de ADN que proporcionan resistencia a las bacterias se transfieren por dos vías que se detallan a continuación:

- Transferencia horizontal de genes: el material genético con resistencia es transmitido de bacterias madres a bacterias hijas (Chiriboga, 2019 pp. 8-9).
- Transferencia vertical de genes: se da cuando dos bacterias que no tienen parentesco se transfieren material genético, se conoce por ser rápida y eficaz para la adquisición de genes por parte de bacterias receptoras (Chiriboga, 2019 pp. 8-9).

2.2.11.3 Resistencia transmisible

La resistencia transmisible se considera un mecanismo de transferencia de genes entre bacterias la cual permite una difusión rápida y extensa de la información genética, se puede observar en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, a nivel estructural este mecanismo está mediado por plásmidos, transposones e integrones (Navarro, 2021, p. 12-13).

2.2.12 Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano se refiere al aumento de sus estructuras y componentes celulares, obteniendo un incremento en el número de células microbianas, es importante mencionar que cuando el microorganismo es cenocítico; quienes la duplicación del genoma no se acompaña de división celular se evalúa que es un aumento de tamaño, pero no de número de células. Para determinar si existe crecimiento, se observa un aumento en el número de microorganismos divididos por procesos de gemación y fisión binaria, las células microbianas que no experimentan crecimiento se consideran no viables, ya que, tras un período de incubación, no pueden multiplicarse, por la falta de nutrientes adecuados en el entorno o por la presencia de sustancias tóxicas que inhiben el crecimiento (Prescott, et al., 2002).

Para poder evaluar el crecimiento de una población microbiana se realiza a través de la curva de crecimiento ya que estudia la cinética del crecimiento bacteriano y fisiología celular, por ende, la curva resultante se investiga a través de cuatro fases representadas gráficamente en la Figura 4-2.

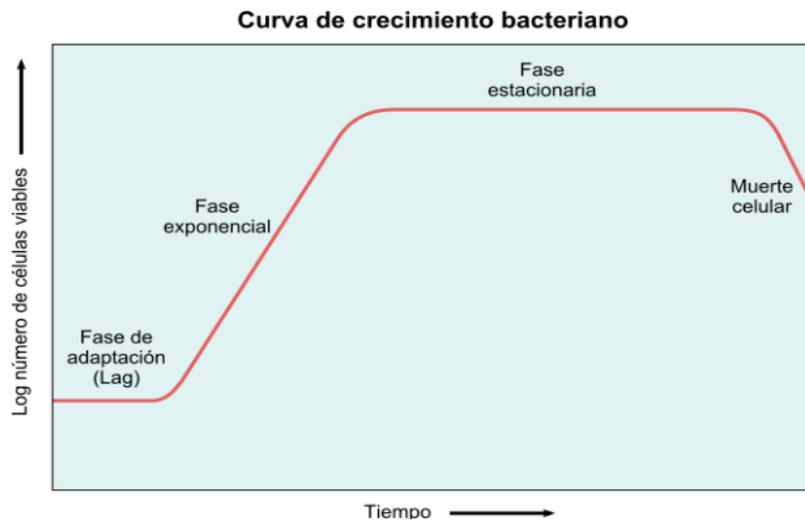


Ilustración 2-4: Curva de crecimiento bacteriano

Fuente: (Tapia W., 2014)

2.2.12.1 Fase de adaptación (*Lag*)

Se considera fase de *lag* cuando al introducir el microorganismo en un cultivo fresco no se produce un aumento inmediato del número de células o de masa, esto puede deberse a varios factores como; las células pueden ser viejas y poseen cantidades reducidas de ATP, el medio puede ser diferente al anterior donde crecían o tal vez los microorganismos se hayan alterado, por estas razones en la fase de latencia las células se equipan de nuevo, replican su ADN, comienzan a incrementar más y finalmente se dividen (Prescott, et al, 2002).

2.2.12.2 Fase exponencial

También conocida como fase logarítmica (*log*), aquí los microorganismos crecen y se dividen hasta alcanzar el nivel máximo posible en dependencia de su potencial genético, el tipo de medio y las condiciones en que crecen, su velocidad de crecimiento va a ser constante, es decir, los microorganismos se duplican en número a intervalos regulares (Prescott, et al, 2002).

2.2.12.3 Fase estacionaria

En esta etapa el crecimiento exponencial se inhibe y la curva de crecimiento es horizontal, las bacterias por lo general alcanzan esta etapa cuando la concentración es de 10^9 células por ml, las razones principales por las cuales las bacterias entran en la fase estacionaria son la limitación de nutrientes, acumulación de productos residuales tóxicos e inclusive las bacterias en cultivo continuo pueden entrar en fase estacionaria debido al estrés nutricional o hambre (Prescott, et al, 2002).

2.2.12.4 Fase de muerte

En la que las células metabólicamente activas mueren por los cambios ambientales perjudiciales como la privación de nutrientes y la acumulación de residuos tóxicos, la muerte de una población microbiana es logarítmica, una cantidad constante de células mueren cada hora, así que la muerte microbiana se define como la pérdida irreversible de la capacidad de multiplicarse por las células (Prescott, et al, 2002).

2.2.13 Métodos de medición del crecimiento

En cuanto al crecimiento microbiano se puede medir por el aumento de peso de la masa de las células o el cambio sucesivo en el número de células, por eso se detallan técnicas diferentes usadas para medirlo.

2.2.13.1 Recuento directo mediante contadores electrónico

Para esta técnica se puede emplear un contador electrónico diseñado para contabilizar glóbulos rojos, en cuanto a sus componentes este dispositivo consta de dos cámaras separadas por un material no conductor que contiene un orificio de tamaño similar al de las células a contar. Cada cámara posee un electrodo y la suspensión de células se coloca en una de las cámaras aplicando presión para que las células pasen a través del orificio hacia la otra cámara, cada vez que una célula atraviesa el orificio provoca un cambio en la conductividad eléctrica registrado por un dispositivo electrónico, finalmente el contador indica el número de células en esa suspensión (Gutiérrez S., 2008 pp. 1-21).

No obstante, este método presenta ciertas limitaciones:

- Se realiza el conteo de células tanto vivas como muertas.
- Las suspensiones deben carecer de partículas distintas a los microorganismos a contar, ya que el dispositivo no puede distinguir entre unas y otras.

2.2.13.2 Recuento directo al microscopio

El método de recuento directo al microscopio es una forma rápida de estimar el número de células microbianas ya que se determina de manera directa contándole al microscopio con la ayuda de cámaras especiales microbianas, pero ante estas ventajas también existen limitaciones que se describen a continuación:

- No es posible diferenciar entre células que están vivas y aquellas que han fallecido.

- La tarea de contar células extremadamente pequeñas presenta dificultades.
- Lograr precisión en el conteo resulta complicado.
- El método no es idóneo para suspensiones celulares de baja densidad; las soluciones deben contener unas 10^7 células/ml o más (Gutiérrez S., 2008 pp. 1-21).

2.2.13.3 Determinación de células viables

Una célula viable puede dividirse y formar una progenie, para determinar células viables es el número de células en las muestras capaces de formar colonias sobre un agar llamado recuento en placa.

Su procedimiento se basa en realizar diluciones seriadas de la muestra e inocular pequeños volúmenes conocidos en placas Petri, la técnica de siembra a usarse puede ser por extensión o por vertido en placa, finalmente se incuba hasta que aparecen las colonias correspondientes. Se parte del supuesto de que cada colonia se origina a partir de la división consecutiva de una única célula, conociendo el volumen sembrado, la dilución de la muestra de la cual proviene y contando el número de colonias en la placa correspondiente, es posible calcular la cantidad de células viables en la muestra, a continuación, se detallada gráficamente el proceso para determinación células viables en la Figura 5-2 (Gutiérrez S., 2008 pp. 1-21).



Ilustración 2-5: Determinación de células viables

Fuente: (Gutiérrez S., 2008)

2.2.13.4 Determinación de la masa microbiana

En numerosas investigaciones, especialmente aquellas relacionadas con la bioquímica de los procesos de crecimiento, se opta por determinar la masa de la población en lugar del número de células presente, ya que la masa puede evaluarse directamente mediante la medición del peso seco o húmedo de la muestra, también es posible determinar la masa considerando el contenido de nitrógeno, proteínas o ADN (Gutiérrez S., 2008 pp. 1-21).

Además, es importante mencionar que existe otra vía indirecta para estimar la masa celular que consiste en evaluar la actividad metabólica de la célula midiendo el consumo de oxígeno o la producción de dióxido de carbono, finalmente el uso de métodos ópticos como los turbidimétricos que miden la turbidez son una opción viable.

2.2.14 Placas Compact Dry

Las placas Compact Dry, desarrolladas bajo la normativa certificada ISO 9001, representan un método de prueba listo para usar que contribuye a la reducción del tiempo necesario para realizar pruebas microbianas, fueron fabricadas por la empresa japonesa Nissui Pharmaceutical, ofreciendo una solución integral al combinar las características de las placas preparadas convencionales, como ser un medio estéril y preparado, con las ventajas de los medios deshidratados, tales como una larga caducidad y la posibilidad de siembra en masa. Además, estas placas son medios cromogénicos y gracias a sus propiedades permiten un procesamiento eficiente de muestras, eliminando la necesidad de realizar tareas como pesar, diluir, auto clavar, fundir y dispensar medios en polvo. Como resultado, se aumenta mucho la eficiencia, y se reducen los costos asociados, este enfoque maximiza la productividad y mejora la eficiencia operativa. Además, su facilidad de almacenamiento es destacable, ya que estas placas pueden conservarse a temperatura ambiente hasta dos años, siendo utilizables en un rango de incubación de 20 a 42 °C. La estructura rígida de Compact Dry facilita su transporte y permite apilar de manera segura un número ilimitado de unidades (Nissui, 2004 pp. 19-22).

En el proceso de cultivo, los microorganismos presentes en la muestra se reproducen en el medio, dando lugar a la formación de colonias visibles. La posibilidad de contar directamente estas colonias facilita la obtención de resultados cuantitativos y precisos sobre la carga microbiana en la muestra, esta técnica no solo simplifica el proceso, sino que también permite la identificación de diversos microorganismos, incluyendo bacterias, patógenos, levaduras y mohos (Nissui, 2004 pp. 19-22).

2.2.15 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son sustancias o entornos que proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento, la proliferación y el estudio de microorganismos, como bacterias, levaduras, hongos y células de tejidos.

Los medios de cultivo se pueden clasificar según:

- Medios de cultivo selectivos: están diseñados para favorecer el crecimiento de ciertos microorganismos mientras inhiben a otros, mediante la incorporación de agentes selectivos como antibióticos, sales o colorantes. Estos medios permiten aislar y estudiar cepas específicas en muestras complejas (Corry, et al, 2003)
- Medios de cultivo diferenciales: están formulados para distinguir entre diferentes tipos de microorganismos según sus características bioquímicas. Utilizan indicadores, como colorantes o sustratos específicos, que revelan reacciones metabólicas distintivas, como por ejemplo la capacidad de fermentar azúcares o la producción de ciertas enzimas (Corry, et al, 2003).
- Medios de cultivo enriquecidos: son medios que se han enriquecido con componentes adicionales, como sangre, suero o extractos de tejidos, para proporcionar nutrientes adicionales y favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes (Corry, et al, 2003).

2.2.15.1 Agar Nutritivo

Es un tipo de medio de cultivo utilizado en microbiología para el crecimiento y la propagación de una amplia variedad de microorganismos, como bacterias, levaduras y hongos. El agar nutritivo proporciona una fuente de carbono, nitrógeno, minerales y otros nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos. Los extractos de carne y levadura son ricos en aminoácidos y vitaminas que son esenciales para el crecimiento celular (Rodríguez, 2018: pp. 15-347).

2.2.15.2 Agar MacConkey

Es un medio altamente selectivo, diseñado específicamente para la detección y cuantificación de organismos coliformes, así como para la identificación y aislamiento de cepas de *Salmonella* y *Shigella* en muestras patológicas y alimenticias. La presencia de sales biliares y cristal violeta en el medio inhibición del crecimiento de la flora Gram positiva, en cuanto al indicador de pH rojo neutro, pretende verificar la degradación de la lactosa por parte de los microorganismos fermentadores, y los no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras y traslúcidas (Rodríguez, 2018: pp. 15-347).

2.2.15.3 Agar EMB (Eosina y Azul de Metileno)

Este medio se emplea para aislar, cultivar y diferenciar bacilos entéricos Gram negativos a partir de diversas muestras clínicas y de otro origen, siguiendo la formulación recomendada por la *American Public Health Association*.

La composición del medio que incluye eosina junto con azul de metileno presenta una acción inhibitoria limitada sobre las bacterias Grampositivas y sirve como indicador de la fermentación de la lactosa. De esta manera, los organismos coliformes se distinguen por la formación de

colonias de 2 a 3 mm de diámetro, con un centro de color púrpura oscuro y brillo metálico (Rodríguez, 2018: pp. 15-347).

2.2.15.4 Agar TSA (Agar Triptona Soya)

El Agar Triptona Soya ha desempeñado un papel fundamental como medio de cultivo general a lo largo de muchos años, siendo utilizado tanto para el crecimiento de diversos microorganismos aerobios como anaerobios, además, este medio se emplea para el mantenimiento y la preservación de cultivos puros, así como para aislar microorganismos de especímenes clínicos. Cuando se utiliza como Base de Agar Sangre se añade un 5-7 % de sangre de carnero, caballo o humana, desfibrilado y estéril al medio previamente esterilizado y enfriado a una temperatura de 45-50 °C. Esta modificación permite realizar pruebas de reacciones hemolíticas y estudios de sensibilidad bacteriana frente a agentes antimicrobianos. Además, el Agar Triptona Soya se emplea en la preparación del Agar Chocolate, garantizando un crecimiento óptimo de microorganismos como *Neisseria*, *Haemophilus influenzae* u otros. (Rodríguez, 2018: pp. 15-347).

2.2.16 Antibióticos

Los antibióticos son aquella sustancia química producida por un organismo vivo o fabricada mediante síntesis, que puede detener el crecimiento de microorganismos patógenos mediante su acción bacteriostática o provocar su muerte bactericida. Se han identificado antibióticos, y muchos han llegado a ser útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Estos antibióticos muestran diferencias en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, en sus espectros antibacterianos y en los mecanismos a través de los que actúan (Flores, 2014: pp. 2-36).

Para la prescripción correcta de los antibióticos es importante identificar una enfermedad, entidad nosológica, síndrome o condición de salud-enfermedad, ya que se estima que cerca del 10 al 50 % de las prescripciones son innecesarias. Se sabe que dosis subóptimas de antibióticos, tratamientos cortos o falta de apego de pacientes por tratamientos prolongados son algunos de los factores que han contribuido a la resistencia bacteriana (Flores, 2014: pp. 2-36).

2.2.17 Mecanismos de acción de los antibióticos

Existen varios mecanismos de acción que los antibióticos emplean para afectar el crecimiento o la supervivencia de las bacterias, en cuanto a los fármacos antimicrobianos pueden matar directamente a la célula ejerciendo una acción bactericida por otro lado cuando impiden su

crecimiento tienen actividad bacteriostática, por esta razón se resumen los principales mecanismos de acción:

2.2.17.1 Inhibición de la síntesis de la pared celular

Diferentes antibióticos, como las penicilinas y las cefalosporinas, interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana, ya que consiste en una red macromolecular llamada peptidoglicano, que impide la síntesis de este peptidoglicano, queda debilitada, finalmente, la célula se lisa. Es importante mencionar que las células humanas no poseen paredes con peptidoglicano, por ende, estos antibióticos tienen muy poca toxicidad para las células del huésped (Chopra y Roberts, 2021: pp. 232-260).

2.2.17.2 Inhibición de la síntesis de proteínas

Antibióticos como los aminoglucósidos o los macrólidos afectan la síntesis de proteínas en las bacterias, uniéndose a los ribosomas y bloqueando la elongación de la cadena polipeptídica o interfiriendo con la síntesis de proteínas en etapas posteriores, además pueden interferir con la transcripción del ADN a ARN, lo que reduce la disponibilidad de ARNm para la síntesis de proteínas, también en caso de los inhibidores de la subunidad 30S por ejemplo, la tetraciclina puede bloquear la iniciación del proceso de traducción al unirse a la subunidad ribosómica (Díaz, 2014: p. 15).

2.2.17.3 Inhibición de la síntesis del ácido nucleico

Algunos antibióticos, interfieren con la síntesis del ADN bacteriano al inhibir las enzimas responsables de la replicación del ADN o de la transcripción del ARN por ejemplo las quinolonas representan una de las categorías de antibióticos bactericidas más empleadas, estos agentes quimioterapéuticos sintéticos operan inhibiendo las topoisomerasas, enzimas encargadas de catalizar el superenrollamiento del ADN cromosómico y garantizar una correcta división celular (Prescott, et al, 2002).

2.2.17.4 Alteración de la membrana citoplasmática

En cuanto al mecanismo de acción que algunos antibióticos como las polimixinas alteran la membrana citoplasmática, actúan interfiriendo con la permeabilidad de la membrana, provocando la pérdida de metabolitos esenciales provocando la muerte de la célula (Torregrosa, et al, 2012).

2.2.18 Nanotecnología

La nanotecnología fue acuñada por Richard Feynman en 1959, a través de su premisa “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, mediante el cual se describe un proceso que permite la manipulación de átomos y moléculas usando instrumentos de medición precisos logrando así construir sistemas en nanoescala, es considerada un campo de la ciencia que se enfoca en la síntesis y caracterización de nanopartículas, siendo una opción viable, ya que se maneja estructuras que tienen tamaños nanométricos en una escala de 0.1 a 100 nm, la misma permite la observación de propiedades u otros fenómenos que permiten controlar su tamaño, superficie y forma (Rodríguez. y Bravo, 2021: pp. 3-17)

La nanotecnología puede mejorar y transformar diferentes áreas o campos para el ser humano, y se pueden ser aplicadas en investigaciones como aplicaciones médicas, energía renovable, electrónica y computación, problemas ambientales, entre otros (Gómez, 2018: pp. 1-6).

2.2.18.1 Nanopartículas

Las nanopartículas son partículas sólidas o líquidas con dimensiones en el rango de nanómetros (1 a 100 nanómetros), debido a su tamaño reducido presenta una serie de características, lo que las diferencia significativamente de los materiales a mayor escala, debido a su tamaño nanométrico pueden tener un comportamiento y propiedades diferentes de las formas macroscópicas, además presentan una alta relación superficie-volumen debido a su pequeño tamaño y gran área superficial, en comparación con su volumen haciéndolas altamente reactivas y eficientes en la absorción y adsorción de sustancias, otra característica importante es que gracias al pequeño tamaño y la interacción de la luz con la materia a la escala nanométrica las mismas pueden mostrar propiedades ópticas únicas, como fluorescencia, plasmones de superficie y absorción de luz dependiente del tamaño (Joachin, 2014: pp. 17-23).

2.2.18.2 Caracterización

La caracterización es una rama de la nanometrología que se basa en la medición de las propiedades químicas y físicas de las nanopartículas, dentro de los principales parámetros estudiados en la caracterización son la forma y el tamaño, pero también se evalúa el grado de agregación, la carga superficial, la distribución de tamaños y el área superficial (Pardo, et al, 2022: pp. 45-58).

2.2.19 Métodos de caracterización de las nanopartículas

2.2.19.1 Microscopia de Barrido electrónico (SEM)

El microscopio electrónico de barrido es una herramienta esencial en la caracterización de nanopartículas, ya que permite determinar con precisión su forma, tamaño y composición elemental. Su capacidad para analizar partículas con dimensiones de tan sólo 10 nanómetros o

más grandes lo convierte en una herramienta invaluable en la nanociencia y la nanotecnología. Además de proporcionar imágenes detalladas en tres dimensiones debido a su impresionante profundidad de campo, esta técnica utiliza la emisión de electrones de la muestra para generar imágenes (Enrique, et al. 2019).

2.2.19.2 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR)

La Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica para identificar los grupos funcionales presentes en una muestra detectando absorciones de radiación infrarroja. Esta técnica se basa en la interacción entre la radiación infrarroja y las vibraciones moleculares de los enlaces químicos presentes en una sustancia. La muestra se expone a un rango de longitudes de onda infrarrojas, y los resultados se registran en un espectro que muestra las absorciones específicas de la muestra según la frecuencia, cada grupo funcional tiene sus propias frecuencias características de absorción, identificando los componentes químicos presentes. La FTIR ha demostrado ser esencial en diversos campos, como la química orgánica, la bioquímica y la investigación de materiales (Serrano, 2007: pp. 2-35).

2.2.19.3 Espectroscopia ultravioleta visible (Uv-vis).

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) es una técnica analítica que se fundamenta en la capacidad de los analitos para absorber radiación electromagnética en la región de los espectros ultravioleta y visible, cuando esta radiación incide en un compuesto, este último absorbe la luz y sus moléculas pasan a un estado excitado de mayor energía.

La UV-Vis puede obtener información cualitativa y cuantitativa diversa sobre las propiedades de las sustancias en estudio (Kora, 2018: pp. 20-25).

2.2.20 Síntesis de nanopartículas

La nanociencia se enfoca en construir estructuras de tamaño nanométrico para el diseño de nanodispositivos, la síntesis de nanopartículas ha generado interés investigativo debido a sus propiedades magnéticas, catalíticas, ópticas y electrónicas, además la modulación en cuanto a su tamaño forma y superficie de la nanopartícula, sin alterar su composición generan una gran ventaja.

Las nanopartículas pueden sintetizarse por varios métodos por sus propiedades físicas y químicas únicas. Estas técnicas se agrupan en dos categorías llamadas, «de arriba a abajo» y las «de abajo a arriba» (Lárez, et al, 2009: pp. 2-150).

La primera, se basa en la división de los sólidos en partículas más pequeñas involucrando procesos como molienda mecánica, grabado químico, ablación térmica, ablación láser y procesos de explosión, en cambio la segunda categoría «de abajo hacia arriba», se enfoca en la fabricación de nanopartículas mediante la condensación de átomos en una fase gaseosa o en solución, por esta razón, se va realizar procesos de precipitación, condensación, pirólisis por pulverización, procesos sol-gel, procesos aerosol, etc., finalmente en esta categoría también encontramos la bio reducción o síntesis verde (Velidandi, et al, 2023: pp. 2-27).

2.2.21 Síntesis verde

Entre los métodos biológicos que emplean microorganismos y plantas, se encuentra la síntesis verde, denominada también como bio reducción o síntesis biológica la misma que permite la formación de estructuras con una escala nanométrica usando bacterias, hongos, plantas y sus extractos, convirtiéndose en una alternativa no tóxica amigable con el medio ambiente e inclusive supera las expectativas de las nanopartículas obtenidas por métodos químicos y físicos en cuanto a costo y características (Edayadulla, et al, 2015: pp. 1-8).

2.2.21.1 Síntesis de nanopartículas con plantas

Las propiedades singulares de las nanopartículas metálicas, influenciadas por el efecto del tamaño cuántico, han generado un interés creciente en diversos campos, como la óptica, catálisis, optoelectrónica, detección química/bioquímica, fabricación biomédica y de nanoestructuras. Paralelamente, se destaca la relevancia de la síntesis de estas nanopartículas utilizando extractos vegetales, una técnica conocida como fito síntesis de nanopartículas. Este enfoque presenta ventajas notables al aprovechar los extractos de plantas como agentes reductores y de protección, además de su reconocimiento por su respeto al medio ambiente, sostenibilidad y rentabilidad (Momisha, 2019: pp. 2-27).

La biosíntesis de nanopartículas se posiciona como una alternativa sostenible y respetuosa con el entorno en comparación con métodos químicos convencionales. La utilización de extractos de plantas en este proceso permite la reducción y estabilización de precursores metálicos, dando lugar a nanopartículas con propiedades únicas (Álvarez, 2020: pp.13-14). La simplicidad y viabilidad económica de este método han contribuido a su creciente popularidad, destacándose como un "boom" reciente. Este enfoque no solo posibilita la producción de nanopartículas con formas y tamaños controlados, sino que también incorpora compuestos bioactivos presentes en los extractos de plantas, confiriéndoles propiedades específicas, como actividad antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria.

2.2.22 Nanopartículas de óxido de aluminio

Las nanopartículas de óxido de aluminio destacan por su excepcional resistencia mecánica, estabilidad térmica y propiedades dieléctricas, convirtiéndolas en candidatas ideales para la industria electrónica, recubrimientos protectores y catalizadores (Smith et al., 2020) además su caracterización puede ser mediante métodos como Microscopía Electrónica de Barrido, Espectroscopia de absorción de Infrarrojo y Espectroscopia UV- Visible, como se observa en la Figura 2-6.

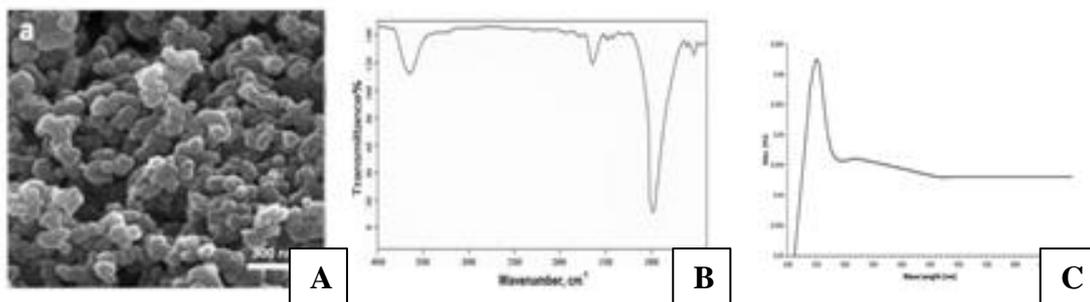


Ilustración 2-6: Determinación de células viables

Fuente: (Ahmed K Saleh.et.al., 2023 & Anwar S. Jawad et.al., 2021)

En la última década, el enfoque en la síntesis y aplicación de estas nanopartículas ha experimentado un notable aumento. Investigaciones recientes han explorado métodos innovadores, como la síntesis asistida por láser y el uso de precursores específicos, para optimizar el tamaño, la forma y la distribución de las nanopartículas, maximizando así su rendimiento en diversas aplicaciones, además el óxido de aluminio (Al_2O_3) a escala nanométrica presenta propiedades excepcionales que lo convierten en un material de gran interés en diversas aplicaciones. Sus propiedades únicas a esta escala incluyen una alta área superficial específica, tamaño de partícula reducido y comportamiento cuántico. Estas características hacen que las nanopartículas de óxido de aluminio sean altamente prometedoras en áreas como la catálisis, la electrónica, la nanotecnología y la medicina. (Wang et al., 2021 y Zhang et al., 2019).

Comparadas con otras nanopartículas de óxidos metálicos, como las de zinc, hierro o titanio, las nanopartículas de óxido de aluminio exhiben diferencias clave en propiedades físicas y químicas. Su excepcional estabilidad térmica y baja toxicidad las posicionan favorablemente en aplicaciones de alta temperatura y biomédicas, respectivamente, destacando su versatilidad en distintos campos (Chen et al., 2017 y Wang et al., 2019).

2.2.22.1 Nanopartículas de óxido de aluminio como bactericida

Las nanopartículas de óxido de aluminio ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{NP}$) se destacan como un candidato de gran interés, siendo utilizadas como agentes antimicrobianos durante la última década. Su baja toxicidad, atribuible a la inercia del óxido de aluminio, las convierte en una opción valiosa. Las $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-NP}$ exhiben una notable actividad bactericida contra un amplio espectro de bacterias patógenas, incluso a dosis bajas, logrando una inhibición completa del crecimiento bacteriano a concentraciones tan reducidas como unos pocos $\mu\text{g}/\text{ml}$. Estas nanopartículas han demostrado ser particularmente eficaces contra bacterias resistentes a los antibióticos, desempeñando un papel significativo en el desarrollo de cepas de resistencia (Anwar y Qasim, 2021).

En consonancia con una investigación reciente llevada a cabo por Ahmed K.S. et.al, en 2023, se exploró la acción antimicrobiana de las $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-NP}$ en tres concentraciones distintas, utilizando métodos de difusión en disco. Este estudio abordó la influencia directa de estas nanopartículas en patógenos relevantes para los seres humanos. La investigación profundizó en la efectividad de las $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-NP}$ como agentes bactericidas, destacando su potencial aplicación en la lucha contra microorganismos perjudiciales para la salud humana misma que se detallan en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2: Actividad antimicrobiano de las $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-NPs}$ en diferentes concentraciones

Organismo	Diámetro de la zona de inhibición			
	Control	$\text{Al}_2\text{O}_3\text{ NPs1}$	$\text{Al}_2\text{O}_3\text{ NPs2}$	$\text{Al}_2\text{O}_3\text{ NPs3}$
<i>E. coli</i>	0.0 ± 0.0	9 ± 0.51	10 ± 0.93	12 ± 0.33
<i>P. aeruginosa</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	12 ± 1.07
<i>K. pneumoniae</i>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>S. aureus</i>	0.0 ± 0.0	12 ± 0.37	15 ± 0.35	18 ± 1.08
<i>C. albicans</i>	0.0 ± 0.0	15 ± 0.95	17 ± 1.28	21 ± 1.85

Fuente: (Ahmed K.S. et.al., 2023).

Realizado por: Acosta, I., 2024.

2.2.22.2 Mecanismo de acción de las nanopartículas de óxido de aluminio

En cuanto a los mecanismos de acción con efecto bacteriostático que presentan las $\text{Al}_2\text{O}_3\text{ NP}$ son la interacción electrostática de estas nanopartículas con la membrana externa/pared celular bacteriana y la formación de cationes de aluminio que inician la generación de ROS y oxidan bio políesteres mismo que se detallan a continuación y se observan en la Figura 7-2 (Sergey, et al, 2022: pp. 1-6).

La interacción de las nanopartículas de óxido de aluminio con la pared celular bacteriana está determinada por la carga superficial dada por la adsorción de iones en la superficie y esta carga interactúa con la pared celular bacteriana misma que también posee una carga superficial, por ejemplo, de acuerdo con Jwad et al, (2019: pp. 316-317) demostró que las NP de aluminio presentan una carga positiva; por lo, presentaba una conexión fuerte en la superficie de las bacterias que presentaban carga negativa. Debido a este fenómeno se afirma que al suceder esta interacción electrostática se provoca una interrupción de la integridad de la membrana.

Diferentes estudios han demostrado que las nanopartículas de origen metálico presentan mecanismos antibacterianos que involucra la liberación de ROS (Especies reactivas de oxígeno), estas sustancias al ser tóxicas pueden inducir estrés oxidativo causando daño en estructuras celulares, pared celular inhibición enzimática y finalmente en el ADN (Jwad et al,2019: pp. 316-317).

Las nanopartículas de alúmina considerando la formación de cationes de aluminio y liberación de iones metálicos, puede desencadenar la formación de cationes de aluminio, los cuales, a su vez, podrían participar en la generación de ROS. En cuanto a la oxidación de bio políesteres, esta ocurre debido a que la presencia de cationes de aluminio generados por las nanopartículas de Al_2O_3 podría contribuir a la oxidación de bio políesteres presentes en las membranas celulares bacterianas. Esta oxidación podría provocar daño estructural en las membranas, afectando la integridad celular y las funciones esenciales (Sirelkhatim, et al, 2015: pp. 219-242).

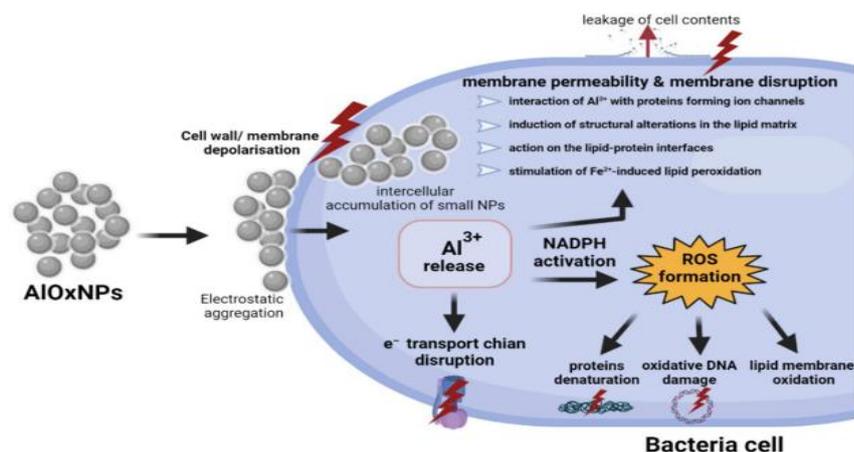


Ilustración 2-7: Representación esquemática de los principales mecanismos

Fuente: (Sergey V. Gudkov. et.al, 2022)

2.2.23 Tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae*)

El tomate de árbol, científicamente conocido como *Cyphomandra betaceae*, es una especie perteneciente al género *Cyphomandra*, que a su vez forma parte de la familia *Solanaceae*, Figura

8-2. En Ecuador, el tomate de árbol se encuentra en diversas regiones del país, especialmente en áreas de climas tropicales y subtropicales.

El tomate de árbol *Cyphomandra betaceae* es conocido por contener diversos metabolitos secundarios, como alcaloides, flavonoides, glicoalcaloides, compuestos fenólicos, la presencia de estos metabolitos otorgan diversas funciones biológicas, lo que ha llevado a un interés creciente en el tomate de árbol como una fuente potencial de compuestos bioactivos en la alimentación y la medicina. La presencia de actividad antibacteriana en el tomate de árbol resalta su potencial en la medicina tradicional y abre oportunidades para desarrollar aplicaciones farmacéuticas basadas en sus propiedades.



Ilustración 2-8: Tomate de árbol

(*Cyphomandra betaceae*)

Fuente: (Uquillas, 2010)

CAPÍTULO III

3 MARCO METODOLÓGICO

3.1 Enfoque de investigación

La presente investigación se la analiza a través de un enfoque cuantitativo ya que las variables pueden ser medibles en este caso la cantidad de nanopartículas de óxido de aluminio (NPs Al_2O_3) a través del uso de una balanza analítica, para la caracterización correspondiente en cuanto a tamaño y estructura se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), al igual que la onda de longitud que se evidencio mediante espectrofotometría de UV-Visible; para la identificación de grupos funcionales y las vibraciones correspondientes a las NPs Al_2O_3 se realizó mediante espectroscopia de infrarrojo, finalmente la actividad bactericida presente en las nanopartículas de óxido de aluminio se realiza mediante pruebas microbiológicas de inhibición en medios de cultivo.

3.2 Modalidad de la investigación

El siguiente estudio experimental es de tipo explicativo, dado que se aplican conocimientos sobre la síntesis de nanopartículas mediante una vía verde, con el objetivo de evaluar su actividad bactericida contra colonias presentes en muestras de agua de la confluencia del río Chibunga y el río Chambo.

3.3 Diseño de investigación

3.3.1 *Según la manipulación o no de la variable independiente*

La presente investigación es de tipo experimental ya que se manipula las variables independientes en este caso la cantidad (g) de las nanopartículas de óxido de aluminio y el tiempo de exposición a la luz solar como se muestra en la Tabla 3-1, ya que estas son las variables de la cual depende el número de colonias formadas dentro de las pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana.

Variable dependiente:

- Número de colonias bacterianas formadas.

Variable independiente:

- Tiempo de exposición de las muestras de agua (muestra de agua) con nanopartículas de óxido de aluminio a la luz solar.
- Cantidad de sal precursora $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$.

Tabla 3-1: Variables independientes

Nanopartículas de Al_2O_3 (g)	Tiempo (horas)
0.0311	1
0.0311	2
0.0311	3

Realizado por: Acosta, I., 2024.

3.3.2 Según la perspectiva temporal

La presente investigación es de tipo longitudinal, ya que a pesar de que la recopilación de muestras se da en el mismo punto (intersección de río Chambo con el río Chibunga), existe la presencia de repeticiones en distintos momentos temporales (las dos fechas de toma), esto implica que, al recolectar datos en dos fechas, se está capturando la variabilidad a lo largo del tiempo.

3.4 Tipo de estudio

El siguiente estudio busca determinar la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de aluminio contra colonias bacterianas farmacorresistentes presentes en muestras de agua de punto de descarga del río Chibunga al río Chambo, todos los procesos metodológicos implican se llevan a cabo en laboratorios, siendo así un estudio de campo, por ende, se realiza experimentos en medio controlado donde se manipulan variables y se obtiene datos.

3.5 Método de investigación

El método usado en el presente trabajo experimental, es un método analítico sintético, es decir, este método implica descomponer una problemática en componentes más sencillos, (en este caso la síntesis de nanopartículas de óxido de aluminio y su efecto bactericida con colonias presentes en muestras de agua del punto de confluencia del río Chibunga y río Chambo. Una vez

comprendido y analizado el componente experimental, se realizó un análisis detallado de los resultados buscando generar conclusiones generales, a través de la examinación minuciosamente de las variables identificadas.

3.6 Diseño experimental

Se realiza un análisis estadístico mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson, este método busca medir la relación estadística entre variables aleatorias cuantitativas, siendo la variable independiente (*cantidad de nanopartículas en las muestras de agua junto el tiempo de exposición a la luz solar*) con respecto a la variable dependiente (*número de colonias formadas en diferentes intervalos de tiempo*).

Comprendido el método a aplicarse se continuó el análisis mediante el uso del programa Excel en el cual se crearon dos tablas con los resultados dados de la parte experimental de la inhibición microbiológica.

3.6.1 Metodología para realizar el análisis estadístico mediante el coeficiente de Pearson

- Definir de las hipótesis:

Hipótesis nula

H₀: r_{xy} = Las nanopartículas de óxido de aluminio no presentan actividad bactericida frente a colonias bacterianas farmacorresistentes provenientes de muestras de agua del punto de descargo del río Chibunga al río Chambo.

Hipótesis alternativa

H_a: r_{xy} = Las nanopartículas de óxido de aluminio presentan actividad bactericida frente a colonias bacterianas farmacorresistentes provenientes de muestras de agua del punto de descargo del río Chibunga al río Chambo.

- Compilar y organizar datos:

Se debe compilar datos de acuerdo la influencia de cada variable en estudio con respecto a la actividad bactericida presentada.

- Calcular el coeficiente de Correlación de Pearson en Microsoft Excel

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

Donde:

X: es la primera variable (variable independiente)

Y: la segunda variable (variable independiente)

Z_x: desviación estándar de la primera variable

Z_y: desviación estándar de la segunda variable

- Reportar resultados

El resultado debe ser reportado de manera clara y entendible, por lo general esto implica tomar en cuenta ciertas consideraciones de la Correlación de Pearson según el valor que toma r que se presenta a continuación:

Tabla 3-2: Consideraciones de la Correlación de Pearson

Valor	Significado
-1	Correlación negativa grande y perfecta
-0,9 a -0,99	Correlación negativa muy alta
-0,7 a -0,89	Correlación negativa alta
-0,4 a -0,69	Correlación negativa moderada
-0,2 a -0,39	Correlación negativa baja
-0,01 a -0,19	Correlación negativa muy baja
0	Correlación nula
0,01 a 0,19	Correlación positiva muy baja
0,2 a 0,39	Correlación positiva baja
0,4 a 0,69	Correlación positiva moderada
0,7 a 0,89	Correlación positiva alta
0,9 a 0,99	Correlación positiva muy alta
1	Correlación positiva grande y perfecta

Fuente: (Jiménez, 2016, págs. 30)

Realizado por: Acosta, I, 2024

3.7 Población y Planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra

3.7.1 Población y planificación

La población objeto de estudio son las colonias bacterianas presentes en las muestras de agua provenientes del punto de descargo del río Chibunga al río Chambo, en el cantón Riobamba. Las muestras recolectadas serán en un solo punto y dos tomas en diferentes fechas, en la Figura 3-1 se observa la Cuenca Hidrográfica del río Chibunga.

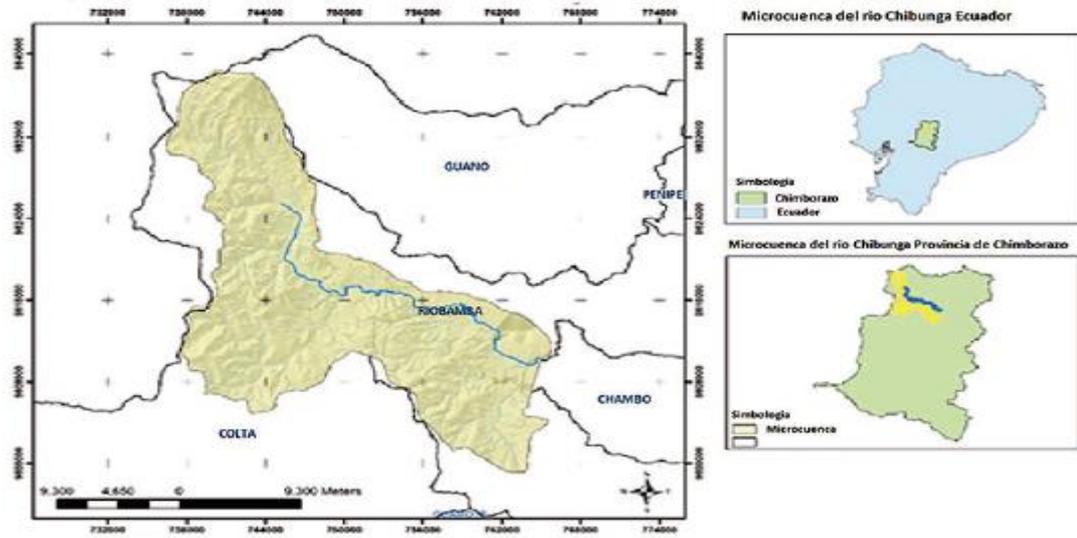


Ilustración 3-1: Mapa de la ubicación de la microcuenca del río Chibunga

Fuente: (Veloz N., 2018).

3.7.2 Selección y cálculo de la muestra

3.7.2.1 Muestreo

La toma de muestras constituye el procedimiento inicial esencial para evaluar la calidad de una fuente de agua utilizada para consumo o para actividades agrícolas. Por ende, es importante que las muestras sean representativas, evitando cualquier posible contaminación durante su transporte al laboratorio para el análisis siguiente (INEN, 2013, pp. 8).

El número de muestras de agua recolectadas fue diez, mismas que se llevaron a cabo en un momento y lugar determinado, aplicando la técnica de muestreo simple. El sitio de muestreo fue específicamente en el punto de descargo del río Chibunga al río Chambo (Figura 4-2).



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

Realizado por: (Acosta, I., 2024).

Criterios de inclusión

- Muestras sin alteración, considerar las condiciones climáticas al programar la toma de muestras, ya que las precipitaciones u otras condiciones meteorológicas pueden afectar la calidad del agua e incluso cuando se vea en la orilla del río, considerar la contaminación por alteración del fondo u orilla.
- Procurar que las muestras sean representativas del agua en estudio y que no se contaminen en forma alguna después del muestreo o antes del examen, manteniendo el procedimiento de toma correcta, volumen correcto, número o registro correspondiente.
- Evitar la recolección de muestras en áreas con altos niveles de sedimentos, ya que esto puede afectar la calidad de las muestras y dificultar los análisis microbiológicos
- El punto de muestreo debe estar fácilmente accesible con las vías de acceso vehicular y peatonal necesarias, para facilitar obtener las muestras y transportar la carga con los equipos y materiales de muestreo.
- El punto de recolección de las muestras debe representar las características totales del cuerpo de agua; debe mezclarse en el lugar de muestreo, teniendo en cuenta parámetros como la turbulencia, velocidad y apariencia física del mismo, adquiriendo que la muestra sea lo más homogénea posible.

Criterios de exclusión

- Aquellas muestras que presentan turbidez generada por una toma inadecuada, muestras contaminadas por acción de animales o insectos.

- Cuando no se haya conservado la integridad de las muestras hasta su llegada al laboratorio, el envase se encuentre roto, abierto, agujereado o la muestra presenta evidentes signos de deterioro o la cantidad de muestra no sea la adecuada (menos del 90% de la capacidad del frasco o 100%)
- Cuando se verifique una temperatura inapropiada durante el transporte, o la temperatura en el momento de la recepción no sea adecuada.

3.8 Métodos, técnicas e instrumentos de investigación

3.8.1 *Materiales, reactivos y equipos*

3.8.1.1 *Materiales*

- Balones de aforo 100 ml
- Matraz Erlenmeyer 250 ml
- Vasos de precipitación 250 ml
- Pipeta automática de 0 a 200 μm
- Puntas de micropipetas
- Kitasato
- Embudo Büchner
- Probetas 50 ml
- Botellas ámbar
- Tubos de centrifugas (Tubos Falcón 15 y 50 ml)
- Cajas Petri
- Espátulas

3.8.1.2 *Equipos*

- Centrífuga
- Rotavapor
- Agitador magnético
- Espectrofotómetro Uv-vis
- Microscopio electrónico de barrido (SEM)
- Balanza analítica
- Estufa
- Autoclave

- Espectrómetro infrarrojo
- Placas Compact Dry
- Magnetos

3.8.1.3 *Reactivos y sustancias*

- Sulfato de aluminio* 18 H₂O
- Agar nutritivo
- Extracto hidroalcohólico de tomate de árbol
- Agua destilada
- Alcohol 96 %

3.8.2 *Metodología del experimento*

3.8.3 *Síntesis de nanopartículas*

Para la producción de material nanométrico en este caso las nanopartículas de óxido de aluminio se utilizó una técnica alternativa conocida como síntesis verde que tiene como principio ser una vía eco amigable con el medio ambiente a través del uso del extracto vegetal de *Cyphomandra betaceae* (Tomate de árbol), el cual interviene como agente estabilizante y reductor de las nanopartículas e inclusive le confiere propiedades en cuanto al tamaño y forma. Esto sucede debido a la presencia de metabolitos primarios al igual que secundarios en la planta, principalmente actuando los compuestos fenólicos en el proceso de quelación y reducción dando como resultado una reducción fitoquímica de la sal precursora que en este caso es la solución de sulfato de aluminio octo decahidrato (Al₂(SO₄)₃ · 18 H₂O), generándose así las nanopartículas de óxido de aluminio.

3.8.3.1 *Obtención del extracto acuoso de Cyphomandra betaceae (Tomate de árbol)*

- Selección y lavado de la fruta de tomate de árbol: se recolectaron las mejores frutas en fundas plásticas de cierre hermético. Para eliminar impurezas e insectos, se lavó con agua destilada y se cortó en trozos largos.
- Secado: se realizó en una bandeja de secado a 40°C por 72 horas, y posteriormente se molieron hasta obtener un polvo fino.
- Solución hidroalcohólica: se preparó 200 ml de una solución hidroalcohólica en

proporciones 1:1.

- Extracción de componentes reductores: en una botella ámbar, se añadieron 25 g de fruta pulverizada a la solución hidroalcohólica. Posteriormente, se dejó macerar la mezcla durante 4 días para lograr una concentración óptima de los metabolitos. Para mejorar la eficiencia de la extracción, se realiza una sonicación durante 30 minutos. Al completar este paso, se procedió a filtrar la mezcla mediante un sistema de vacío.
- El extracto hidroalcohólico se colocó en el rotavapor hasta recuperar el alcohol al 96 %, de esta manera se obtuvo el extracto acuoso.
- Al extracto acuoso se le realizó un filtrado simple con un embudo Büchner.
- Finalmente se llevó a refrigeración a 4°C hasta su posterior uso.

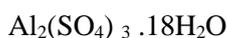
Identificación de Compuestos fenólicos

Prueba de Cloruro férrico

- Se añadió un ml de la solución acuosa del extracto de tomate de árbol a un tubo de ensayo limpio.
- Se agregó una gota de la solución de cloruro férrico al 5% a la muestra.
- Se agitó para homogenizar y se observó.
- Esta prueba resulta positiva ante la evidencia de cambio de coloración sea este verde, violeta o negro.

3.8.3.2 *Preparación de la solución de la sal precursora*

Para el cálculo de la solución a una molaridad de 0.025 M se realizó mediante la siguiente técnica:



Cálculos

- 0.025 M

$$100 \text{ ml } \text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{0.025 \text{ mol } \text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}}{\text{L sol}} * \frac{666,4 \text{ g } \text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol } \text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}} = 1,66 \text{ g } \text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$$

Procedimiento

- Se pesó en un vidrio reloj 1,66 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ con ayuda de una espátula.
- Se colocó en un vaso de precipitación de 250 ml para lograr diluir completamente.
- Finalmente se aforó a 100 ml con agua destilada con la ayuda de un balón de aforo.

3.8.3.3 *Síntesis verde de nanopartículas de óxido de aluminio*

El procedimiento para la síntesis verde de nanopartículas de óxido de aluminio se realizó utilizando la metodología descrita por P. Duraisamy (2018, pág. 429) con ajustes mínimos. En esta investigación se empleó como sal precursora el $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$.

Procedimiento

- Se realizó los cálculos respectivos para preparar las soluciones a 0.025 M, 0.05M, 0.5 M y 1.0 M en 100 ml los cálculos respectivos se detallan en el **ANEXO A**. Las soluciones preparadas se conservaron en botellas ámbar para evitar la foto reducción.
- Se colocó 10 ml del extracto de la fruta de *Cyphomandra betaceae* (Tomate de árbol) y se hirvió hasta alcanzar los 60 grados centígrados usando un calentador agitador. Una vez alcanzada la temperatura, se agregaron 40 ml de la sal precursora, manteniendo la temperatura y la agitación constante de 700 rpm por 60 min.
- Al pasar la hora de síntesis, se evidencia la presencia de las nanopartículas de Al_2O_3 al observar un cambio de coloración marrón, finalmente, se dejó enfriar para posteriormente trasvasar a tubos Falcón.
- Finalizada la síntesis, se colocó la solución en tubos falcón y se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min. Seguido por el lavado del precipitado mismo que se realizó 3 veces con agua destilada. Cada lavada se centrifuga a 1500 rpm/ 15 min evitando así la pérdida de precipitado.
- Por último, se secó el precipitado en los tubos falcón (para evitar la pérdida del mismo) a 50 °C por 12 horas y se pesaron las nanopartículas sintetizadas para conocer su rendimiento.

3.8.4 *Caracterización de las nanopartículas de óxido de aluminio*

Para la caracterización de las nanopartículas de óxido de aluminio se realizó mediante las técnicas de Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis), Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) y Microscopía de barrido electrónico (SEM).

Procedimientos

3.8.4.1 *Espectroscopia UV-vis*

- Las nanopartículas de óxido de aluminio perfectamente lavadas y secadas fueron trituradas en un mortero para disminuir su tamaño hasta obtener un polvo fino.
- Se tomaron 0,002 gr de muestra y se agregaron 10 ml de agua destilada, llevándolos al sonicador para que sus agregados se dispersaran.
- Se preparó diluciones de hasta 1×10^{-4} para que se pueda dar la lectura en la espectroscopía UV-vis
- Por último, se colocó la muestra diluida en la celda de cuarzo y se procedió a la medición.
- Es importante mencionar que se debe dar un rango onda de longitud en este caso fue de 250 a 400 nm.

3.8.4.2 *Espectroscopia de infrarrojo IR*

- Para el siguiente análisis se tomó una muestra de Al_2O_3 NPs pulverizadas y se colocó en el portamuestras del espectrofotómetro FT-IR, se procedió a cerrar el equipo y se realizó el análisis.
- Una vez obtenido el espectro de las nanopartículas se identificó y etiquetó respectivamente los picos representativos para poder discutir con diversas referencias bibliográficas.
- Es importante mencionar que el software del equipo debe corregir la escala del espectro.

3.8.4.3 *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

- Una vez lavadas y pulverizadas correctamente las nanopartículas de óxido de aluminio, se tomó una pequeña cantidad con la cinta de carbono.
- Se procedió a depositar en el portamuestras del microscopio electrónico de barrido y se observaron los resultados.

3.8.5 *Selección de la muestra de agua*

En cuanto a la toma de las muestras de agua del punto de descarga del río Chibunga al río Chambo, se desarrolló en base a la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 226; 2013. Por lo que las

muestras de agua de río son susceptibles a sufrir alteraciones durante el proceso, ya sea de muestreo, transporte o análisis, para la recolección de muestras de agua debido a lo mencionado se realizó siguiendo la norma NTE INEN 2169.

De acuerdo con López, et al (2019, pág. 65-66), los recipientes más utilizados para la toma de muestras de aguas que tengan como objetivo el análisis microbiológico pueden ser frascos de plástico o de vidrio ámbar de boca ancha y cierre hermético para evitar fugas de agua, para el procedimiento de muestreo estos deben ser enjuagados mínimo de tres a cuatro veces con el agua a muestrear y ser almacenarse a bajas temperaturas de refrigeración para su análisis.

3.8.5.1 Toma de muestra

Para lograr determinar la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de aluminio con respecto a bacterias con resistencia a antibióticos presentes en las muestras de agua en el punto de descargo del río Chibunga al río Chambo fue de aproximadamente 1000 ml (1L) como mínimo López et al (2019, p.67). Para la toma de muestras se llevó a cabo en dos etapas, las primeras muestras se tomaron el día 28 de enero de 2024 y el segundo muestreo se recolectó el 28 de febrero del 2024.

Procedimiento

- Se registró la localización del punto de muestreo real con GPS (esperando que la precisión fuera la mayor posible).
- Se caracterizó el sitio con fotografías.
- En ambas fechas se inició rotulando los envases con el nombre del punto establecido para la toma de muestras
- Se enjuagó el envase 3 veces con una porción de agua del cuerpo hídrico muestrear.
- Se procedió a recolectar la muestra sumergiendo el envase de forma contraria al flujo, evitando la inclusión de aire por flujo turbulento y finalmente se cerraron los envases.

3.8.5.2 Transporte de las muestras

- Las diez muestras recolectadas en el punto de descargo del río Chibunga al río Chambo se almacenaron respectivamente, para posteriormente transportarlos en una nevera portátil con el objetivo de conservar las muestras en perfecto estado a una temperatura de

refrigeración, evitando así la alteración microbiológica o fisicoquímica de las muestras para su respectivo análisis.

3.8.6 Evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de aluminio

La actividad de las nanopartículas de óxido de aluminio se evaluará en las colonias presentes en muestras de agua del punto de descargo del río Chibunga al río Chambo mediante un método *in vitro*.

3.8.6.1 Identificación de grupos de bacterianos presentes mediante placas Compact Dry

- Se limpió y desinfectó el área de trabajo para posteriormente abrir las placas Compact Dry y colocarlas en una superficie plana.
- Se utilizaron pipetas estériles con las cuales se tomó un ml de la muestra de agua y se agregó en el centro de la placa asegurando la distribución uniforme de la muestra.
- Se colocaron las placas Compact Dry en una incubadora a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante un lapso de 24 a 48 horas.
- Transcurrida la incubación, se observó las placas y se interpretó resultados la presencia de colonias o cambios de color en la placa indicaron la presencia y cantidad de bacterias.
- Finalmente, se contó el número de colonias presentes en las placas y se registraron los resultados.

3.8.7 Pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana

3.8.7.1 Preparación del medio cultivo (Agar Nutritivo)

Se pesó la cantidad del agar nutritivo óptimo y se rehidrato con agua destilada en un matraz Erlenmeyer.

Se colocó en la autoclave el matraz tapado previamente, durante 30 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Transcurrido el tiempo se retiró de la autoclave hasta que adquiriera la temperatura adecuada, aproximadamente $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Finalmente se distribuyó el medio de cultivo en las cajas Petri, previamente esterilizadas en una campana de flujo laminar y se esperó que se solidifique para su posterior sembrado.

3.8.7.2 *Siembra en placas*

Para el procedimiento microbiológico, se empleó la técnica de siembra en superficie con el fin de evaluar la actividad bactericida producida por las nanopartículas de óxido de aluminio contra bacterias presentes en muestras de agua del punto de confluencia del río Chibunga y río Chambo.

Siembra en superficie

- Se vertió el medio sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido y se dejó solidificar.
- El inóculo se colocó sobre la superficie del medio de cultivo.
- Con la ayuda de una espátula de Drigalsky se extiende el inóculo hasta su absorción total por el medio de cultivo.
- Finalmente, las placas se incubaron a 37°C por 48 horas.

3.8.7.3 *Determinación del número de colonias bacterianas de las muestras de agua con nanopartículas de óxido de aluminio cada 1, 2 y 3 horas expuestas a la luz solar.*

- En 4 tubos de ensayo se colocó 0,0311 g de Al₂O₃ NPs y 1 ml del inóculo y se expuso a la luz solar por el lapso de 1, 2 y 3 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 en superficie en el medio de cultivo.
- Los tubos de ensayos restantes previamente preparados y expuestos a la luz solar en las horas establecidas se realizó el mismo procedimiento de siembra, tal como se realizó anteriormente teniendo un total de 32 siembras en cajas Petri.
- Finalmente, las cajas Petri se incubaron 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).

CAPÍTULO IV

4 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Obtención del extracto acuoso de *Cyphomandra betacea* (tomate de árbol)

Tabla 4-1: Características del extracto hidroalcohólico de *Cyphomandra betacea*

Características organolépticas	Resultados
Color	Amarillo intenso
Olor	Singular
Sabor	Agridulce
Textura	Líquida
Impurezas	Ninguna
Rendimiento	100 ml

Realizado por: Acosta, I., 2024

En la Tabla 4-1 se muestra una descripción detallada de las diferentes características presentadas en el extracto hidroalcohólico de *Cyphomandra betacea*: el color muestra una tonalidad amarilla intensa, su olor se lo denomina como singular o extraño ya que presenta propiedades diferentes y específicas, de igual manera se aprecia un sabor agridulce junto con una textura líquida clara es decir libre de impurezas, en cuanto a su rendimiento después haber transcurrido el tiempo de maceración, y haber utilizado el sonicador con la finalidad de lograr una concentración óptima de metabolitos mediante su mecanismo de vibraciones, se procedió a extraer el alcohol por medio del rotavapor como se observa en la Figura 4-1, obteniendo así el rendimiento real que fue de 100 ml.



Ilustración 4-1: Obtención del extracto acuoso de *Cyphomandra betacea* (tomate de árbol). (A) Solución hidroalcohólica 1:1; (B) macerado y filtrado al vacío; (C) sonicado de la muestra; (D) Rotavapor.

Realizado por: Acosta, I., 2024.

El color observado del extracto específicamente es debido a la pulpa, de acuerdo a lo mencionado por Meza y Manzano (2009: p.290), está, puede ser de color amarillo, anaranjado, tonos rojos y crema, presentando un sabor agridulce.

4.1.1 Análisis del extracto acuoso de *Cyphomandra betacea* (tomate de árbol)

4.1.1.1 Test con cloruro férrico

El extracto acuoso de *Cyphomandra betacea* (tomate de árbol) se caracterizó mediante el test de cloruro férrico para determinar la presencia de compuestos fenólicos. Dichos compuestos son esenciales para la síntesis de las nanopartículas de óxido de aluminio puesto que actúan como agentes reductores y estabilizadores de las mismas.

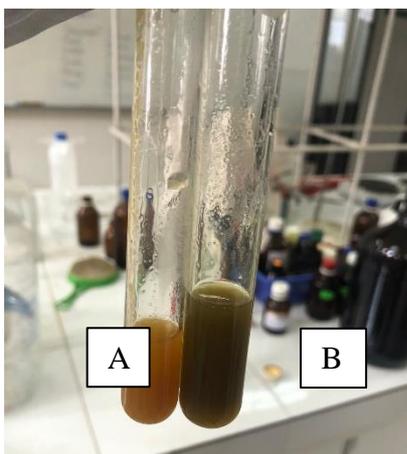


Ilustración 4-2: Presencia de compuestos fenólicos: cambio de color amarillo pálido a marrón intenso a negro (A) Extracto puro; (B) Extracto más FeCl₃

Realizado por: Acosta, I., 2024.

De acuerdo, a la Figura 4-2, se aprecia un cambio de tonalidad que va desde el amarillo intenso característico del extracto de la fruta de tomate de árbol hasta un verde-marrón intenso. Este cambio de coloración confirma la presencia de grupos fenólicos en el extracto de *Cyphomandra betacea*, corroborando así su potencial para participar en el proceso de síntesis de las nanopartículas de óxido de aluminio (Tabla 4-2).

Tabla 4-2: Resultados del Test de FeCl₃

Muestra	Reactivo	Resultado
Extracto acuoso de <i>Cyphomandra betacea</i>	Cloruro férrico	Positivo

Realizado por: Acosta, I., 2024.

El ensayo de cloruro férrico se fundamenta en la reacción que se produce entre el FeCl_3 con un compuesto fenólico, generando la formación de complejos de hierro, cuya propiedad es específica de los compuestos fenólicos. La formación de complejos se manifiesta con un cambio de color en la solución analizada, que varía entre tonalidades verdes, violetas o negras, pero la intensidad de la coloración dependerá de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la solución (Kuklinski 2003, p. 97).

4.1.1.2 Análisis por Espectrometría infrarroja (IR)

A continuación, se presenta el espectro FT-IR del extracto acuoso de *Cyphomandra betacea* (tomate de árbol).

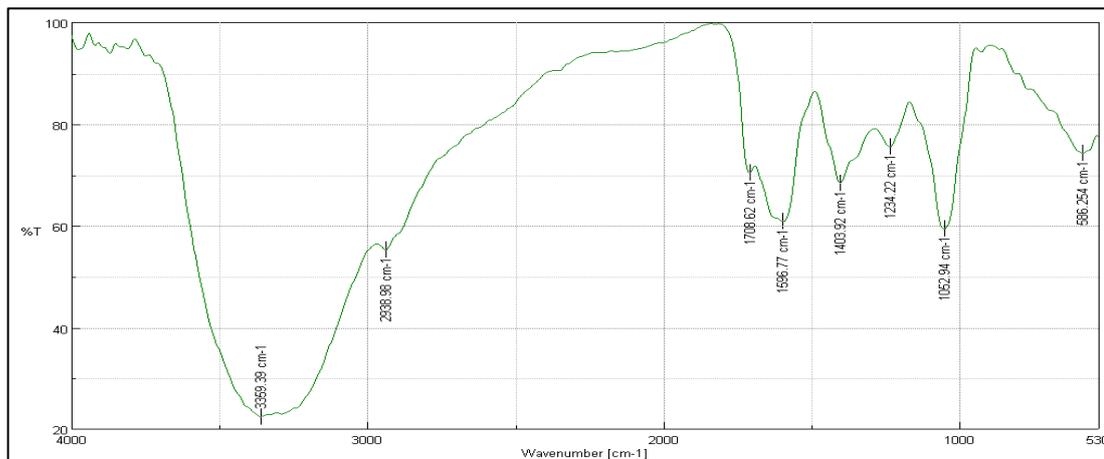


Ilustración 4-3: Espectrometría infrarroja (IR) del extracto acuoso de *Cyphomandra betacea*

Realizado por: Acosta, I., 2024.

La espectroscopia infrarroja se empleó con el propósito de identificar los grupos funcionales presentes en el extracto de *Cyphomandra betacea* (tomate de árbol). Para la interpretación del espectro, se puede simplificar al hecho de que las bandas se asignan a partes específicas de la molécula que generan lo que se conoce como frecuencias de grupo. Independientemente de a qué esté unido, un grupo funcional absorbe radiación (genera una banda de IR) en un intervalo específico de frecuencias. Así, las frecuencias de grupo permiten establecer la presencia o ausencia en la muestra de un grupo funcional dado (Serrano, 2007: pp. 2-35).

Con base en lo mencionado, la Figura 4-3 muestra los espectros FT-IR del extracto acuoso de *Cyphomandra betacea* (tomate de árbol), en los que se evidencian bandas de absorción características de los grupos funcionales de compuestos orgánicos e inorgánicos. El primer pico, ancho e intenso, se detecta a una longitud de onda de 3359.39 cm^{-1} y está asociado con la vibración de grupos -OH del fenol con enlace de hidrógeno en un rango de $3200\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$ (Silverstein R. et.al., 2014, pp. 72-108). El segundo pico, que se forma a 2938.98 cm^{-1} , corresponde, según la bibliografía, a una vibración de tensión C-H de alcanos. En el rango de número de onda entre 2950.55 y 2919.15 cm^{-1} , se encuentra otra vibración de tensión C-C de tipo aromático, mientras que entre 1376.93 y 1454.06 cm^{-1} se observa una vibración de flexión C-H de alcanos, que involucra al pico número 1403.92 . El pico de 1234.22 cm^{-1} sugiere la presencia de enlaces C-O, como los encontrados en éteres, mientras que el pico de 1052.94 cm^{-1} podría ser indicativo de enlaces C-N, como en aminas o amidas. Por último, el número de onda 586.254 cm^{-1} se interpreta que los picos en este rango son típicamente asociados con enlaces fuera del plano de compuestos aromáticos.

A continuación, en la Tabla 4-3, se presentan las señales observadas en la Figura 4-3 de los enlaces y grupos funcionales a los que corresponde.

Tabla 4-3: Análisis de la Espectrometría infrarroja (IR) del extracto de *Cyphomandra betacea*.

Número de onda cm^{-1}	Rango cm^{-1}	Tipo de vibración	Grupo funcional
3359.39	3550-3200	Estiramiento O-H	Fenoles
2938.98	2950-2919	Estiramientos C-C	Alcanos aromáticos
1403.92	1376-1454	Estiramiento C-H	Aldehídos
1234.22	1300-1000	Estiramientos R-O-R	Éteres
1052.94	1200-1025	Estiramientos C-N	Aminas
586.254	460-750	Aromáticos	fuera del plano

Fuente: (Mondragón, 2017)

Realizado por: Acosta, I., 2024.

Las bandas de absorción obtenidas en este estudio son similares a las de Márquez et al (2020, pp. 27-30), donde el extracto acuoso de tomate de árbol caracterizado por la técnica de Espectrometría infrarroja (IR) registra la presencia del grupo hidroxilo (-OH) en la región de 3270.45 cm^{-1} , confirmando la existencia de grupos fenólicos en el material vegetal encontrándose en mayor porcentaje en la cáscara del fruto. Así también se reporta la presencia de bandas de absorción de 2920 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} y 1025 cm^{-1} que corresponden a vibraciones del esqueleto aromático de los

alcanos C-C, vibraciones del grupo de aldehídos y bandas de absorción de entre 1088 y 1025 cm^{-1} que hacen referencia a la presencia del enlace C-N correspondientes del grupo de amina alifática.

Por tanto, al ser los resultados del estudio semejantes a los encontrados por los autores mencionados, se puede confirmar que el extracto acuoso de tomate de árbol presenta grupos fenólicos esenciales para facilitar la síntesis efectiva de las nanopartículas de óxido de aluminio. Estos grupos funcionales serán los que actúen como agentes reductores de los iones aluminio presentes en la sal precursora, desempeñando la función de estabilizar las nanopartículas en formación.

4.2 Síntesis de nanopartículas de óxido de aluminio

4.2.1 Experimentos para la obtención de nanopartículas de óxido de cobre

4.2.1.1 Variando la concentración de la sal.

Los cálculos realizados con respecto a los gramos de la sal precursora se encuentran en el **ANEXO A**

Experimentación 1

En base a los resultados obtenidos en la investigación desarrollada por Sharma y Sharma (2020, p. 731), se planteó la síntesis de las nanopartículas de óxido de aluminio, para ello la solución de la sal precursora se calentó a una temperatura de 80 °C respectivamente. El tiempo de agitación, el volumen del extracto y de la sal precursora se mantuvo constante, mientras que para el proceso de centrifugación en vista de que los autores no especificaron el número de revoluciones se procedió a centrifugar a 1500 rpm la cual es una revolución máxima del equipo. Las condiciones de síntesis empleadas se detallan en la Tabla 4-4 a continuación.

Tabla 4-4: Condiciones de síntesis de $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$ experimento 1

Muestra	Concentración de la sal (mol/L)	Temperatura °C	Volumen del extracto (ml)	Volumen de la sal (ml)
M1	0.025	80	10	50
M2	0.05	80	10	50
M3	0.5	80	10	50
M4	1	80	10	50

Realizado por: Acosta, I., 2024.

Las Figuras 4-4 y 4-5, muestran el aspecto físico de las soluciones de las muestras al inicio y al final de la síntesis de las nanopartículas. Como se observa, la solución correspondiente a la concentración de 0.025M muestra un cambio de tonalidad de color naranja oscuro a naranja blanquecino (ilustración 6-4), sin embargo, las soluciones correspondientes a las concentraciones de 0.05, 0.5 y 1M al finalizar el proceso de síntesis no toman una tonalidad blanquecina como menciona Sharma y Sharma (2020, p. 731), lo que hace ilusión a que en las dos últimas concentraciones no se ha producido grandes cambios. En la Figura 4-5 se aprecia la formación de un precipitado al final de los tubos Falcón.

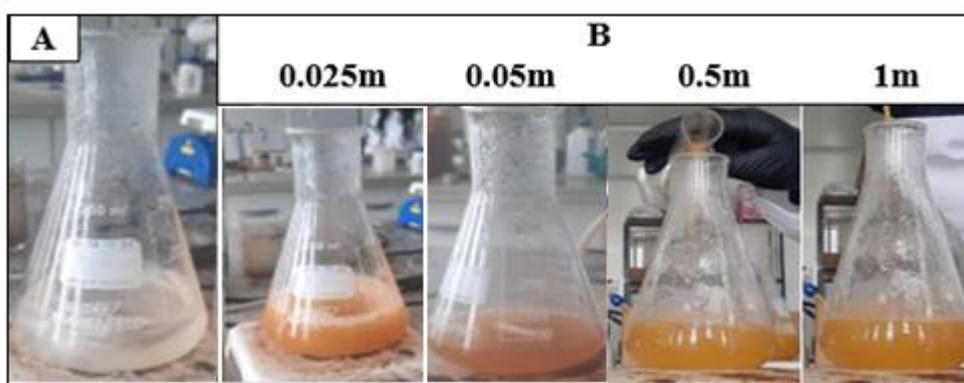


Ilustración 4-4: Durante la síntesis. (A) Solución de sulfato de aluminio 18 hidratado (B) sal precursora más extracto.

Realizado por: Acosta, I., 2024.

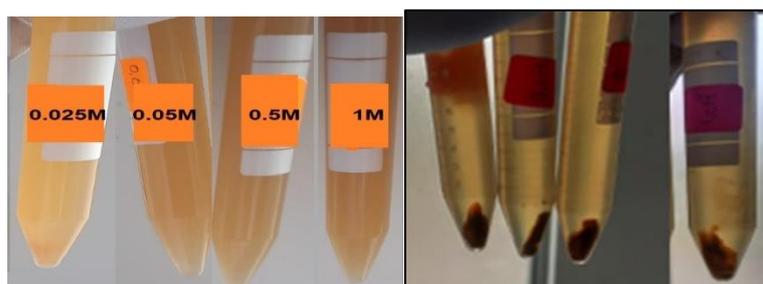


Ilustración 4-5: Después de la síntesis, (A) solución de la sal más extracto (B) Formación de nanopartículas-precipitado

Realizado por: Acosta, I., 2024.

El análisis de las muestras M1, M2, M3 y M4 mediante la espectroscopia UV-Vis demostró que, en el espectro de la muestra M1 se forma un pico de absorción bien pronunciado y definido a una longitud de onda de 263,80 nm (Figura 4-6), mientras que para la muestra M2, M3 y M4 se forman

picos de absorción, pero fuera del rango establecido como se observa en la Figura 4-7, 4-8 y 4-9. Concluyendo que solo en la concentración de 0,025 se formó $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$.

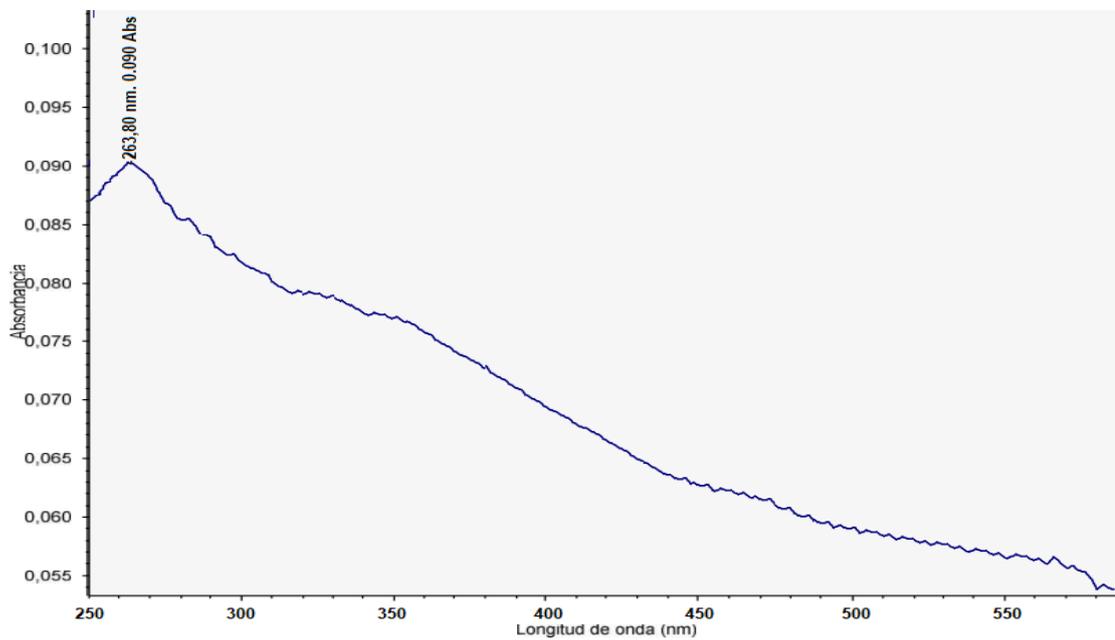


Ilustración 4-6: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.025 M

Realizado por: Acosta, I., 2024.

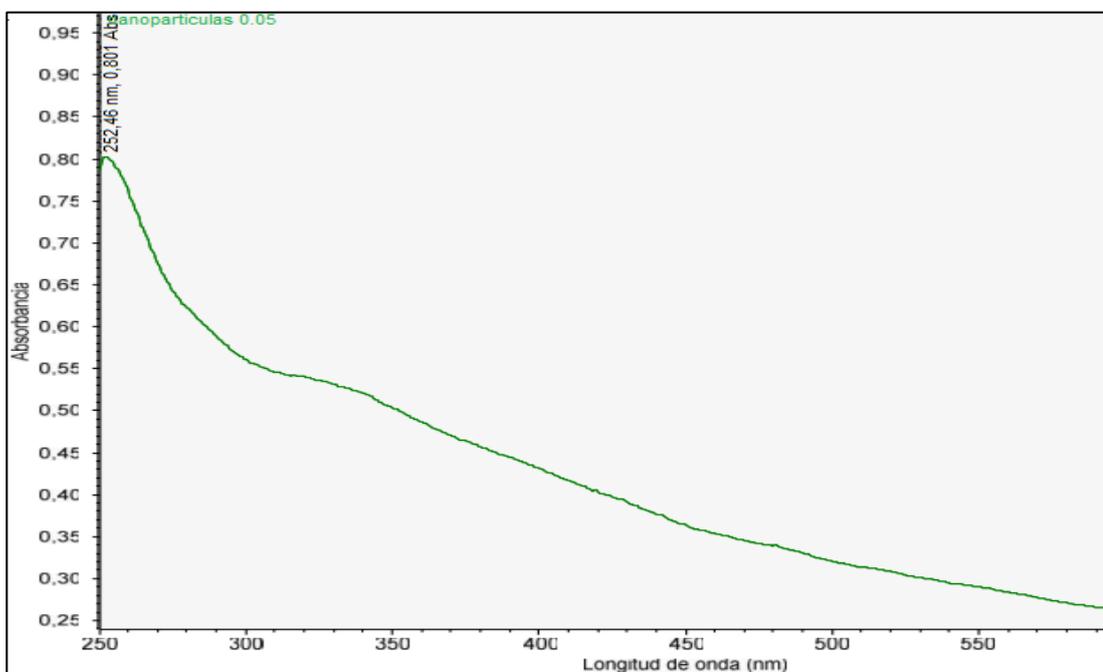


Ilustración 4-7: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.05 M

Realizado por: Acosta, I., 2024.

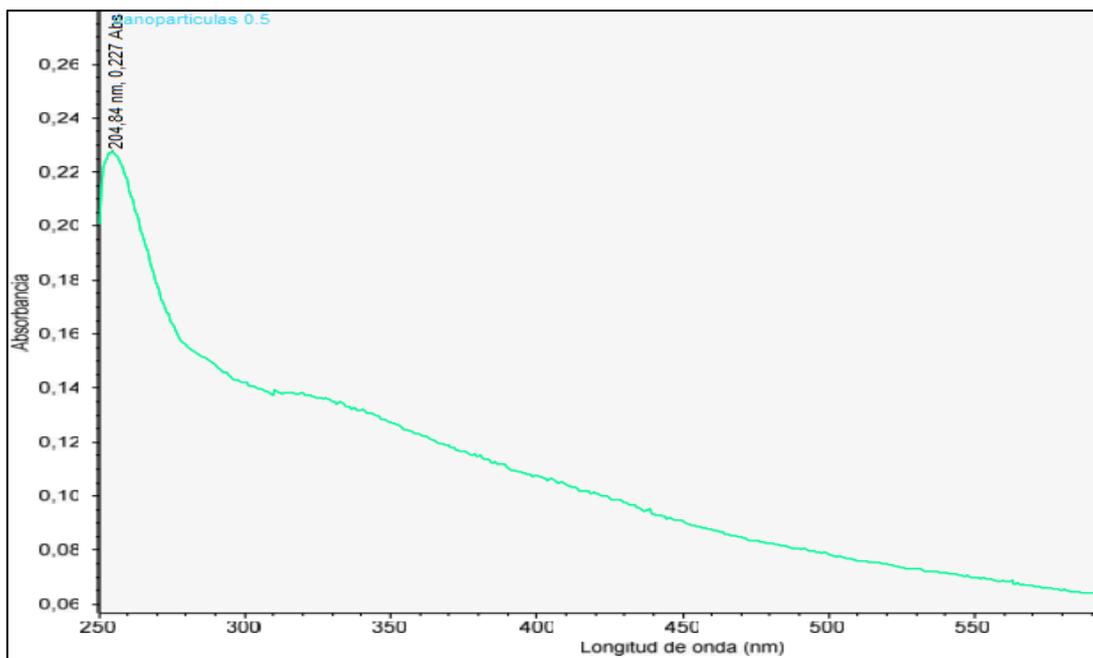


Ilustración 4-8: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 0.5 M

Realizado por: Acosta, I., 2024.

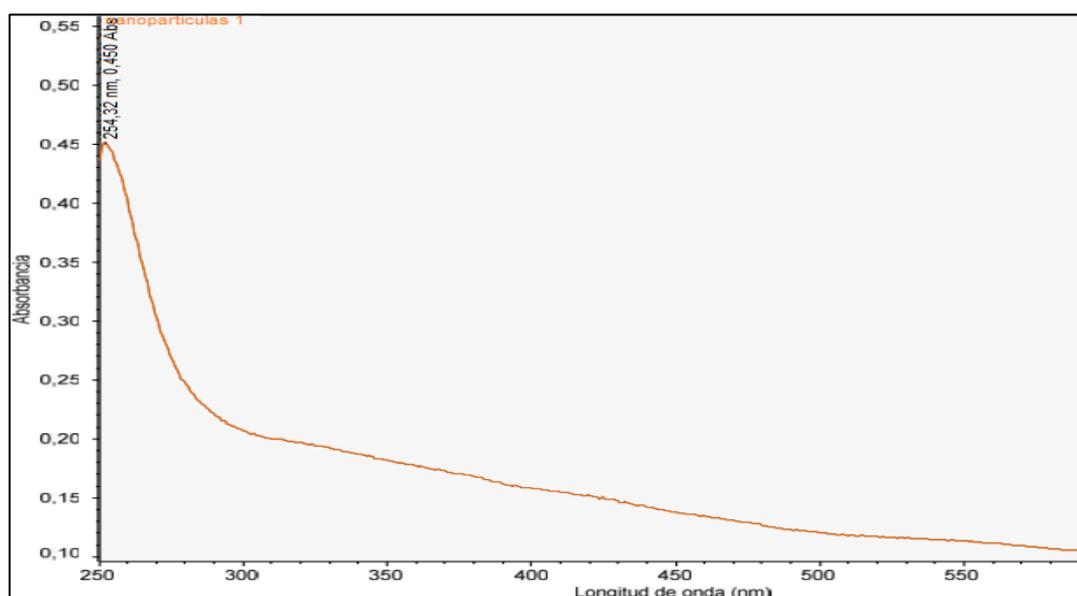


Ilustración 4-9: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de cobre 1 M

Realizado por: Acosta, I., 2024.

Según los resultados obtenidos, se tomó a la muestra M3 como la mejor muestra para caracterizar las nanopartículas de Al_2O_3 y realizar las pruebas microbiológicas de inhibición bacteriana para determinar si las nanopartículas de Al_2O_3 presentan o no un efecto bactericida.

4.3 Síntesis verde de las nanopartículas de óxido de aluminio

Las nanopartículas de óxido de aluminio M1 sintetizadas se analizaron en primera instancia de forma cualitativa, es decir visualizando el cambio de coloración de la solución que va de tonalidad tomate intenso hasta tomar una tonalidad tomate blanquecino como se observa en la Figura 4-10. Según Narayanan (2018, p 3-4) el color de la solución que evidencia la formación de nanopartículas de Al_2O_3 debe ser de una tonalidad casi blanquecina.

En la investigación realizada, se observa un cambio de un tono naranja blanquecino de la solución que se visualiza tras la adición del extracto acuoso de *Cyphomandra betacea* (tomate de árbol), transcurridas 2 horas de reacción a 80 °C y 1500 rpm de agitación. Este hecho demuestra la formación correspondiente de nanopartículas de óxido de aluminio, tal como se evidenció en las investigaciones desarrolladas por Sharma y Sharma (2020, p. 731), quien dedujo que en su investigación hubo la formación de nanopartículas de óxido de aluminio, al haber el cambio de coloración de la solución de sulfato de aluminio a una tonalidad blanquecina debido a la biorreducción de los iones de aluminio a Al_2O_3 NPs luego de 1 horas de agitación a temperatura de 80°C.

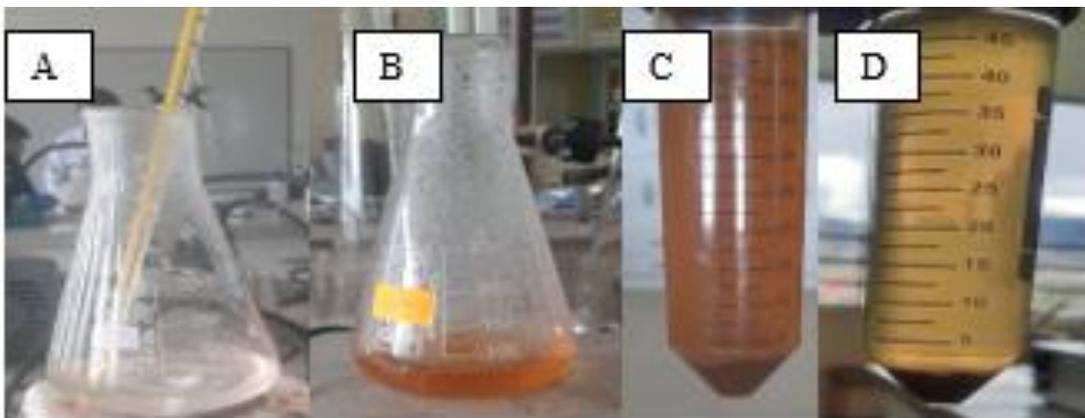


Ilustración 4-10: Síntesis de nanopartículas de óxido de aluminio. (A) Solución de la sal (B) Sal 0.025M más extracto (C) Sal 0.025M más extracto al final de la síntesis (D) nanopartículas

Realizado por: Acosta, I., 2024.

La síntesis de las nanopartículas de Al_2O_3 se genera a partir de una reacción química de óxido-reducción, pero hasta ahora no se conoce específicamente como se produce porque el extracto de

tomate de árbol posee metabolitos secundarios especialmente grupos fenólicos que son agentes reductores y estabilizantes de las nanopartículas.

Según Saleh et al (2023, p.42-44), la síntesis de las nanopartículas de Al_2O_3 se fundamenta en que los compuestos fenólicos (flavonoides) presentes en el extracto acuoso de *Cyphomandra betacea* (tomate de árbol) se unen a los iones Al^{3+} que se forman tras la disolución de $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ en agua, de esta manera se forman complejos metálicos los cuales se van a reducir a partículas de Al_2O_3 . Estas partículas atraviesan una etapa de agregación, tras una de nucleación y finalmente resulta en la formación de nanopartículas de Al_2O_3 .

En la Tabla 4-5 se detalla el rendimiento experimental de Al_2O_3 NPs a una concentración molar de 0.025.

Tabla 4-5: Rendimiento experimental de la síntesis de nanopartículas de Al_2O_3

Concentración Al_2O_3 NPs (M)	Peso/Masa obtenida (g)
0.025 M	0,135 g

Realizado por: Acosta, I., 2024.

4.4 Resultados de la caracterización de nanopartículas de óxido de aluminio

4.4.1 Espectroscopia Uv-vis

La espectroscopia Uv-vis, es una de las técnicas analíticas que se utiliza para revelar que la síntesis de nanopartículas del compuesto de interés es efectiva, en este caso nanopartículas de óxido de aluminio. Para realizar el análisis se efectuó un barrido de la muestra en un rango de longitud de onda de 250 a 600 nm. Según Sabri et al (2021, p.45), las nanopartículas de óxido de aluminio (Al_2O_3 NPs) en solución, absorben longitudes de onda de 260 hasta 275 nm. En nuestra investigación, la muestra analizada a una concentración de 0.025 M presenta un único pico a una longitud de onda de 263,81 nm.

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

Concentración de las Al_2O_3 NPs	Longitud de onda (nm)
0.025 M	263,80 nm

Realizado por: Acosta, I., 2024.

En la investigación realizada por Saleh et al (2023, pp. 10-13), las nanopartículas de Al_2O_3 obtenidas a partir del extracto de semilla de *Phoenix dactylifera* y el uso de residuos de láminas de aluminio presentaron un único pico de absorción a una longitud de onda de 264 nm, mientras que las nanopartículas de Al_2O_3 -NPs sintetizadas por Duraysani (2018, pp. 418-420), a partir de nitrato de aluminio utilizando extractos de hojas de *Aerva lanta* y semillas de *Terminalia chebula*, registraron un solo pico de absorción a 271 nm.

Al estar los resultados realizados (Tabla 4-6), dentro de los rangos de la longitud de onda establecidos por Sabri et al (2021, p.45), y ser similares a los autores anteriormente citados, podemos deducir que en efecto las nanopartículas sintetizadas son de óxido de aluminio.

A continuación, En la Figura 4-11 se distingue claramente el pico formado al analizar la muestra obtenida en el equipo UV-Vis.

[]	nm	Abs
0.025 M	263,80	0.090

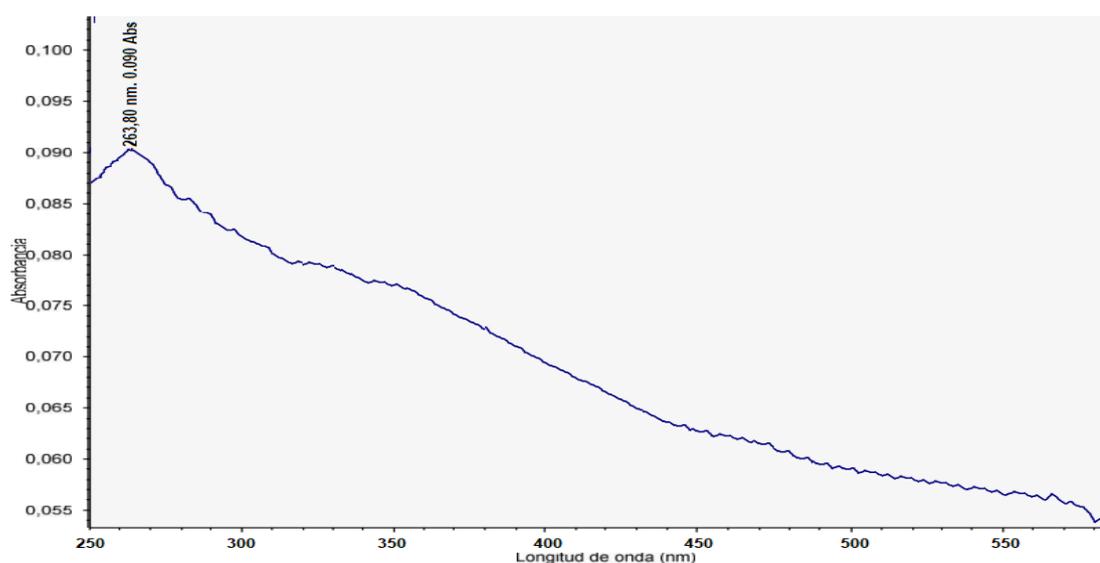


Ilustración 4-11: Espectro Uv-vis de nanopartículas de óxido de aluminio 0.025 M

Realizado por: Acosta, I., 2024.

4.4.2 Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR)

El análisis mediante Espectrometría infrarroja permite deducir que, en efecto, el compuesto es completamente de óxido de aluminio. La Figura 4-12, evidencia los diferentes picos de absorción

que presentaron las nanopartículas de Al_2O_3 a una concentración de 0.025 M. Los picos más representativos se registran a una longitud de $3266,82\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al grupo funcional OH de los compuestos fenólicos presentes en el extracto empleado, mientras que las vibraciones de estiramiento de los picos a una longitud de onda de 1538 y $638,8\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la banda del enlace Al-OH y Al_2O_3 NPs. Según Saleh (2023, pp. 13-14) el óxido de aluminio generalmente presenta un pico o banda pronunciado entre $638,3$ y 894 cm^{-1} .

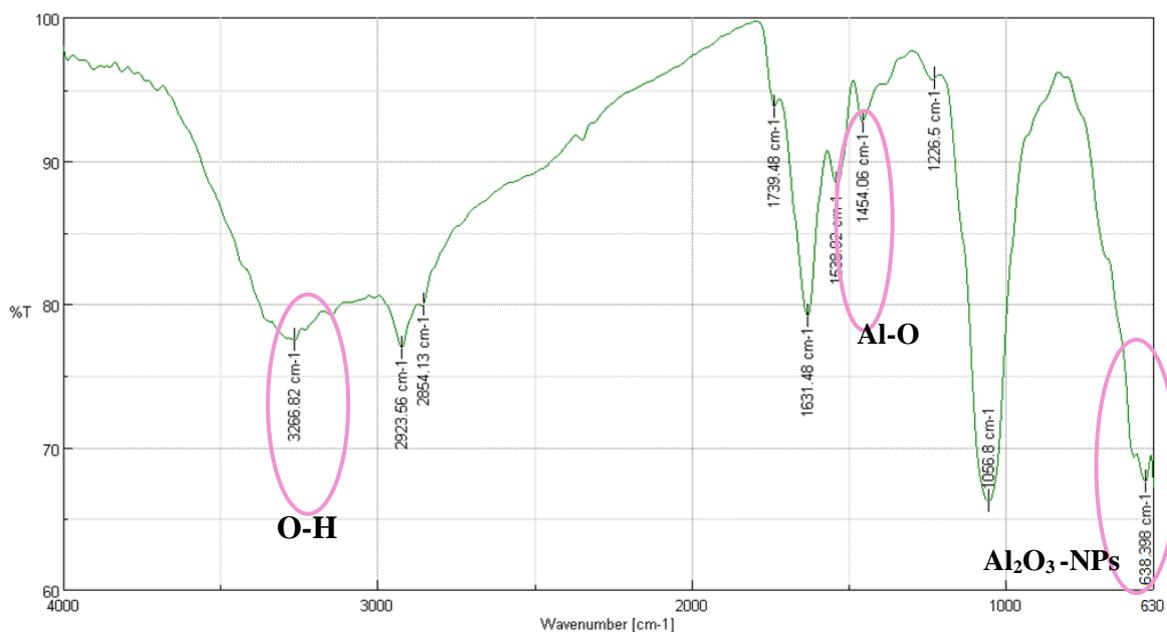


Ilustración 4-12: Espectroscopia de infrarrojo de nanopartículas de Al_2O_3 0.5 M

Realizado por: Acosta, I., 2024.

Los resultados obtenidos, son similares a los encontrados por Sabri (2021, pp. 44-45), quien al realizar el análisis FT-IR de las nanopartículas de Al_2O_3 reportó un pico de absorción en la región de entre 1551 y 1615 cm^{-1} correspondiente al grupo Al-OH y otros picos de absorción a frecuencias de 642 cm^{-1} y 970 cm^{-1} que les atribuyó a los compuestos AlO_6 octaédrico y AlO_4 tetraédrico, por lo cual se dedujo que se ha sintetizado nanopartículas de óxido de aluminio. Así también Saleh (2023, pp. 13-14) reportó la presencia de una vibración a una frecuencia de $634,89\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al estiramiento de los picos característicos de los enlaces de las nanopartículas de Al_2O_3 . Por ende, de acuerdo a los resultados encontrados, podemos afirmar que las nanopartículas obtenidas son óxido de aluminio por la formación de un pico a $638,3\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a vibraciones del enlace Al_2O_3 .

4.4.3 Microscopía electrónica de barrido

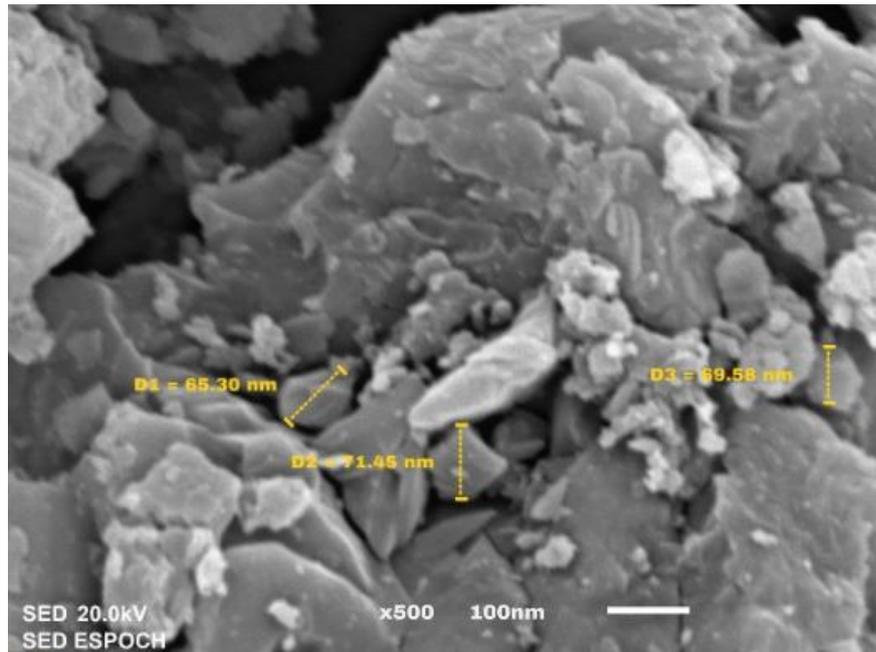


Ilustración 4-13: Microscopía electrónica de barrido de nanopartículas

Realizado por: Acosta, I., 2024.

La caracterización morfológica de las nanopartículas de Al₂O₃ se realizó mediante la técnica de microscopía electrónica de barrida. La Figura 14-4, muestra que las nanopartículas de Al₂O₃ presentan un tamaño promedio entre 65 y 71 nm respectivamente, una forma ovalada, con borde irregular y de superficie rugosa. Estos resultados coinciden con los resultados encontrados por Duraisamy (2018, pp. 428-436), quien reportó que las nanopartículas de óxido de aluminio presentan una forma esférica, tamaño que oscilaba entre 50 y 70 nm que se encuentra dentro de una escala manometría y de dispersión notable.

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

Para determinar la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de aluminio frente a bacterias farmacorresistentes se determinó empleando distintas muestras de agua, tomadas en dos fechas diferentes en un solo punto (Figura 4-14).



Ilustración 4-14: Toma de muestra. (A) Punto de descarga del río Chibunga al río Chambo; (B) Toma de la muestra; (C) Etiquetado de la muestra

Realizado por: Acosta, I., 2024.

De acuerdo con Landa (2023), el agua del río Chibunga alberga un número considerable de bacterias farmacorresistentes, como resultado de la descarga insensibilizada de aguas residuales que presenta este cauce. Debido a lo expuesto, se decidió realizar un análisis microbiológico que consta de dos partes; primero se realizó una siembra de las muestras de agua en placas Compact Dry para determinar la presencia de bacterias indicadoras de calidad del agua (*coliformes totales*, *coliformes fecales* y *Pseudomona aeruginosa*), en cambio para la determinación de la actividad bactericida de las nanopartículas de interés, se empleó la técnica de siembra en superficie utilizando como medio agar Nutritivo ya este es un medio enriquecido que permite el crecimiento de todo tipo de bacteria. Finalmente, se sembró la muestra madre y también se trabajó con diluciones de las muestras de agua hasta 1×10^{-2} esto con el objetivo de seleccionar una muestra óptima para comprobar la actividad bactericida de las nanopartículas (Figura 4-15).



Ilustración 4-15: Siembra de las muestras madre y de la dilución de las muestras de agua del punto de descarga del río Chibunga y río Chambo

Realizado por: Acosta, I., 2024.

Durante el proceso de preparación del medio de cultivo y realización de las siembras microbiológicas se realizó manteniendo un ambiente e instrumentación estéril para evitar una contaminación cruzada y obtener un crecimiento de colonias bacterianas que no correspondan a las muestras de agua tomadas del lugar de investigación.

4.5.1 *Identificación de bioindicadores de calidad de agua mediante placas Compact dry.*

Para realizar la identificación se utilizó placas Compact Dry™, que se trata de un método listo para usarse y eficaz que ayuda a reducir las horas necesarias para la determinación microbiológica en diversas muestras. Para ello se inoculó 1 ml de las muestras en el centro de la placa de forma homogénea, posteriormente se incubaron los medios invertidos a la temperatura correspondiente para cada microorganismo. Los resultados se evidencian por la pigmentación de las colonias en diferentes colores según el sustrato cromógeno e indicadores para cada bacteria, según la Figura 4-16 y 4-17.

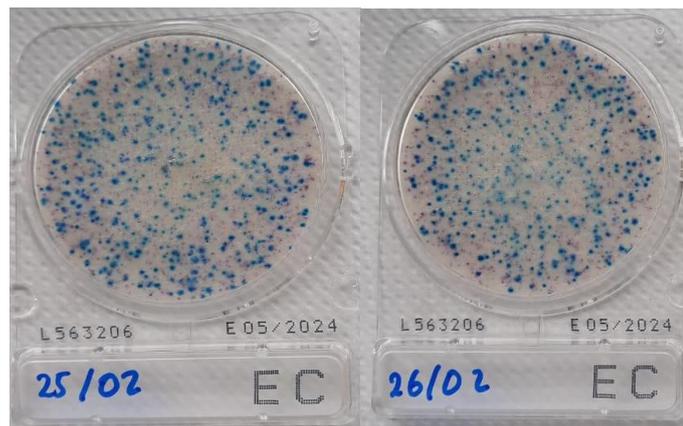


Ilustración 4-16: Coliformes Totales y Fecales - E. coli. (A) Resultados del muestreo 1. (B) Resultados del muestreo 2

Realizado por: Acosta, I., 2024.

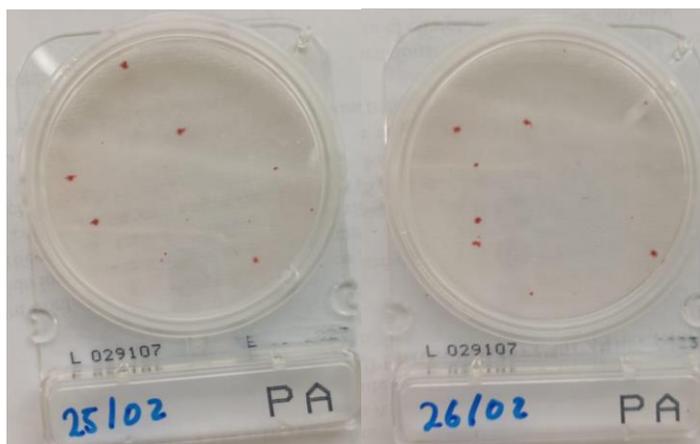


Ilustración 4-17: *Pseudomonas aeruginosa* (A) Resultados del muestreo 1. (B) Resultados del muestreo 2

Realizado por: Acosta, I., 2024.

El medio para la determinación de Coliformes totales y fecales – *E. coli*, de acuerdo con el fundamento determinado por Compact Dry™ (2013), consta de 2 sustratos cromógenos: Magneta- GAL y X- Gluc, de esta manera los coliformes totales desarrollan una coloración roja debido al sustrato Magneta- GAL, mientras que los coliformes fecales junto con *E. coli* presentan una pigmentación azul debido al sustrato X- Gluc. De igual manera para la determinación de la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, que es una bacteria típica del suelo y agua, se realizó por medio de placas Compact Dry las cuales tienen un sustrato cromogénico X-Phos el cual forma colonias rojas con pigmento verde/amarillo.

Para la expresión de los resultados, se deben considerar aquellas placas de las que se puedan contar de 25 a 250 colonias, se multiplica el área de la placa y se expresa en UFC/ml (Barcera, 2015) Para interpretar resultados se contó 5 cuadros de 1 cm², se realizó un promedio y se multiplicó por el área, considerando que cada muestra es sobre 100 ml, y finalmente se obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en la Tabla 4-7.

Tabla 4-7: Resultados bacterias bioindicadores de la calidad de agua en placas Compact Dry

Fecha 25 de febrero de 2024		
Bioindicadores	Colonias	UFC/ml
Coliformes Totales	79200	7.9×10^4
Coliformes Fecales y <i>E. coli</i>	50400	5.0×10^4
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1100	1.1×10^3
Fecha 26 de febrero de 2024		

Bioindicadores	Colonias	UFC/ml
Coliformes Totales	81200	8.1×10^4
Coliformes Fecales y <i>E. coli</i>	57600	5.7×10^4
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1000	1.0×10^3

Realizado por: Acosta, I.,2024.

Las Placas Compact Dry son sistemas de cultivo listos para usar, diseñados para simplificar y acelerar el proceso de análisis microbiológico. Varios estudios han destacado la eficiencia de estas placas en la detección de microorganismos en muestras acuáticas. Por ejemplo, el trabajo de Zhang et al. (2019) señaló que las Placas Compact Dry exhibieron una alta sensibilidad y especificidad en la identificación de bacterias coliformes en muestras de agua, siendo una herramienta valiosa para la monitorización de la calidad del agua. Es esencial comparar las Placas Compact Dry con otros métodos convencionales utilizados en el análisis de muestras de agua de río. Un estudio realizado por Johnson et al. (2018) comparó la eficacia de las Placas Compact Dry con la técnica de filtración por membrana, concluyendo que ambas proporcionan resultados consistentes, pero las placas ofrecen una ventaja en términos de simplicidad y rapidez en la obtención de resultados.

4.5.2 Determinación del número de colonias en Agar Nutritivo

Para realizar el conteo del número inicial de colonias bacterianas, se llevó a cabo una siembra por extensión en placa tomando con una pipeta 0,1 ml del inóculo (muestra madre) recolectado en el punto de muestreo y luego se distribuyó uniformemente sobre el medio de cultivo. Este procedimiento se repitió por 5 ocasiones en cada fecha de muestreo. Al cabo de 48 horas de incubación a 37°C, se obtuvo como resultado un promedio de 415 colonias para la muestra madre recolectada el 18 de enero y 408 colonias formadas en la muestra madre tomada el 18 de febrero del presente año (Figura 4-19).

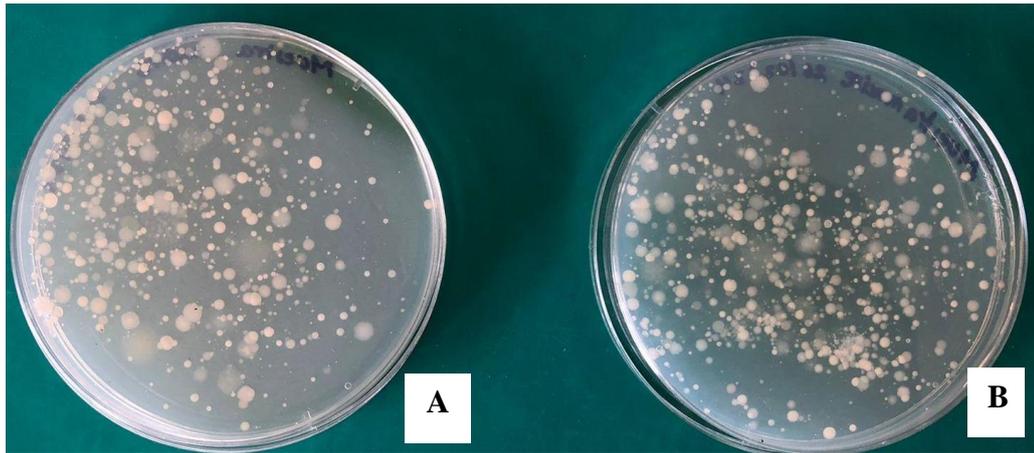


Ilustración 4-18: Colonias bacterianas formadas de la muestra madre (A) 18 de enero (B) 18 de febrero.

Realizado por: Acosta, I., 2024.

4.6 Pruebas microbiológicas

Las pruebas microbiológicas ejecutadas nos ayudaron a determinar la actividad bactericida que ejercen las nanopartículas de óxido de aluminio sobre aquellas bacterias que se encuentran presentes en las muestras de agua tomadas del punto de confluencia del río Chambo y río Chibunga, mediante la observación directa de la reducción del número de colonias bacterianas a medida que transcurría el tiempo de exposición de las muestras de agua a las nanopartículas de Al_2O_3 en presencia de la luz solar.

Para demostrar la actividad bactericida de las nanopartículas, se añadió 0,0311 g de Al_2O_3 NPs en 1 ml del inóculo y luego las muestras se procedió a exponer a la luz solar por un lapso de tiempo de 1, 2 y 3 horas.

4.6.1 *Determinación del número de colonias en Agar Nutritivo*

4.6.1.1 *Determinación del número de colonias bacterianas de las muestras de agua con nanopartículas de óxido de aluminio cada 1, 2 y 3 horas expuestas a la luz solar.*

Para determinar el número de colonias bacterianas formadas sobre el medio de cultivo, primero se realizó una siembra por extensión en superficie tomando 0.1 ml de muestra de agua a la cual

se le añadió 0.0311 g de nanopartículas de Al₂O₃ y después de ser expuestas a la luz solar durante los tres periodos de tiempo establecidos. Tanto el proceso de siembra y conteo de colonias se repitió por 5 ocasiones en cada fecha de muestreo. Transcurrido el tiempo de incubación (48 horas) a 37 °C se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 4-8: Recuento de colonias bacterianas de la muestra madre del 18 de enero 2024

Intersección del río Chibunga y el río Chambo				
N repeticiones	Tiempo (hrs)	#Colonias bacterianas	Promedio	UFC/ ml
Muestra madre	0h	415	415	42x10 ²
1	1 h	72	73	73x10 ³
2	1h	67		
3	1h	78		
4	1h	81		
5	1h	69		
1	2h	45	45	45x10 ³
2	2h	44		
3	2h	48		
4	2h	47		
5	2h	42		
1	3h	16	16	16x10 ³
2	3h	11		
3	3h	20		
4	3h	18		
5	3h	15		

Realizado por: Acosta, I., 2024.

Tabla 4-9: Recuento de colonias bacterianas de la muestra madre del 18 de febrero de 2024

Intersección del río Chibunga y el río Chambo				
n	Tiempo (hrs)	#Colonias bacterianas	Promedio	UFC/ ml
Muestra madre	0h	408	408	40 x10 ³
1	1 h	80	82	82 x10 ³
2	1h	75		

3	1h	85		
4	1h	96		
5	1h	76		
1	2h	54	53	53 x10 ³
2	2h	53		
3	2h	49		
4	2h	60		
5	2h	51		
1	3h	26	24	24 x10 ³
2	3h	28		
3	3h	20		
4	3h	23		
5	3h	21		

Realizado por: Acosta, I., 2024.

En base a estos resultados, podemos inferir que, mientras mayor sea el tiempo de contacto de las muestras de agua con nanopartículas de óxido de aluminio incluido la exposición solar, se evidenciará una disminución significativa del número de colonias bacterianas. Debido a que en el muestreo 1 inicialmente existen 415 colonias, de las cuales transcurrida la primera de exposición presenta un total de 73 colonias, finalmente, en un lapso de tiempo de 2 y 3 horas disminuyó de 45 a 16 colonias (Tabla 4-6), mientras que en el muestreo 2, en la siembra de la “muestra madre” tomada como blanco crecieron un total de 408 colonias bacterianas, posteriormente en el transcurso de 1 hora disminuyó a 82 colonias y en un lapso de tiempo de 2 y 3 horas se disminuyó a 53 a 24 colonias respectivamente (Tabla 4-7).

Una observación relevante es que, no se logró una disminución completa a cero colonias bacterianas, esto puede estar determinados por diferentes factores como; la concentración de nanopartículas empleada fue muy baja, se necesitaba mayor tiempo de exposición a la luz y además, se sembró la muestra madre misma que contiene abundante carga bacteriana, sin embargo, pese a que existía una gran concentración de bacterias si se evidenció una disminución considerable de las mismas como se observa en la Figura 4-20 y Figura 4-21.

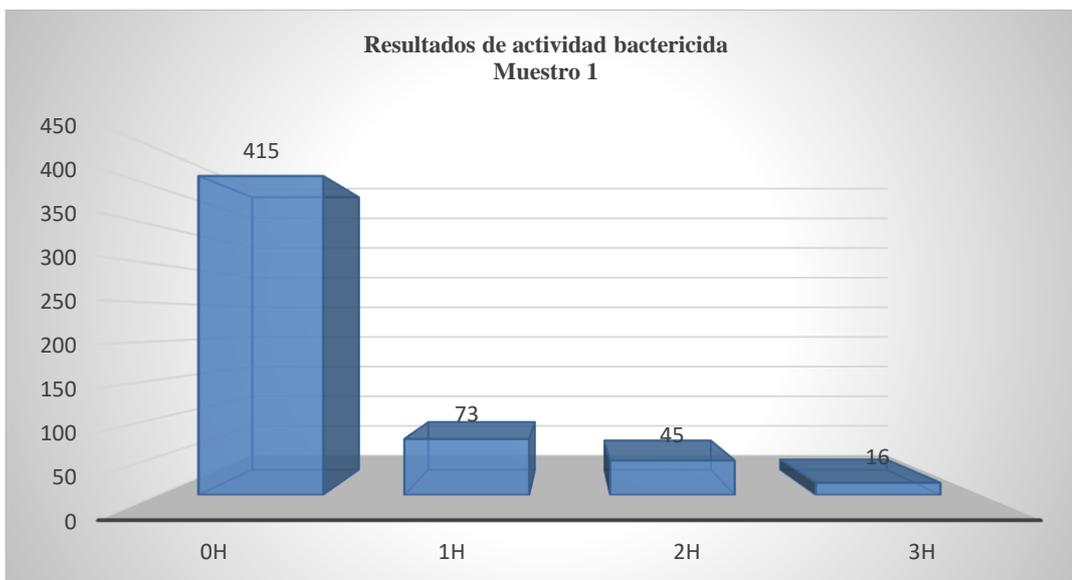


Ilustración 4-19: Representación gráfica de la actividad bactericida de $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$

Realizado por: Acosta, I., 2024.

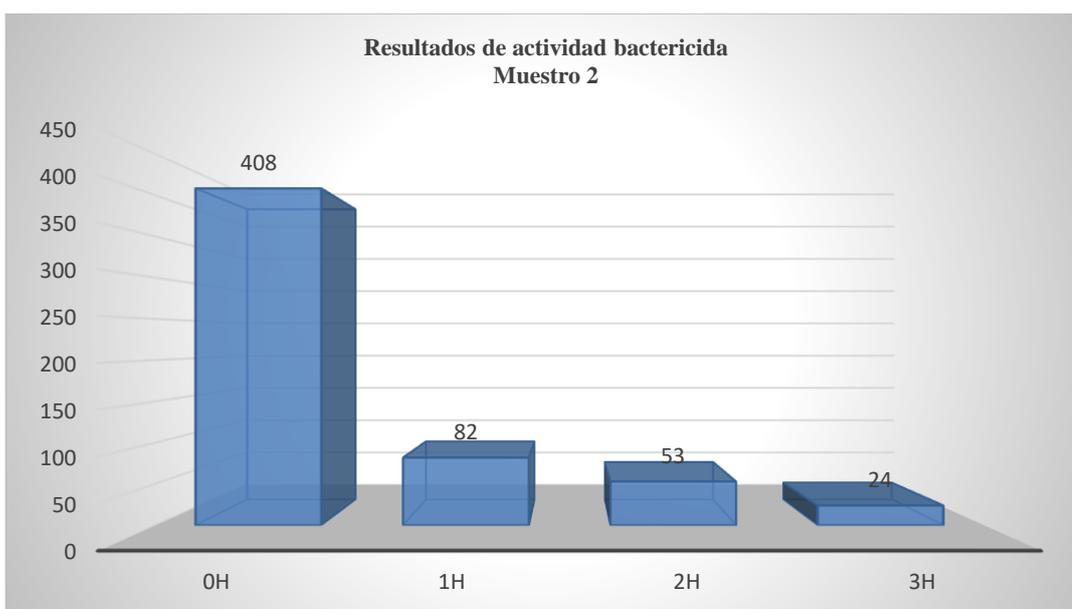


Ilustración 4-20: Representación gráfica de la actividad bactericida de $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NPs}$

Realizado por: Acosta, I., 2024.

4.6.1.2 *Determinación del crecimiento bacteriano en agar nutritivo de las muestras de agua sin nanopartículas de óxido de aluminio cada 1, 2 y 3 horas.*

Para cuantificar el número de colonias bacterianas formadas en el medio de cultivo, se ejecutó el mismo procedimiento explicado en el anterior apartado, sin embargo, en este caso no se añadieron las nanopartículas de Al₂O₃. Después de transcurrir el tiempo de incubación 48 horas a 37°C, se procedió al conteo de colonias formadas y se obtuvieron los resultados que se detallan en las Tabla 4-9 y Tabla 4-10.

Tabla 4-10: Recuento de colonias bacterianas sin nanopartículas de Al₂O₃

Fecha: 18 enero 2024				
n	Tiempo (hrs)	#Colonias bacterianas	Promedio	UFC/ ml
Muestra madre	0h	415	415	42 x10 ²
1	1 h	415	415	42 x10 ²
2	1h	414		
3	1h	414		
4	1h	416		
5	1h	415		
1	2h	415	415	42 x10 ²
2	2h	416		
3	2h	416		
4	2h	414		
5	2h	414		
1	3h	416	415	42 x10 ²
2	3h	414		
3	3h	415		
4	3h	416		
5	3h	414		

Realizado por: Acosta, I., 2024.

Tabla 4-11: Recuento de colonias bacterianas sin nanopartículas de Al₂O₃

Fecha: 18 febrero 2024				
n	Tiempo (hrs)	#Colonias bacterianas	Promedio	UFC/ ml
Muestra madre	0h	408	408	41 x10 ²
1	1 h	408	409	41 x10 ²
2	1h	410		

3	1h	409		
4	1h	408		
5	1h	409		
1	2h	411		
2	2h	410		
3	2h	409		
4	2h	409		
5	2h	408	409	41 x10 ²
1	3h	410		
2	3h	410		
3	3h	408		
4	3h	411		
5	3h	410	410	41 x10 ²

Realizado por: Acosta, I., 2024.

Según los resultados encontrados podemos deducir que, mientras no se apliquen nanopartículas de óxido de aluminio en las muestras de agua, no se disminuirá el número de colonias bacterianas formadas, ya que, en todas las repeticiones de siembra del muestreo 1 y 2 el número de colonias bacterianas permaneció constante durante los tres periodos de exposición a la luz solar sin nanopartículas.

4.6.2 *Análisis del estudio estadístico experimental*

Para realizar el análisis del diseño experimental en el trabajo de investigación se empleó la Correlación de Pearson. Se eligió este diseño debido a que permite determinar si existe correlación inversamente proporcional o directamente proporcional entre las variables dependientes e independientes, en este caso entre las variables *tiempo de exposición de las muestras de agua con nanopartículas de óxido de aluminio a la luz solar y número de colonias bacterianas formadas en los tiempos de exposición establecidos*.

De esta forma, mediante el uso del programa de Microsoft Excel se crearon dos tablas correspondientes a los resultados obtenidos en la parte experimental de las dos muestras de agua tomadas el 18 de enero y el 18 de febrero del presente año en el mismo punto de descarga de agua del río Chibunga al río Chambo y a partir de estos datos se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 4-12: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de Al₂O₃

18 de enero de 2024		
n	Tiempo (hrs)	N° Colonias
1	0	415
2	1	73
3	2	45
4	3	16
Coef. Pear		-0,768

Realizado por: Acosta, I., 2024.

Tabla 4-13: Número de colonias bacterianas con y sin nanopartículas de Al₂O₃

18 de febrero de 2024		
n	Tiempo (hrs)	N° Colonias
1	0	408
2	1	82
3	2	53
4	3	24
Coef. Pear		-0,773

Realizado por: Acosta, I., 2024.

Para realizar el siguiente análisis se planteó las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula (H₀): Las nanopartículas de óxido de aluminio no presentan actividad bactericida frente a colonias bacterianas farmacorresistentes provenientes de muestras de agua del punto de descargo del río Chibunga al río Chambo.

Hipótesis alternativa H_a: Las nanopartículas de óxido de aluminio sí presentan actividad bactericida frente a colonias bacterianas farmacorresistentes provenientes de muestras de agua del punto de descargo del río Chibunga al río Chambo.

Debido a que el coeficiente de correlación de Pearson de las muestras de agua tomadas en el punto de descargo de agua del río Chibunga hacia el río Chambo toman un valor de -0.768 (Tabla 4-10) y -0.773 (Tabla 4-11) se puede concluir que existe una correlación negativa alta, entre la variable independiente (concentración junto con el tiempo de exposición) y la variable dependiente

(número de colonias bacterianas formadas), debido a que mientras mayor tiempo pasan expuestas los inóculos de agua a las nanopartículas y a la luz solar, menor será el número de colonias bacterianas formadas. Aceptando así la hipótesis alternativa la cual señala que sí existe actividad bactericida por parte de las nanopartículas de óxido de aluminio contra bacterias farmacorresistentes presentes en muestras de agua del punto de descarga del río Chibunga y el río Chambo

4.6.3 *Influencia de las variables*

4.6.3.1 *Evaluación de efecto bactericida de las nanopartículas de Al_2O_3 frente a bacterias*

Mediante el análisis comparativo entre el número de colonias bacterianas formadas de las muestras de agua tomadas en las dos fechas del mismo punto de muestreo reportadas en la Tabla 6-4 y Tabla 7-4, podemos explicar que existe una disminución considerable de la carga bacteriana mientras mayor sea el tiempo de exposición de los inóculos a las nanopartículas de Al_2O_3 en presencia de la luz solar, mientras que, cuando no existe dicha presencia de nanopartículas, a pesar de que si existe exposición a la luz solar, la carga bacteriana no se altera en lo absoluto (Tabla 8-4 y 9-4), (Figura 4-21; Figura 4-22).

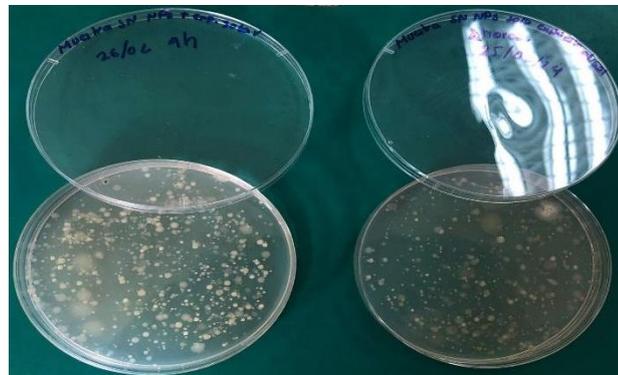


Ilustración 4-21: (A) Crecimiento de colonias bacterianas sin NPs solo con exposición a luz solar (A) 18 de enero; (B) 18 de febrero.

Realizado por: Acosta, I., 2024.

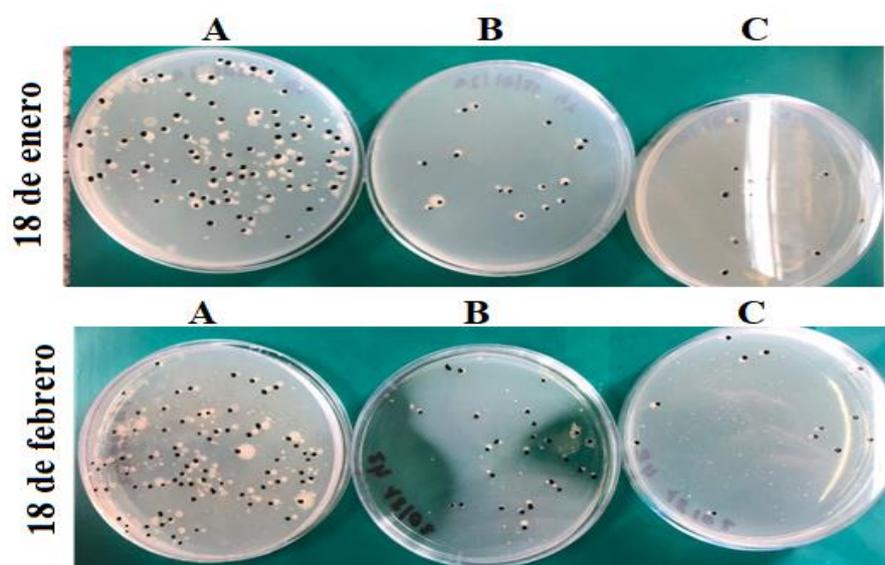


Ilustración 4-22: Placa con Al₂O₃ NPs (A) 1h; (B) 2 hrs; (C) 3 hrs de exposición

Realizado por: Acosta, I., 2024.

Mediante estos resultados, se puede demostrar que las nanopartículas de óxido de aluminio obtenidas sí presentan un potencial efecto bactericida contra bacilos Gram negativos de géneros como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp*, *Shigella flexnery*, *Proteus mirabilis*, *Aeromona hydrophilas*, *Edwarsiella tarda* y *Pseudomonas aeruginosa*. También contra bacterias Gram positivas como son los géneros de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, bacterias que inicialmente fueron identificados por Landa (2023, p. 54), al realizar un análisis microbiológico del agua del río Chibunga.

Estos resultados son similares a los encontrados por Saleh et al (2023, p.42-44), quien determinó que sus nanopartículas de óxido de aluminio sintetizadas a partir del extracto acuoso de cáscara de *Citrus aurantium* presentan poder antimicrobiano contra bacterias gram positivas tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*; bacterias gram negativas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Aspergillus niger*, así como también demostró tener actividad antimicótica contra *Candida albicans*.

Por otro lado, Sabri (2021, pp. 44-45), en su trabajo de investigación demostró que sus nanopartículas de óxido de aluminio sintetizadas a partir del extracto de hoja de *Cymbopogon citratus* presentaban una mayor actividad bactericida contra aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente, así como también contra *Streptococcus pyogenes*,

4.6.3.2 *Evaluación del efecto del tiempo de exposición de las muestras de agua de río a las nanopartículas de Al₂O₃.*

De acuerdo a los resultados presentes en la Tabla 6-4 y 7-4, el inóculo correspondiente a la muestra de agua tomada el 18 de enero, el número de colonias bacterianas se redujo considerablemente de 415 a 73 al cabo de 1 hora, a 45 colonias a las 2 horas y a 16 colonias al pasar 3 horas de exposición, mientras que para el inóculo de la muestra de agua tomada el 18 de febrero paso de 408 colonias bacterianas a 82 en 1 hora, a 82 al pasar 2 horas y a 24 colonias tras transcurrir las 3 horas de exposición.

Según Sirelkhatim, et al (2015, pp. 219-242), las nanopartículas de óxido de aluminio durante el tiempo de contacto con las células bacterianas producen especies reactivas de oxígeno como el O₂ y el H₂O₂ causantes de generar un estrés oxidativo en las células que conlleven a la apoptosis y finalmente la muerte de las bacterias.

Por lo tanto, se puede concluir que el tiempo de exposición del agua hacia las nanopartículas de Al₂O₃ es un factor determinante en el crecimiento de especies bacterianas puesto a que, mientras mayor sea el tiempo de exposición, menor será el número de colonias bacterianas que se forman en el medio de cultivo, es decir que durante este periodo de tiempo las nanopartículas podrán ejercer completamente su efecto bactericida contra las distintas especies bacterianas.

4.6.3.3 *Evaluación del efecto de la luz solar sobre las muestras de agua de río con nanopartículas de Al₂O₃.*

De acuerdo a los resultados obtenidos de la exposición de las muestras de agua a las nanopartículas en presencia de la luz solar, se puede concluir que, la luz juega un papel indispensable para que las nanopartículas de óxido de aluminio puedan ejercer su actividad bactericida puesto a que gracias a la luz estos nanomateriales activan su propiedad foto catalítica que hace que se disminuya considerablemente la carga bacteriana. Según Sergey y Gudkov (2022, pp. 14-17), el proceso de fotocatalisis permite que las nanopartículas de óxido de aluminio puedan generar de forma rápida especies reactivas de oxígeno los cuales interactúan con la membrana celular bacteriana generando daño en esta estructura para permitir el ingreso de las nanopartículas las cuales posteriormente ocasionan alteraciones en las funciones de las células debido al estrés oxidativo conllevando así a la inhibición del crecimiento bacteriano y finalmente a su muerte.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Se sintetizó nanopartículas de óxido de aluminio, utilizando 50 ml de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 0.025 M en combinación con 10 ml de extracto de *Cyphomandra betaceae* (tomate de árbol) y bajo una temperatura controlada de 80 °C, revela un proceso meticulosamente diseñado. La elección de la concentración molar y la temperatura se presenta como un aspecto crucial, ya que estas condiciones promueven la formación eficiente de nanopartículas con propiedades deseables. La combinación estratégica del sulfato de aluminio con el extracto de *Cyphomandra betaceae* demuestra ser un enfoque prometedor, aprovechando las propiedades particulares de ambos reactivos para obtener un producto final con características morfológicas y estabilidad óptimas.
- Se caracterizó mediante espectroscopía UV-vis, reveló que la muestra analizada, con una concentración de 0.025 M, exhibe de manera notable un pico singular a una longitud de onda de 263,80 nm. Paralelamente, en el espectro de infrarrojo (IR), evidencia la formación de un pico discernible a una frecuencia de 638,3 cm^{-1} , atribuido con precisión a las vibraciones del enlace Al_2O_3 , finalmente, las nanopartículas de óxido de aluminio fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) presentando un tamaño promedio entre 65 y 71 nm respectivamente, con una forma ovalada, bordes irregulares y de superficie rugosa, por ende se concluye que debido a dichas características se logra evidenciar la actividad bactericida.
- Se determinó que las nanopartículas de óxido de aluminio sí presentan actividad bactericida frente a colonias resistentes a antibióticos presentes en muestras de agua del punto de confluencia del río Chibunga y río Chambo, debido a que las muestras de agua con presencia de nanopartículas evidenciaron una disminución de la carga bacteriana desde la primera hora de exposición tomando como referencia la muestra madre. Esta actividad se evidencia por la formación de cationes de aluminio, que generan especies reactivas de oxígeno tóxicas y generan estrés oxidativo.

RECOMENDACIONES

- Para la síntesis de nanopartículas de óxido de aluminio con un enfoque respetuoso con el medio ambiente, se sugiere prestar atención a la preparación del extracto. Es recomendable explorar métodos alternativos que faciliten la extracción completa de todos los metabolitos primarios y secundarios de la planta objeto de estudio. Se destaca la importancia de evitar la utilización de un extracto hidroalcohólico, ya que al someterlo a temperaturas elevadas durante el proceso puede disminuir el rendimiento debido al proceso de evaporación de este.
- Aunque mediante la prueba de cloruro férrico se puede determinar la presencia de compuestos fenólicos, es importante realizar un análisis fitoquímico de la especie vegetal *Chypomandra betacea*, para así determinar con exactitud los grupos funcionales existentes y poder discutir de mejor manera cuales tienen actividad reductora y estabilizante en la formación de las nanopartículas.
- Para evaluar la actividad bactericida de las nanopartículas de óxido de aluminio se recomienda aumentar la concentración, ya que en este estudio se utilizó una concentración de 0.0311 g por el rendimiento obtenido, de igual manera se aconseja aumentar el tiempo de exposición solar, ya que, se considera un factor influyente para reducir la carga bacteriana.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ACOSTA DÍAZ, Edgar Manuel.** “Nanopartículas de plata: síntesis y funcionalización. Una breve revisión”. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología. [en línea], 2020, (México), vol. 12, número 22., pp. 1-3. [Consulta: 21 julio 2023]. ISSN 2007-5979. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-56912019000100006
2. **ÁLVAREZ VIEITES, Eva.** “Calidad microbiológica del agua del río Mero” (Trabajo de titulación) (tercer nivel). Universidad de Coruña. 2017. págs. [en línea], 2023, [Consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19593/AlvarezVieites_Eva_TFG_2017.pdf?sequence=2&isAllowed=y
3. **ARAQUE ARELLANO, Miguel; VÁSCONEZ Michelle; MANCHENO, Andrea; ÁLVAREZ Cesar; PREHN Claudia; CEVALLOS, Carina & ORTIZ, Liliana.** *Cuencas Hidrográficas*. 1° ed. Quito-Ecuador: Abya-Yala, 2019. ISBN 978-9978-10-380-7 págs. 1- 136
4. **BRAYNER, Roberta; FERRARI-ILIOU, Roselyne, BRIVOIS, Nicolas; DJEDIAT, Shakib., BENEDETTI, Marc & FIÉVET, Fernand.** (2006). Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*, 6(4), 866-870.
5. **BURBANNO, Napoleón; BECERRA, Simón & PASQUEL Efrén.** Introducción a la hidrogeología del Ecuador. 2^{da} Ed. 2015. *INAMHI, Iñaquito N36-14 y Corea. Quito, Ecuador*
6. **CHIRIBOGA SISALEMA, Indira Jackeline.** Bacterias resistentes a antibióticos en estaciones depuradoras de agua residual. [En línea] (Trabajo de titulación). (Tesis posgrado) Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares. (Madrid-España). 2019. pp. 1-57 [Consulta: 22 de noviembre 2022]. Disponible en: https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/41790/TFM_Chiriboga_Sisalema_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y
7. **CHOPRA, Ian & ROBERTS, Marilyn.** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* [En línea], 2001, (Washington) 65(2), pp. 232-260. [Consulta: 12 de

diciembre 2023]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99026/>

8. **CORRY J.E.; CURTIS G.D. & BAIRD R.M.** *Handbook of Culture Media for Food Microbiology* [En línea]. Lugar ciudad-país: Editorial, año de edición. [Consulta: fecha de consulta]. Disponible en: <URL>
9. **DÍAZ, D.** *Indicadores de contaminación fecal en aguas*. [en línea]. Capítulo Libro, 2003. [Consulta: 16 de noviembre 2023]. Disponible en:
http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/pdfs/Capitulo_20.pdf
10. **DURASAMY, P.** "Green Synthesis of Aluminium Oxide Nanoparticles by using Aerva Lanta and Terminalia Chebula Extracts". *Rev. IJRASET* [En línea], 2018, (India) 45(98), pp. 428-433. [Consulta: 12 de diciembre 2023]. ISSN: 2321-9653. Disponible en:
<https://www.ijraset.com/fileserve.php?FID=12054>
11. **EDAYADULLA, Naushad; BASAVEGOWDA, Nagaraj & LEE, Yong Rok.** "Green synthesis and characterization of palladium nanoparticles and their catalytic performance for the efficient synthesis of biologically interesting di(indolyl)indolin-2-ones". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. [en línea], 2015, (Republic of Korea), vol. 21, número S.N., pp. 1-8. [Consulta: 21 julio 2023]. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.06.007>
12. **ERAZO VELOZ, Luis Roberto.** Evaluación de la calidad del agua del río Chambo en el tramo comprendido de la unión del río Chibunga hasta Cahuaji bajo, provincia de Chimborazo, 2015. (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad de especialidades espíritu santo, artes liberales y ciencias de la educación, Samborondón-Ecuador. agosto de 2015. págs. [en línea], 2023, [Consulta: 21 julio 2023]. Disponible en:
<http://repositorio.uees.edu.ec/bitstream/123456789/2153/1/EV-2015%20Roberto%20Erazo%20Veloz.pdf>
13. **ERAZO, R.** (07 de mayo de 2013). El Chibunga, uno de los ríos más contaminados del país. (D. El Telégrafo, Entrevistador)
<https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/regional/1/el-chibunga-uno-de-los-riosmas-contaminados-del-pais>
14. **ESCOBAR, Jairo.** "La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar". *Recursos naturales e infraestructura*, [en línea], (2002), (Naciones Unidas, Santiago de Chile). págs. 459-477. [Consulta: 12 de diciembre de 2023]. ISSN 1680-9025. Disponible en: <https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/db3b12df-ae24-4302-97ca-94db2b0d738c/content>

15. **FLORES MUÑOZ, Brenda Arely.** Uso de antibióticos en adultos hospitalizados en el HGZ24. [en línea], (Trabajo de titulación) (Especialidad). Universidad Veracruzana. Veracruz-México. 2014. págs. 2-36. [Consulta: 2023-07-23]. Disponible en: <https://www.uv.mx/blogs/favem2014/files/2014/06/TESIS-arely.pdf>
16. **GARCIA LOYAGA, Darwin Xavier.** Contaminación de los ríos, delito sin control en la parroquia la unión de quinindé. (Trabajo de titulación) (Tercer Nivel). Universidad Regional Autónoma de los Andes, Facultad de Ciencias Jurisprudencia, Escuela de Derecho. Santo Domingo-Ecuador. 2022. págs. 8-13.
17. **GÓMEZ GARZÓN, Marcela.** “Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde”. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía.* [en línea], 2018, (Colombia), vol. 27, número 2, pp. 1-6. [Consulta: 21 julio 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.31260/RepertMedCir.v27.n2.2018.191>
18. **GUADARRAMATEJAS, Rosendo; KIDO-MIRANDA, Juan; ROLDAN-ANTUNEZ, Gustavo & SALAS SALGADO, Marco.** “Contaminación del agua”. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales.* [en línea], 2016, (S.N.), vol. 2, número 5., pp. 1-10. [Consulta: 21 julio 2023]. ISSN: 1012-7089. Disponible en: https://www.ecorfan.org/spain/researchjournals/Ciencias_Ambientales_y_Recursos_Naturales/vol2num5/Revista_de_Ciencias_Ambientales_y_Recursos_Naturales_V2_N5_1.pdf
19. **GUAMÁN MORALES, Estefanía Yajaira.** La contaminación del río Chibunga y el Derecho al buen vivir de los habitantes del cantón Riobamba. (Trabajo de titulación) (Tercer Nivel). Universidad Nacional de Chimborazo, Facultad de Ciencias Políticas y Administrativas, Escuela de Derecho. Riobamba-Ecuador. 2023. págs. 13-65.
20. **GUANGA CASCO, Edwin Rogelio.** Evaluación de la eficiencia de la especie Phragmites Australia en el tratamiento de aguas dulces mediante humedales artificiales en el río Chibunga del cantón Riobamba (Trabajo de titulación) (maestría). Escuela superior politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. 2023. págs. [en línea], 2023, [Consulta: 21 julio 2023]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/18492/1/20T01686.pdf>
21. **GUANOQUIZA TELLO, Lucas & ANTÚNEZ SÁNCHEZ, Alcides.** “The environmental contamination in the water-bearing to Ecuador. Need of his reversion from the public policies withfocus bioético”. *Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático.* [en línea], 2019, vol. 5, número 9., pp. 1-18. [Consulta: 21 julio 2023]. ISSN-e: 2410-7980. Disponible en:

<http://portal.amelica.org/ameli/journal/394/3941756001/>

22. **GUTIÉRREZ S.** Reproducción y crecimiento microbiano. [blog]. Universidad Central de Venezuela: 2008 [consulta 25 octubre 2023]. disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedramicro/08_tema_6_crecimiento.pdf
23. **GUTIERREZ, S.** *Morfología y estructura de los microorganismos*. [en línea]. 2ª ed. Capitulo Libro, 2008. [Consulta: 16 de diciembre de 2023]. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_2_morfologia.pdf
24. **HERNÁNDEZ, Nélida.** “El río y su territorio. Espacio de libertad: un concepto de gestión”. *Revista Terra Nueva Etapa*. [en línea], 2018, (Venezuela), vol. 34, número 56., pp. 2-10. [Consulta: 21 julio 2023]. ISSN: 1012-7089. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/721/72157132006/72157132006.pdf>
25. **ILUSTRE MUNICIPIO DE RIOBAMBA.** *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del Cantón Riobamba 2015-2030*. (2015). Riobamba, Ecuador: Consejo Cantonal.
26. **ILAÑO LAURA, Ítalo Mauricio.** “La ley orgánica de recursos hídricos, usos y aprovechamiento del agua y la contaminación del río Ambato” (Trabajo de titulación) (tercer nivel). Universidad Técnica de Ambato. Ambato-Ecuador. 2015. págs. [en línea], 2023, [Consulta: 23 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/11632/1/FJCS-DE-837.pdf>
27. **JAQUE CASTELLANO, Eddy Santiago & POTO CÍ GUERRERO, Carmen Lucía** “Evaluación del índice de calidad de agua (ICA) de la microcuenca del río Chibunga, en variaciones estacionales, provincia de Chimborazo – Ecuador, durante el periodo 2014” (Trabajo de titulación) (Tercer Nivel). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. 2015. págs. 15-20 [en línea], 2023, [Consulta: 21 diciembre de 2023]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4077/1/236T0132%20UDCTFCl.pdf>
28. **LARENAS MOYANO, Carla Elizabeth; LAVÍN MILLAR, Luis Iván & OBREQUE OBREQUE., Fresia Daniela.** El problema de la contaminación de los cuerpos de agua en la comuna de Laja. Determinación de parámetros bioquímicos y físicos en la Laguna Señoraza y su posible aplicación en el aula. [en línea] (Trabajo de titulación) (Tercer nivel). Universidad de Concepción. Campus Los Ángeles. Escuela de Educación. Los Ángeles. 2018. págs. 29-40. [Consulta: 21 diciembre de

2023.Disponible

en:

<http://repositorio.udec.cl/jspui/bitstream/11594/2909/4/LARENAS%20-LAVIN%20-OBREQUE.pdf>

29. **LÁREZ VELÁSQUEZ, Cristóbal; KOTEICH KHATIB Sonia & LÓPEZ GONZÁLEZ Floralba.** Nanopartículas: fundamentos y aplicaciones. [en línea]: Mérida-Venezuela: Editorial Universidad de los Andes, 2015. [Consulta: 24 julio 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Cristobal-Larez-Velasquez/publication/285356585_Nanoparticulas_fundamentos_y_aplicaciones/links/5fd22371299bf188d4085adc/Nanoparticulas-fundamentos-y-aplicaciones.pdf
30. **MARCANO, Daniel.** “El lado positivo de las bacterias”. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Range*. [en línea], 2008, (Venezuela), vol. 39, número 2, pp. 63-65. [Consulta: 21 julio 2023]. ISSN 1848-2377 Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772008000200009
31. **MARÍN GALVÍN, Rafael.** Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: Tratamiento y control de calidad de agua [en línea]. 2^{da} Ed. España: Díaz de Santos, 2019. [Consulta: 28 de septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.editdiazdesantos.com/wwwdat/pdf/9788490522103.pdf>
32. **MARQUEZ, et al.** “Actividad antioxidante de compuestos fenólicos del extracto acuoso de tomate de abol (*Cyphomandra betacea* sp.) en etapa de poscosecha”. *Revista Agraria* [en línea], 2020, (Colombia), vol. 19, número 2, pp. 173-184. [Consulta: 15 de febrero 2024]. ISSN 0798-0477 Disponible en: https://www.academia.edu/101618419/Actividad_antioxidante_y_concentraci%C3%B3n_de_compuestos_fen%C3%B3licos_del_tomate_de_%C3%A1rbol_cyphomandra_betacea_s_en_poscosecha
33. **MOMISHA M., Arun P.** Green synthesis of aluminium nanoparticle from *Ixora macrothysra* extracts and its antibacterial activity. *Department of Biotechnology*. vol. 6. n° 6, (2019), (India). Págs. 2-27.
34. **MOURATO, Ana; GADANHO, Mario; LINO, Ana & TENREIRO Rogério.** Biosynthesis of Crystalline Silver and Gold Nanoparticles by Extremophilic Yeasts. *Bioinorganic chemistry and applications Journal*. [en línea], 2011, (Portugal), vol. 11, pp. 2-8. [Consulta: 21 julio 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2011/546074>
35. **NISSUI PHARMACEUTICAL** granted PTM status for Compact Dry TC, Inside

Laboratory Management; AOAC, July 2004: 19 – 22

36. **NTE INEN 2 226:2000:** *Agua. Calidad del agua. Muestreo. Diseño de los programas de muestreo. Parte 3: Identificación de las situaciones de muestreo.*
37. **NTE INEN 2169:2013:** *Agua. calidad del agua. muestreo. Manejo y conservación de muestras. Parte 4: Inspección.*
38. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, (2021).** *Resistencia a los antimicrobianos.* Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>
39. **ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, (2021).** *La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial.* Recuperado de: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
40. **PARDO, Lucas; ARIAS, Jason & MOLLEDA, Patricia.** “Preparation of synthesized silver nanoparticles from extract of rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.) and its used as a preservative”. *Revista de Ciencias de la Vida LA GRANJA*. [en línea], 2022, (Ecuador), vol. 35, número 1, pp. 1-12. [Consulta: 21 julio 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.17163/lgr.n35.2022.04>
41. **PAUTA, Guillermina; VELASCO, María; GUTIÉRREZ, Daniela; VÁZQUEZ, Gabriel; RIVERA, Santiago & ABRIL, Andrea.** “Evaluación de la calidad del agua de los ríos de la ciudad de Cuenca, Ecuador”. *MASKANA*, vol. 10, n°. 2, (2019), (Cuenca, Ecuador). Págs. 76-88
42. **RÍOS TOBÓN, Sandra; AGUDELO CADAVID, Ruth M & GUTIÉRREZ BUILES, Lina A.** “Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano”. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. [en línea], 2017, (Colombia), vol. 35, número 2, pp. 236-247. [Consulta: 21 julio 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08>
43. **RÍOS TOBÓN, Sandra; AGUDELO CADAVID, Ruth M. & GUTIÉRREZ BUILE, Lina A.** “Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano”. [en línea], 2017, (Colombia), vol. 66 (2), págs. [Consulta: 23 de diciembre de 2023]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v35n2/0120-386X-rfnsp-35-02-00236.pdf>
44. **RODÍGUEZ MARTINEZ, Claudio.** Manual de medios de cultivo. BIOCEN. [En

línea]. [2018] [Consultado el 25 de octubre de 2023]. DISPONIBLE EN:
<https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>

45. **RODRÍGUEZ ZITLALPOPOCA, Enrique & BRAVO NIEVES, Arianna.** “Nanotecnología verde contra la resistencia antibacteriana”. *Revista Científica Nextia*. [en línea], 2021, (México), número 12, pp. 3-17. [Consulta: 21 julio 2023]. ISSN 2683-1988. Disponible en: <https://zenodo.org/records/5639490>
46. **RODRIGUEZ, Erika A. & JIMENEZ QUINCENO, Judy Natalia.** Resistencia bacteriana a antibióticos en ambientes acuáticos: origen e implicaciones para la salud pública. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*. 2023;41(3): e351453. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v41n3/2256-3334-rfnsp-41-03-e03.pdf>
47. **ROSS, Jessica; LARCO, Danny; COLON, Olivia; COALSON Jenna; GAUS Katherine Taylor & LEE Shaun.** Evolución de la Resistencia a los antibióticos en una zona rural de Ecuador. *Práctica Familiar Rural*. [en línea], 2020, (Ecuador), vol. 5, número 1 pp. 1-5. [Consulta: 21 julio 2023]. Disponible en: <https://practicafamiliarrural.org/index.php/pfr/article/view/144/177>
48. **SABRI JAWAD, Anwar; OBAID THEWAINI, Qasim Najem & AL-MUSAWI, Sharafaldin.** “Cytotoxicity Effect and Antibacterial Activity of Al₂O₃ Nanoparticles Activity against *Streptococcus Pyogenes* and *Proteus Vulgari*”. *Journal of Applied Sciences and Nanotechnology* [En línea], 2021, (Iraq) 1(3), pp. 42-50. [Consulta: 12 de diciembre 2023]. ISSN: 3944-1061. Disponible en: https://jasn.uotechnology.edu.iq/article_15549_a872e71c8a8baded9c64714f6af0e1eb.pdf
49. **SALEH, Ahmed.** “Síntesis verde y caracterización de nanopartículas de óxido de aluminio utilizando extracto de semilla de *Phoenix dactylifera* junto con actividad antimicrobiana, fitotoxicidad y efectos citológicos en semillas de *Vicia faba*”. *Biomass Conversion and Biorefnery* [En línea], 2023, (Egipto) 7(3), pp. 42-50. [Consulta: 12 de diciembre 2023]. ISSN: 1339-9023. Disponible en: [file:///C:/Users/Hp/Downloads/s13399-023-04800-x%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Hp/Downloads/s13399-023-04800-x%20(1).pdf)
50. **SHARMA, Neera & SHARMA1, Preeti.** “Review article on synthesis and applications of aluminium oxide nanoparticles”. *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)* [En línea], 2020, (India) 7(5), pp. 730-733. [Consulta: 16 de diciembre 2023]. ISSN: 2395-0072. Disponible en: <https://www.irjet.net/archives/V7/i7/IRJET-V7I7130.pdf>
51. **SIRELKHATIM, A., MAHMUD, S., SEENI, A., KAUS, N. H. M., ANN, L. C.,**

BAKHORI, S. K. M. & MOHAMAD, D. (2015). Review of zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219-242.

- 52. VARGAS FLORES, Tatiana & VARGAS ALVIN, Kuno.** “Morfología bacteriana”. *Revista de Actualización Clínica*. [en línea], 2014, (Ecuador), vol. 49, número 6, pp. 2-6. [Consulta: 21 julio 2023]. ISSN 2594-2598. Disponible en: http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1466/280_2.pdf?sequenc
- 53. VELIDANDI, Aditya; MOUNIKA, Sarvepalli; KUMAR, Pradeep; PRASHANTH, Ninian & RAJU Rama.** “Characterization, catalytic, and recyclability studies of nano-sized spherical palladium particles synthesized using aqueous poly-extract (turmeric, neem, and tulasi)”. *Environmental Research*. [en línea], 2023, (India), vol. 228, número S.N., pp. 2-27. [Consulta: 21 julio 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115821>
- 54. VELOZ MAYORGA, Nancy Cecilia & CARBONEL, Carlos.** Evaluación de la calidad del agua de la microcuenca del río Chibunga-Ecuador en variaciones estacionales, periodo 2013- 2017. *Revista Del Instituto de Investigaciones de La Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*. vol. 21. n° 5, (2018). pp. 1-14.
- 55. JIMÉNEZ CALVA, Rubia Estrella.** “PROGRAMA PSICOEDUCATIVO PARA POTENCIAR LA RESILIENCIA EN LOS ESTUDIANTES DEL SÉPTIMO AÑO DE EDUCACIÓN BÁSICA DE LA ESCUELA LAURO DAMERVAL AYORA N°2, PERIODO 2014-2015”. (Trabajo de titulación) (tercer nivel). Universidad Nacional de Loja. Loja-Ecuador. 2016. págs. 27-30 [en línea], [Consulta: 23 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/13687/1/Tesis%20Rubia%20Estrella.pdf>
- 56. MEZA, Norkys & MANZANO MÉNDEZ, Juan.** Características del fruto de tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae* [Cav.] Sendtn) basadas en la coloración del arilo, en la Zona Andina Venezolana. *Revista UDO Agrícola*. vol. 9 n° 2, (2009): pp. 289-294.



ANEXOS

ANEXO A: CÁLCULO DEL PESO MOLECULAR DEL COMPUESTO $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$

Compuesto	Número	Peso molecular	Total
Al	2	26.98	53.96
S	3	32.07	96.20
O	30	16.00	479.97
H	36	1.01	36.28
		PM del $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$	666.41

ANEXO B: CÁLCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LA SAL PRECURSORA.

Se detalla la cantidad en gramos de la sal precursora empleada para preparar las disoluciones de $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ a las concentraciones estudiadas en cada experimentación.

Cálculos

- 0.025 M

$$100 \text{ ml } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{0.025 \text{ mol } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O}{L \text{ sol}} * \frac{666,4 \text{ g } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O}{1 \text{ mol } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O} = 1,66 \text{ g } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$$

- 1 M

$$100 \text{ ml } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{1 \text{ mol } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O}{L \text{ sol}} * \frac{666,4 \text{ g } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O}{1 \text{ mol } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O} = 66,64 \text{ g } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$$

- 0.5 M

$$100 \text{ ml } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{0.5 \text{ mol } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O}{L \text{ sol}} * \frac{666,4 \text{ g } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O}{1 \text{ mol } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O} = 33,32 \text{ g } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$$

- 0.25 M

$$100 \text{ ml } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{0.25 \text{ mol } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O}{L \text{ sol}} * \frac{666,4 \text{ g } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O}{1 \text{ mol } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O} = 16,66 \text{ g } Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$$

ANEXO C: PROCESO DE LAVADO, CORTADO DEL FRUTO DE TOMATE DE ÁRBOL



ANEXO E: PROCESO DE SECADO, TRITURADO Y PESADO DEL FRUTO DE TOMATE DE ÁRBOL





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE LA GUÍA PARA
NORMALIZACIÓN DE TRABAJOS DE FIN DE GRADO

Fecha de entrega: 29/05/2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR
Nombres – Apellidos: Ivette Salomé Acosta Panimboza ✓
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias ✓
Carrera: Bioquímica y Farmacia ✓
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica ✓
<p style="text-align: center;">✓</p> <p style="text-align: center;"> BQCI. Mishell Carolina Moreno Samaniego Directora del Trabajo de Integración Curricular</p> <p style="text-align: center;"> Ing. Violeta Maricela Dalgo Flores Asesora del Trabajo de Integración Curricular</p>