



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA H.”
SEDE ARAGUA**



**BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE (CuNPs) Y SU EFECTO
ANTIMICROBIANO SOBRE UNA CEPA DE *Staphylococcus aureus***

**Trabajo de investigación presentado como
Requisito para aprobar la asignatura por:**

Montero, Marialis
C.I.: 26.526.818
Ojeda, Gabriela
C.I.: 25.443.220

Maracay, Noviembre 2023



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA H.”
SEDE ARAGUA**



**BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE (CuNPs) Y SU EFECTO
ANTIMICROBIANO SOBRE UNA CEPA DE *Staphylococcus aureus***

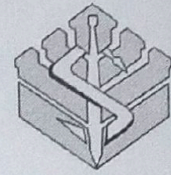
**Trabajo de investigación presentado como
Requisito para aprobar la asignatura por:**

Montero, Marialis
C.I.: 26.526.818
Ojeda, Gabriela
C.I.: 25.443.220

Maracay, Noviembre 2023



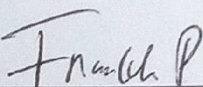
UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANALISIS SEDE ARAGUA
PROFESORA "OMAIRA FIGUEROA"
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
ASIGNATURA: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



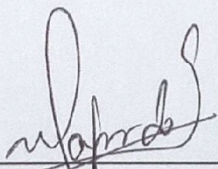
VEREDICTO

Nosotros los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Trabajo de Investigación titulado: "**Biosíntesis de nanopartículas de cobre (CuNPs) y su efecto antimicrobiano sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*.**" presentado por las bachilleres Marialis Montero y Gabriela Ojeda con el fin de aprobar la Asignatura Trabajo de Investigación; después de la exposición y discusión pública del citado trabajo, consideramos que el mismo reúne los requisitos para **APROBARLO** como tal. En fe de lo cual se levanta la presente acta, el día lunes trece del mes de noviembre del año dos mil veintitrés, dejando constancia de que, conforme a lo dispuesto por la normativa vigente, actuó como Coordinadora del jurado, la Tutora Metodológica Profesora Luisa Figueroa.

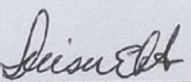
Por otra parte, se hace constar para efectos académicos de convalidación, que el presente trabajo representa el equivalente al Trabajo de Grado reconocido en otras instituciones y el contenido del veredicto es auténtico.



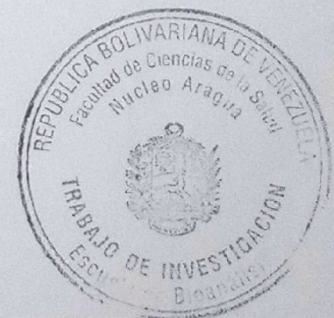
Prof. Franklin Pacheco
C.I.: 10489136
Tutor Científico



Prof. Marla Paredes
C.I.: 14.192.510
Jurado Evaluador



Prof. Luisa Figueroa
C.I.: 13492802
Coordinadora del Jurado



TI012-LF-2023



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



Maracay, Noviembre 2023

CONSTANCIA DE REVISIÓN Y ACEPTACIÓN DEL TUTOR CIENTÍFICO

En mi carácter de Tutor Científico del trabajo titulado: **BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE (CuNPs) Y SU EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE UNA CEPA DE *Staphylococcus aureus***; el cual es presentado por las bachilleres Montero Marialis, C.I.: 26.526.818 y Ojeda Gabriela, C.I.: 25.443.220, para aprobar la asignatura Trabajo de Investigación, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado.

Atentamente;

Prof. Franklin Pacheco Coello

C.I.: V-18.489.136

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mi ángel que está en el cielo, María Augusta Zambrano García, quien fue partícipe de todo el esfuerzo que significo llegar hasta aquí, por ser quien día tras día me acompañó durante mis horas de estudio y me brindaba su apoyo incondicional. Sé que este logro también es de ella y no me queda la menor duda que estaría muy orgullosa de verme materializar este gran sueño. Por supuesto que a mis padres, Dorys Guzmán y Pedro Juan Montero, porque durante estos largos años me brindaron compromiso, esfuerzo y dedicación para guiarme hacia mi futuro como profesional, son mis pilares fundamentales en cada meta que me propongo alcanzar.

Marialis Montero.

Dedicado a Dios y para mi Ángel guardián que desde el cielo, cubre, guía e ilumina todos mis pasos, mi abuelo materno Nicolás Carmona, gracias por seguir cumpliendo tu promesa, espero que a donde quieras que estés, te sientas orgulloso de tu niña. A mi Madre, siempre voy a ser tu mano derecha, Alexander Ochoa, eres fundamentales en mi vida, los amo.

Gabriela Ojeda.

AGRADECIMIENTO

A Dios todo poderoso por darme la sabiduría y el entendimiento en este largo camino.

A mis padres, Dorys Guzmán y Pedro Montero y hermano Pedro Montero, que han sido mi mayor motivación para cumplir esta meta tan anhelada, sin ellos esto un hubiese sido posible.

A todos mis familiares y amigos que siempre confiaron en mí y me apoyaron hasta el final de esta bonita historia. En especial a mi amiga Gabriela Ojeda por ser mi compañerita fiel durante todo este tiempo, por no dejarme sola y convertirse en mi hermana del alma, a la cual quiero con todo mi corazón. **Marialis Montero.**

Primeramente Gracias a Dios por darme salud, inteligencia, por permitirme cumplir esta anhelada meta, por escuchar los anhelos de mi corazón y hacerlos realidad y por hacerme parte de La Universidad de Carabobo. Por siempre gracias.

A mis padres Miriam Carmona y Alexis Sánchez, mi hermana Grecia Sánchez, y mi abuela María Álvarez por darme el apoyo, el amor, e inculcarme el valor del estudio y la disciplina que día a día me hacen mejor persona, por enseñarme la humildad y el respeto para lograr mis objetivos.

A Mi Novio Alexander Ochoa mi eterno amor inefable, por estar incondicionalmente a mi lado, no solo en cada momento de mi formación académica, si no en cada circunstancia de mi vida. Gracias a mi segunda familia Ochoa Pérez Hernández por su cariño, apoyo y comprensión.

A La universidad de Carabobo Sede Aragua, Laboratorio de metales pesados, Al profesor Franklin Pacheco Coello por ser principal guía en nuestra formación académica.

A mis compañeros que compartimos día a día para lograr un fin común, en especial a mi amiga Marialis Montero por cada risa, comida, guía y dibujo que hicimos para estudiar y lograr nuestra meta. Gracias por convertir nuestra amistad en Hermandad. **Gabriela Ojeda.**

INDICE GENERAL

	Pp
CARTA DEL TUTOR ACADÉMICO.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE GRAFICOS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
MATERIALES Y METODOS.....	6
TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	6
MUESTRA BIOLÓGICA.....	6
MATERIAL VEGETAL.....	6
PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Hibiscus sabdariffa</i>	6
DETERMINACIÓN DEL PERFIL FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Hibiscus sabdariffa</i> POR (HPLC).....	6
OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE COBRE (CuNPs).....	7

DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO Y MORFOLOGÍA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE COBRE POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).....	7
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS CuNPs, SOBRE UNA CEPA DE <i>Staphylococcus aureus</i>.....	8
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS CuNPs, SOBRE LA CAPACIDAD HEMOLÍTICA DE <i>Staphylococcus aureus</i>.....	9
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	9
RESULTADOS.....	10
DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	19
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

Lista de Cuadros

Contenido	Pp
1. Identificación y concentración de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas presentes en el extracto acuoso de <i>H. sabdariffa</i>	8
2. Optimización de la síntesis de nanopartículas de cobre (CuNPs).....	9

Lista de Figura

Contenido	Pp
1. Plasmón superficial de las nanopartículas de cobre (CuNPs).....	10
2. Tamaño y morfología de las nanopartículas de cobre (CuNPs) obtenidas por síntesis verde verde.....	11
3. Efecto de las nanopartículas de cobre (CuNPs) sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
4. Efecto de las nanopartículas de cobre (CuNPs), sobre la actividad hemolítica de <i>S. aureus</i>	13
5. Esquematización de la estabilización de las nanopartículas de cobre por biomoléculas tipo flavonoides.....	14



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
SEDE ARAGUA



BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE (NPsCu) Y SU EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE UNA CEPA DE *Staphylococcus aureus*

Bachilleres: Montero Marialis
Ojeda Gabriela

Tutor científico: Prof. Franklin Pacheco Coello

Tutora Metodológica: Profa.: Luisa Elena Figueroa

RESUMEN

La síntesis de nanopartículas metálicas de cobre (NPsCu) a partir de plantas constituye un área de gran interés y crecientes avances, que devela el potencial de nuevas nanoestructuras para diferentes fines con actividad antimicrobiana. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano de las NPsCu obtenidas a partir de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* Linn, sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. En cuanto a la optimización de las nanopartículas de cobre, teniendo en cuenta factores óptimos para su síntesis, como la diferentes concentraciones de sulfato de cobre (0,4; 0,8; 1,2 mM), y la relación de volumen de sal sulfato de cobre. Se utilizó las técnicas de caracterización como lo son cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Así como también el uso de una suspensión de glóbulos rojos al 5%, para determinar el MIC de la actividad hemolítica del *Staphylococcus aureus* con respecto al control. Las CuNPs presentaron un tamaño de 36 nm y una morfología esférica con ciertos agregados. Se observó inhibición de la proliferación, con una concentración mínima inhibitoria cercana a 0,8 mg/mL. Cabe resaltar que las CuNPs demostraron reducción del porcentaje de hemólisis con las concentraciones empleadas por debajo del MIC. Por ende debido a lo antes mencionado es importante crear y apostar por nuevas opciones terapéuticas que puedan ser eficaces contra los microorganismos patógenos, por tanto la biosíntesis de CuNPs y la evaluación de sus efectos en uno de los microorganismos más importantes a nivel clínico, como el *Staphylococcus aureus*, constituye un aporte en la búsqueda de nuevas terapias antimicrobianas.

Palabras clave: Cobre, nanopartículas, nanomateriales, actividad antimicrobiana, aplicaciones biomédicas.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
SEDE ARAGUA



BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE (NPsCu) Y SU EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE UNA CEPA DE *Staphylococcus aureus*

Bachilleres: Montero Marialis
Ojeda Gabriela

Tutor científico: Prof. Franklin Pacheco Coello.

Tutora Metodológica: Profa.: Luisa E. Figueroa A.

ABSTRACT

The synthesis of metallic copper nanoparticles (NPsCu) from plants is an area of great interest and growing progress, which reveals the potential of new nanostructures for different purposes with antimicrobial activity. The objective of the research was to evaluate the antimicrobial effect of CuNPs obtained from an extract of *Hibiscus sabdariffa* Linn, on a strain of *Staphylococcus aureus*. Regarding the optimization of copper nanoparticles, taking into account optimal factors for their synthesis, such as the different concentrations of copper sulfate (0.4; 0.8; 1.2 mM), and the salt volume ratio. Characterization techniques such as high efficiency liquid chromatography (HPLC) and scanning electron microscopy (SEM) were used. As well as the use of a 5% suspension of red blood cells, to determine the MIC of the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* with respect to the control. The CuNPs had a size of 36 nm and a spherical morphology with certain aggregates. Inhibition of proliferation was observed, with a minimum inhibitory concentration close to 0.8 mg/mL. It should be noted that the CuNPs demonstrated a reduction in the percentage of hemolysis with the concentrations used below the MIC. Therefore, due to the aforementioned, it is important to create and bet on new therapeutic options that can be effective against pathogenic microorganisms, therefore the biosynthesis of CuNPs and the evaluation of its effects on one of the most important microorganisms at the clinical level, such as *Staphylococcus aureus* constitutes a contribution in the search for new antimicrobial therapies.

Keywords: Copper, nanoparticles, nanomaterials, antimicrobial activity, biomedical applications.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las enfermedades infecciosas han constituido una de las primeras causas de morbilidad en países subdesarrollados, por lo que el tratamiento adecuado y oportuno de las mismas tendrá un impacto favorable en los indicadores de salud. Uno de los principales microorganismos causante de una gran variedad de infecciones es el *Staphylococcus aureus*, el cual es un importante patógeno humano bacteriano que causa una amplia variedad de manifestaciones o enfermedades (Neumonía, Endocarditis infecciosa, Sepsis, Infección en tejidos blando, entre otros), que pueden ser adquiridas tanto en entornos comunes (en crecimiento) como hospitalarios (más frecuente) (Cueto y Pascual, 2009).

Esta bacteria se clasifica como cocos Gram positivos que generalmente crecen en racimos irregulares parecidos a racimos de uvas, porque las células se dividen sucesivamente en tres planos perpendiculares. Cabe destacar que crecen con rapidez sobre muchos tipos de medios y son metabólicamente activos, por lo que fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían de blanco hasta amarillo intenso. Con la estructura bacteriana el *S. aureus* presenta una pared celular diseñada para mantener la estructura de la célula, además de conferir resistencia, rigidez estructural y protección contra posibles daños mecánicos o ruptura osmótica que comprometan la viabilidad celular (Schneewind, 2014).

Los *Staphylococcus* patógenos casi siempre causan hemólisis y coagulación del plasma y con ello la producción de varias enzimas y toxinas extracelulares. Es importante señalar que los genes responsables de la virulencia y de la resistencia a los antimicrobianos son los Elementos Genéticos Móviles, estos son fragmentos de ADN que pueden replicarse por sí mismos y ser transferidos entre las cepas y entre diferentes especies

(Hurtado et al., 2004; Lindsay y Malachowa, 2010). De ahí que estos microorganismos desarrollan con rapidez resistencia a los antimicrobianos lo que presenta un problema terapéutico difícil, Jawetz, 2004.

Motivado entonces a la resistencia antimicrobiana, han surgido disciplinas como la nanotecnología la cual ha desarrollado y evaluado una diversidad de nanomateriales con capacidad antimicrobiana. Entre estos nanomateriales destacan las nanopartículas de cobre (NPsCu), las cuales se han evidenciado que originan daños significativos en la pared celular, además de la alteración de los procesos celulares vitales, dando como resultado la inhibición del crecimiento microbiano (Maneerung et al., 2008; Ramyadevi, 2012; Ruparelia, 2008; Hajipour, 2012; Choi, 2008).

De acuerdo con lo mencionado, ciertas investigaciones confirman que el efecto de las Nanopartículas sobre patógenos como bacterias, virus y hongos, los convierte en potenciales antimicrobianos, por lo que recientemente han sido considerados como la nueva generación de agentes bactericidas. (Rosenthal, 2010).

Figueroa y Calderón (2019), investigaron la Síntesis de nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de hojas de *Eucalyptus robusta* Sm. y evaluaron su actividad antimicrobiana, los cuales determinaron que las NPsFe exhibieron actividad antimicrobiana frente a los diversos microorganismos ensayados tales como: *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, encontrándose una relación estrecha entre las condiciones de síntesis y la actividad antimicrobiana.

En este mismo orden de ideas, Archana y Rohit (2021), realizaron una investigación sobre Actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica de nanopartículas de cobre sintetizado con verde de *Partenio hysterophorus* L. Concluyendo que las nanopartículas de cobre son una buena fuente de

agentes terapéuticos y sus aplicaciones pueden conducir a descubrimientos valiosos en varios campos, como dispositivos médicos y sistemas antimicrobianos.

Muchas de las tecnologías aplicadas para este fin, están basadas en procesos físicos y químicos, que presentan desventajas no sólo desde el punto de vista económico (altos costos), o tecnológico (necesidad de equipamiento especializado), sino también daño ambiental por el requerimiento del uso de solventes orgánicos de elevada toxicidad y otros compuestos químicos de alta agresividad (Albrecht et al., 2006).

Es por ello que en la actualidad los esfuerzos tecnológicos están basados en métodos biológicos, los cuales son más factibles y amigables con el medio ambiente, donde se requiere el uso de plantas, metabolitos, extractos vegetales, células y tejidos, para la síntesis de NPs (Pradeep-Anshup, 2009; Morales-Díaz, 2016).

Al mismo tiempo, la síntesis verde requiere de plantas que tengan la capacidad reductora y que también posean sustancias fitoquímicas (como antocianinas y flavonoides) que procuren contribuir o potenciar a la acción antimicrobiana de las NPs. Haciendo mención en esta investigación utilizamos como material orgánico la *Hibiscus sabdariffa*, conocida comúnmente como Flor de Jamaica, teniendo en cuenta que la síntesis verde de NPs_{Cu}, se dará por una reacción redox donde los compuestos bioactivos aporten electrones a los cationes de los metales llevándolos a una forma con carga cero y de escala nanométrica (Morales-Díaz, 2016).

En este sentido, de acuerdo con todo lo antes expuesto y tomando en cuenta el aumento de la farmacorresistencia por parte de los agentes bacterianos, es conveniente la síntesis de nuevos nanomateriales que puedan ser implementados como tratamientos con efectos antibacterianos, para tratar las enfermedades de manera eficaz y segura debido a esto en el

presente trabajo se Evaluó el efecto antimicrobiano de Nanopartículas de Cobre obtenidas a partir de un extracto de *Hibiscus sabdariffa* Linn. Teniendo en cuenta el aprovechamiento de sus diferentes propiedades, se busca generar tratamientos equivalentes o incluso más efectivos que los actuales antibióticos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano de las Nanopartículas de Cobre (CuNPs) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el perfil fitoquímico del extracto acuso de *Hibiscus sabdariffa*.
2. Optimizar las condiciones de síntesis de las nanopartículas de cobre.
3. Determinar el tamaño y morfología de las nanopartículas de cobre.
4. Determinar el efecto de las nanopartículas de cobre sobre la proliferación y capacidad hemolítica de una cepa de *Staphylococcus aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de investigación:

Se realizó un estudio de tipo descriptivo-experimental, en el cual se determinó el efecto antimicrobiano de las diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sintetizadas (CuNPs) a partir de un extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa*, sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*.

Muestra biológica:

Para determinar el efecto antibacterial se empleó una cepa bacteriana certificada de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, proporcionada por el Laboratorio de Bioquímica Farmacológica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco Triana Alonso” (BIOMED-UC).

Material vegetal:

Se contó con cálices deshidratados de *H. sabdariffa*, los cuales se obtuvieron de un cultivo orgánico. La cosecha se llevó a cabo en la casa del investigador. Terrenos propios ubicados en el sector El Limón y El Castaño, estado Aragua, Venezuela (octubre 2019-marzo 2020).

Preparación del extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa*.

Los extractos se prepararon pesando 5 g de cálices secos, que fueron colocados en un beaker con 100 mL de agua destilada. Se colocaron en una plancha de calentamiento a 90 grados por 15 min. Se preparó el extracto del material vegetal por decantación. Por último, la solución se filtró con papel Whatman No. 4 (Reyes-Luengas et al., 2015).

Determinación del perfil fitoquímico del extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa*, por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Se empleó un cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard HP1100 equipado con bomba cuaternaria, equipo de termostatación de columnas, muestreador automático y detector. La separación cromatográfica se desarrolló con una columna RP18 Pecosphere (Perkin Elmer- BrownLee Columns) de 83mm x 4,6mm. La detección se llevó a cabo a 280 nm y a una temperatura de 25°C para el muestreador y el equipo de termostatación de la columna. La velocidad de flujo fue de 0,45 mL/min. Finalmente se inyectaron 20 mL del extracto y se emplearon los patrones correspondientes para la cuantificación e identificación (Borrás-Linares et al., 2015).

Optimización de la síntesis de las nanopartículas de cobre (CuNPs)

Las condiciones para obtener el mejor rendimiento de síntesis de las CuNPs fueron: concentración de sulfato de cobre (0,4; 0,8; 1,2 mM), relación de volumen de sal y extracto acuoso (1:1, 1:2 y 2:1), manteniendo el pH (5), y la temperatura de reacción constante (50 °C).

La formación de las nanopartículas fue determinada mediante espectrofotometría UV-VIS (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU), realizando un barrido espectral de cada síntesis obtenida, en un rango de longitudes de onda de 250 a 750 nm, con una máxima de absorción a 540 nm, lo cual indica la formación de las nanopartículas. Para el análisis de las nanopartículas, se tomaron 2 ml de cada síntesis y se diluyó con agua destilada hasta un volumen final de 4 ml. Se colocó 1 mL de la dilución anterior en una celda de 1 cm de camino óptico y se realizó el barrido espectral (Rodríguez-León, et al., 2013; Kannan, et al., 2013).

Determinación del tamaño y morfología de las nanopartículas de cobre por microscopía electrónica de barrido (MEB).

La morfología y tamaño de las CuNPs sintetizadas se analizó utilizando el equipo JEOL/EO JSM-5600 SEM a 200 µm, 10 µm y 2 µm. Las

películas delgadas de la muestra se prepararon en una rejilla de cobre recubierta con carbón dejando caer 20–50 μL de muestra en la rejilla y luego se observaron bajo el analizador. El material extraño se limpió con papel de seda y luego se dejó secar bajo una lámpara de mercurio durante 4 a 5 minutos (Pant., 2013).

Evaluación de la actividad antibacteriana de las CuNPs, sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*

Para iniciar los estudios de crecimiento bacteriano de la cepa de *S. aureus*, se procedió a su cultivo en condiciones aeróbicas a 37 °C con agitación constante (250 rpm), durante 24 horas (Pre-inóculo) en 30 mL de medio líquido Luria-Bertani (LB); este es un medio rico en nutrientes que consta de: triptona 1%, extracto de levadura 0,5 % y NaCl 1% (el pH fué ajustado a 7 con NaOH).

Posteriormente, a partir de este pre-inóculo, se determinó la cantidad necesaria para inocular 0,05 U/mL de densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) en el cultivo utilizado para la curva de crecimiento (Maneerung, et al., 2008). De esta manera, cada ensayo de la curva de crecimiento se inició con la misma cantidad de bacterias en el medio de cultivo LB.

El efecto de las nanopartículas sobre el crecimiento bacteriano, se determinó en ausencia (control) y en presencia de diferentes concentraciones de CuNPs (0,2-0,4-0,6-0,8 y 1 mg/mL). En una placa de 96 pocillos de fondo en U se colocó 2 μL de las soluciones correspondientes a las nanopartículas y 198 μL de cultivo de bacterias. En todos los ensayos se empleó un control de crecimiento. Seguidamente, el crecimiento bacteriano se determinó mediante la D_{600} para cada concentración de las diferentes concentraciones cada 60 minutos hasta por 6 horas. Finalmente se graficaron las lecturas de DO_{600} en función de las diferentes concentraciones

utilizadas.

Evaluación del efecto de las CuNPs, sobre la capacidad hemolítica de *Staphylococcus aureus*

Se utilizaron ensayos de hemólisis para determinar el efecto inhibitorio del de las CuNPs sobre la liberación de alfa-hemolisina, para ello seleccionando tres concentraciones por debajo de la concentración mínima inhibitoria (MIC). Las bacterias se cultivaron en TSB a 37°C con agitación a 220 r.p.m. y se añadieron al medio de cultivo diferentes concentraciones de CuNPs (0,2-0,4-0,6 mg/mL). Después de 16 h, las bacterias se recogieron de los cultivos y se ajustaron a la misma DO (DO600 nm = 2,5). Las muestras bacterianas (1mL) se centrifugaron (5500 rpm, 4 °C, 1 min), los sobrenadantes resultantes se filtraron con un filtro Whatman número 4 y 0,1 ml de sobrenadante se llevó hasta 975 µL con NaCl. Después de la incubación con 25 µl de una suspensión de glóbulos rojos durante 1 h 37 °C, las muestras se centrifugaron (5500 rpm, temperatura ambiente, 1 min) y se midió la DO de los sobrenadantes a 600 nm. Se usó Triton X-100 como control positivo y se usó cloruro de sodio (NaCl 0,95%) como control negativo o de baja hemólisis. Cada prueba se realizó de forma independiente por triplicado (Duran, et al., 2018).

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se determinaron mediante análisis de varianza. (ANOVA) usando Statistic 9.0 para Windows. Por su parte los valores se expresaron como media ± desviación estándar.

RESULTADOS

1. Perfil fitoquímico del extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa*

Obtenido el extracto acuoso de *H. sabdariffa* se procedió a la identificación y determinación de la concentración de las biomoléculas presentes en dicho extracto, arrojando un alto contenido de flavonoides y antocianinas (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación y concentración de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas presentes en el extracto acuoso de *H. sabdariffa*

BIOMOLÉCULAS	CONCENTRACIÓN (mg/ml)
• Ácidos Fenólicos	
Gálico	2,33±0,11
Caféico	0,87±0,05
Rosmarínico	0,43±0,09
• Flavonoides	
Epicatequina	6,54±0,01
Rutina	4,34±0,02
Vanilina	3,45±0,06
Quercetina	13,27±0,10
• Antocianinas	
Cianidina-3glucósido	12,37±0,06
Pelargonidin-3glucósido	10,40±0,01
Peonidina-3glucósido	9,32 ±0,11

Valores expresados en media y desviación estándar

2. Optimización de la síntesis de nanopartículas de cobre (CuNPs)

Para la optimización de la síntesis de nanopartículas se emplearon tres concentraciones de sulfato de cobre y tres relaciones de volúmenes de sal y el extracto acuoso de *H. sabdariffa* (Tabla 1). Para todas las combinaciones empleadas se pudo lograr la síntesis de las CuNPs, evidenciándose por medio del plasmón superficial, a través de un espectro de absorción UV/Visible, presentando un máximo de absorción a 550 nm (Figura 1). El volumen de sal de sulfato y de extracto acuoso para los ensayos posteriores fue de 5 ml cada uno (relación 1:1).

Tabla 2. Optimización de la síntesis de nanopartículas de cobre (CuNPs)

pH	Concentración CuSO ₄ mM	Temperatura °C	Relación volumen
	* <u>0,4</u>		* <u>1/1</u>
5	0,8	50	2/1
	1,2		½

***Nota: concentración y relación óptima para la síntesis.**

Fuente: Investigadores (2023)

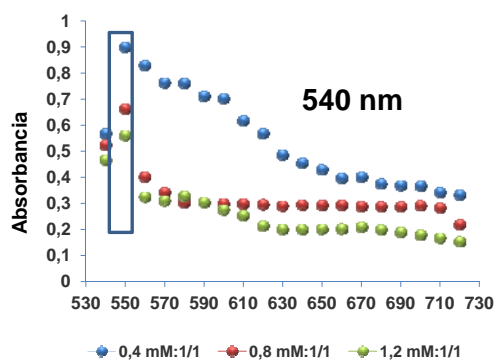


Figura 1. Plasmón superficial de las nanopartículas de cobre (CuNPs)

3. Tamaño y morfología de las nanopartículas de cobre (CuNPs) por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para determinar el tamaño y la morfología de las CuNPs se utilizó Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). En este sentido se observó que las mismas presentan un tamaño de 36 nm (tamaño predominante) observándose otras de mayor tamaño (40 nm) (Figura 2). Esto permitió certificar la síntesis de las CuNPs empleando las condiciones antes mencionadas.

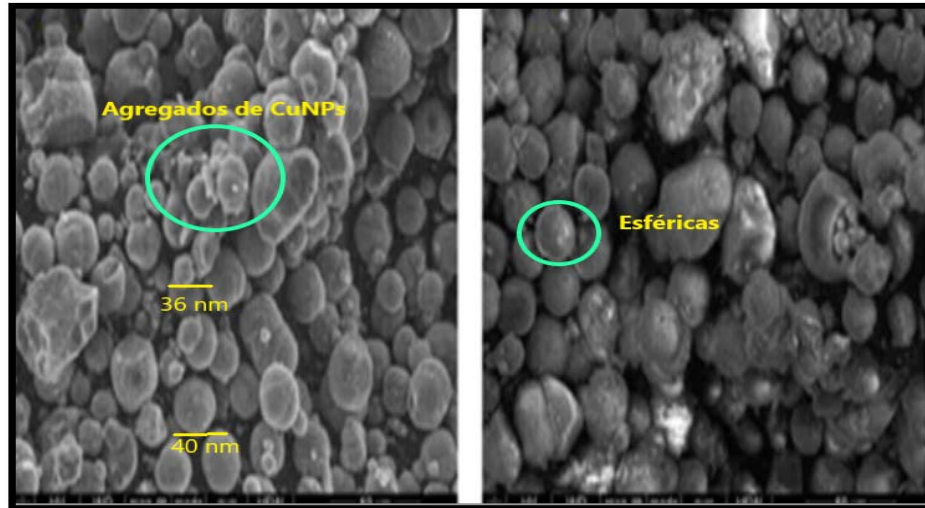


Figura 2. Tamaño y morfología de las nanopartículas de cobre (CuNPs) obtenidas por síntesis verde.

4. Evaluar el efecto de las nanopartículas de cobre (CuNPs) sobre la proliferación y capacidad hemolítica de una cepa de *Staphylococcus aureus*.

En la evaluación del efecto de las CuNPs sobre la proliferación de *S. aureus*, se observó inhibición del crecimiento en todas las concentraciones ensayadas (Figura 3A). Al graficar el porcentaje de proliferación se evidencia que este es dependiente de la concentración, (Figura 3B). La lectura de la densidad óptica (DO) a las 24 h permitió establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI), cercana a 0,8 mg/ml (concentración más baja que redujo el crecimiento hasta una densidad óptica de 0,2 o menos) (Tabla 3).

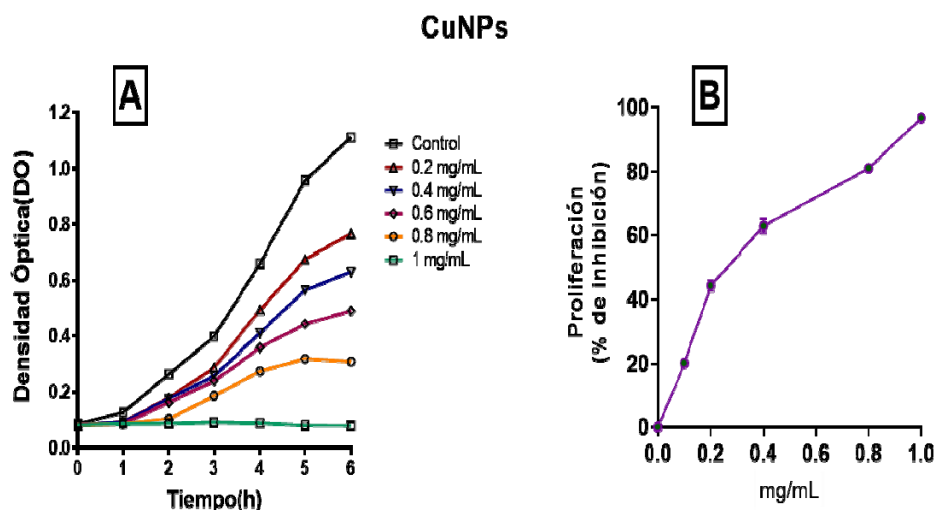


Figura 3. Efecto de las nanopartículas de cobre (CuNPs) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Tabla 3. Efecto de las CuNPs sobre la proliferación *Staphylococcus aureus* a 24 h de incubación

CuNPs (mg/ml)	D.O (Media±DS)
0,2	1,1523±0,13
0,4	0,9453±0,09
0,6	0,8354±0,17
0,8*	0,2053±0,12
1	0,0321±0,01

* Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Respecto al efecto hemolítico que origina *S. aureus* se observó que las concentraciones ensayadas inhiben dicho efecto, resultado estadísticamente significativo ($p < 0,01$) comparada con el control de hemólisis total inducida con tritón (Figura 4).

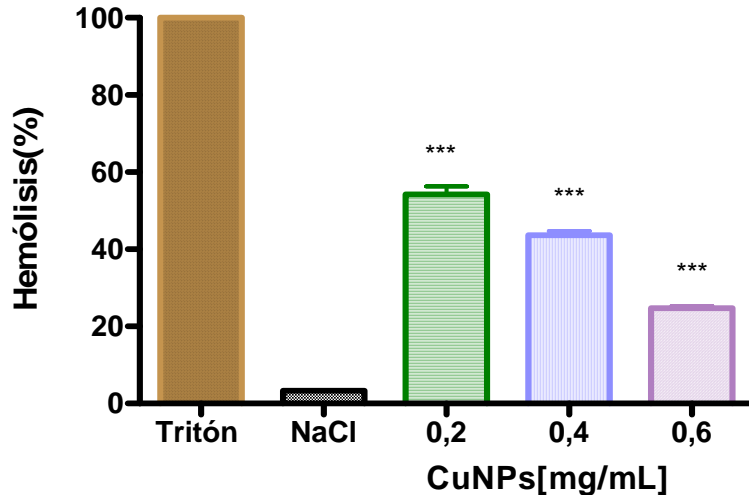


Figura 4. Efecto de las nanopartículas de cobre (CuNPs), sobre la actividad hemolítica de *S. aureus*

DISCUSIÓN

La síntesis verde de las nanopartículas de cobre (CuNPs) ha originado un gran interés durante las dos últimas décadas gracias a sus características y excelentes propiedades tanto físicas como químicas, producto del tamaño nanométrico, la morfología de la superficie y el área superficial. Las nuevas tendencias en la síntesis de nanomateriales está enfocada en la “síntesis verde”, es decir, en el uso de productos naturales entre ellos *Hibiscus sadariffa*, que de acuerdo a lo reportado por Nahuatt, et al., 2020; Santos, et al., 2022), posee un alto contenido en flavonoides y antocianinas.

Con respecto a la optimización de la síntesis de las CuNPs se observó que empleando todas las concentraciones de sulfato de cobre (Cu_2SO_4) y de relación de volumen sal-extracto acuoso, se obtuvieron las mismas, esto atribuido al efecto que ejercen las biomoléculas de mayor presencia en *Hibiscus sabdariffa* (flavonoides y antocianinas), capaces de reducir el metal y originar la formación de las CuNPs, contribuyendo al mismo tiempo a su estabilización por medio interacciones tipo Van der Waals (Jayandran et al.,

2016). Así mismo la formación de las CuNPs se evidenció por medio del plasmón superficial, obtenido por el barrido espectral, el cual coincide con lo reportado por diversas investigaciones las cuales señalan que el máximo de absorción de estas CuNPs está alrededor de los 540 nm (Antonio, 2019).

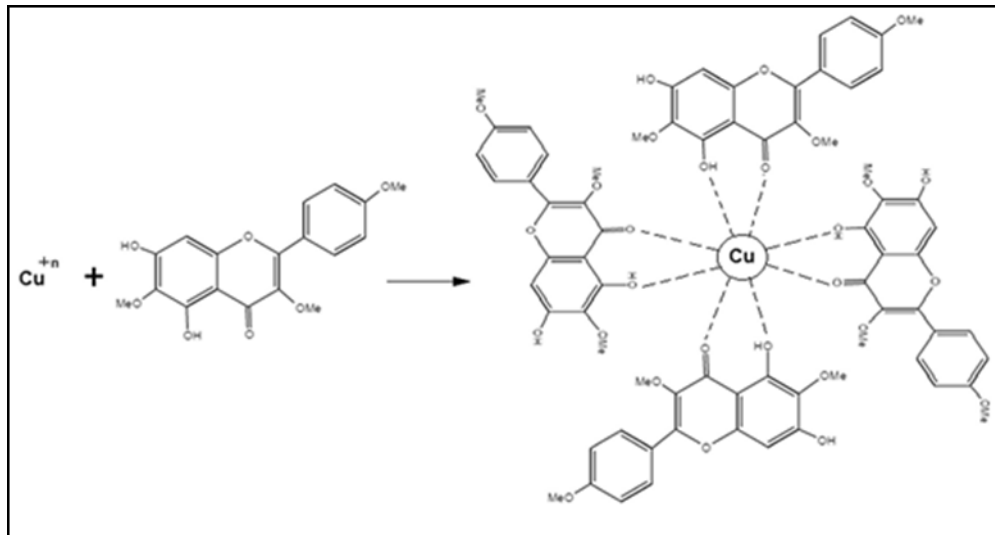


Figura 5. Esquematización de la estabilización de las nanopartículas de cobre por biomoléculas tipo flavonoides.

Si bien el plasmón superficial proporciona información valiosa relacionada a la formación de las CuNPs, es importante conocer el tamaño exacto y la morfología de estas CuNPs, puesto que estas dos variables desempeñan un rol fundamental en el efecto antimicrobiano. La técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), arrojó que las CuNPs presentaron un tamaño de 36 nm, con una morfología esférica, las cuales resultaron ser de menor tamaño, comparadas por lo reportado por Duxtan et al., (2021), cuyas CuNPs sintetizadas por el método poliol asistido vía microondas presentaron un tamaño de 44 nm, cuya diferencia podrían ser atribuida a que estas CuNPs fueron sintetizada por ruta química.

Las NPs metálicas han demostrado poseer propiedades bacteriostáticas y bactericidas asociadas con un incremento en el área de contacto,

aumentando sus actividades físicas y químicas, siendo consideradas como los nuevos agentes antimicrobianos de nueva generación (Seil y Webster, 2012). En este sentido la evaluación del efecto antimicrobiano de las NPs, arrojó que para el todo el rango de concentraciones hubo inhibición de la proliferación con una concentración mínima inhibitoria (MIC) cercana a 0,8 mg/mL. Esto coincide con lo reportado por Ijjatdar, et al., 2022, quienes evaluaron la eficiencia antimicrobiana de las CuNPs obtenidas con *Allium sativum* leaf sobre diversos patógenos entre ellos *S. aureus*. Sin embargo la concentración mínima inhibitoria obtenida por estos investigadores estuvo cercana a 1 mg/mL, lo que podría atribuirse al mayor tamaño de las CuNPs (44nm).

Por otra parte se conoce que *S. aureus* puede producir una variedad de factores de virulencia, incluyendo toxinas hemolíticas, enterotoxina, coagulasa, enzimas proteolíticas y leucotoxina. La hemolisina tiene una fuerte patogenicidad y su los tipos principales incluyen alfa-hemolisina, beta-hemolisina, gamma-hemolisina y delta-hemolisina. De acuerdo a los resultados las CuNPs redujeron de modo significativo la liberación de la hemolisina en las concentraciones ensayadas (por debajo del MIC), que se ve reflejada en la disminución de la hemólisis celular.

Respecto a los estudios relacionados con la inhibición de la liberación de hemolisina por parte de *S. aureus*, empleando NPs de cualquier metal, no hay reportes hasta la fecha, sin embargo, hay evidencias científicas que indican la capacidad de biomoléculas tipo flavonoides capaces de afectar la actividad hemolítica de esta bacteria (Duan et al., 2018). En este sentido estudios aun no publicados por (Coello et al., 2022) indican que el extracto de *Hibiscus sabdariffa* afecta dicha actividad hemolítica. Es de resaltar que esta fue la planta empleada para la síntesis de las CuNPs.

En cuanto a lo antes mencionado es importante crear y apostar por nuevas opciones terapéuticas que puedan ser eficaces contra los microorganismos patógenos, por tanto la biosíntesis de nanopartículas de cobre (CuNPs) y evaluar sus efectos sobre uno de los microorganismos más importantes a nivel clínico, como lo es *Staphylococcus aureus*, constituye un aporte en la búsqueda de nuevos antimicrobianos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- En relación al perfil fitoquímico del extracto empleado en la síntesis de nanopartículas de cobre, se evidenció la presencia de diversos compuestos con predominio flavonoides, específicamente quercetina y las antocianinas.
- Se observó inhibición en el crecimiento en todo el rango de concentraciones, siendo la concentración mínima inhibitoria cercano a 0,8 mg/ml.
- El efecto antimicrobiano de las CuNPs está en relación al tamaño y morfología lo que incrementa la superficie de contacto.
- En la evaluación antihemolítica de las CUNPs frente a *Staphylococcus aureus*, se evidenció una disminución de la hemólisis celular en las tres concentraciones con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

Recomendaciones

- Realizar síntesis de nanopartículas a partir de otros metales, ya sea oro, plata entre otros, y así mismo emplear la Síntesis verde en el uso de otro tipo de material Vegetal.
- Evaluar el posible efecto antimicrobiano de diversas nanopartículas, en muestras biológicas de microorganismos como *Escherichia coli*, *Pseudomona spp.* *Klebsiella spp.*

- Evaluar el efecto de las posibles combinaciones entre las nanopartículas de cobre u otras con antibióticos de uso convencional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antonio, R. T. G. (2019, agosto 1) Síntesis verde de nanopartículas de Ag, Au, Cu₂O y preparación convencional de nanoestructuras de Cu, Cu₂O y CuO en diferentes morfologías para la evaluación de sus propiedades catalíticas y ópticas. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1334
- Albrecht, M. A., Evans, C. W. & Raston, C. L. (2006). Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chemistry*, 8(5), 417. <https://doi.org/10.1039/b517131h>
- Archana y Rohit (2021), realizaron una investigación sobre Actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica de nanopartículas de cobre sintetizado con verde de *Partenio hysterophorus L.*.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Román, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J. F., & Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385-394. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.053>
- Bhakdi, S., & Tranum-Jensen, J. (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological reviews*, 55(4), 733-751. <https://doi.org/10.1128/mr.55.4.733-751.1991>
- Choi, O., Deng, K. K., Kim, N. J., Ross, L., Jr, Surampalli, R. Y., & Hu, Z. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water research*, 42(12), 3066–3074. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.021>
- Coello, F. J. P., Fraile, G., & Velásquez, M. (2022). Efectos de las combinaciones binarias de ciprofloxacina con quercetina y un extracto acuoso de *hibiscus sabdariffa* sobre una cepa de *staphylococcus aureus*. Congreso LatinXchem2022. ResearchGate, Página 114. https://www.researchgate.net/publication/365780767_Congreso_LatinXchem_2022

- Cueto M, Pascual A. (2009). Microbiología y Patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. En: Pahissa A, Soler H, Soto A, Matos L, Serrano E, Roig MA editores. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1a ed. Barcelona (España): Marge Books ed.; 15- 29.
- Duran, J., Li, M., Hao, Z., Shen, X., Liu, L., Jin, Y., Wang, S., Guo, Y., Yang, L., Wang, L., & Yu, F. (2018). Subinhibitory concentrations of resveratrol reduce alpha-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates by downregulating *saeRS*. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0142-x>
- Duxtán, A. J. G., Maraví, J. C. R., & Muñoz, J. M. E. (2021). síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre (NPs Cu) por el método poliol asistido vía microondas (MW). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(4), 412-427. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v86i4.311>
- Figueroa y Calderón (2019), investigaron la Síntesis de nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de hojas de *Eucalyptus robusta Sm.* y evaluó su actividad antimicrobiana”, los cuales hallaron que las NPsFe.
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., Jimenez de Aberasturi, D., de Larramendi, I. R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J., & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 30(10), 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
- Hurtado, L. A., Lutz, R. A., & Vrijenhoek, R. C. (2004). Distinct patterns of genetic differentiation among annelids of eastern Pacific hydrothermal vents. *Molecular ecology*, 13(9), 2603–2615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02287.x>
- (Hurtado et al., 2004; Lindsay y Malachowa, 2010).
- Jayandran, M., Haneefa, M. M., & Balasubramanian, V. (2016). Green Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity Studies of Curcuminaniline Biofunctionalized Copper Oxide Nanoparticles. *Indian journal of science and technology*, 9(3). <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i3/80523>
- Jawetz. Melnick. Alderberg. (2004). *Microbiología Médica* (25 Ed). México D.F. The McGraw-Hill.

- Kannan, R.R.R., Stirk, W.A., Van Staden, J. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Codium capitatum* P. C. Silva (Chlorophyceae), *South African Journal of Botany*, 86, 1-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.01.003>
- Kasithevar, M., Saravanan, M., Prakash, P., Kumar, H., Ovais, M., Barabadi, H., & Shinwari, Z. K. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using *Alysicarpus monilifer* leaf extract and its antibacterial activity against MRSA and CoNS isolates in HIV patients. *Journal of Interdisciplinary Nanomedicine*, 2(2), 131-141. <https://doi.org/10.1002/jin2.26>
- Maneerung, T., Tokura, S. & Rujiravanit, R. (2008). Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 72(1), 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.025>
- Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2011). *Staphylococcus aureus* survival in human blood. *Virulence*, 2(6), 567–569. <https://doi.org/10.4161/viru.2.6.17732>
- Marinova, D., Ribarova, F., & Atanassova, M. (2004). total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40, 255-260.
- Morales-Díaz, América Berenice, Juárez-Maldonado, Antonio, Morelos-Moreno, Álvaro, González-Morales, Susana, & Benavides-Mendoza, Adalberto. (2016). Biofabricación de nanopartículas de metales usando células vegetales o extractos de plantas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(5), 1211-1224. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263146723020> [Consultado el 18 de Mayo de 2022]
- Nahuatt, G. L., Martinez, M. T. S., Ruiz, E. I. J., Herrera, L. M. S., Rosales, P. U. B., Carrillo, R. E. M., & Ceferino, J. H. (2020). En prensa actividad hemolítica, antimicrobiana y antioxidante de extractos acuosos de cálices de jamaica en PRENSA. *Revista biociencias*, 7. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e995>
- Ijjatdar, S., Gaherwal, S., & Prakash, M. M. (2022). Antimicrobial efficiency of garlic (*Allium sativum*) Leaf derived copper nanoparticles against pathogenic bacteria. *GSC biological and pharmaceutical sciences*, 18(3), 063-072. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2022.18.3.0088>

- Pant, M. G. A. G. J. N. (2013). Biological evaluation and green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of calotropis procera. International journal of pharma and bio sciences. http://www.ijpbs.net/cms/php/upload/2753_pdf.pdf
- Pradeep, T. & Anshup. (2009). Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review. Thin Solid Films, 517(24), 6441-6478. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2009.03.195>
- Ramirez, L. S. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Redalyc.org. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>
- Rangel, D., B, D. B., García, I., Carrillo, J. V., & Velazco, E. (2005). Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de Baccharis nitida (Ruiz et Pavon) Pers. revista de la facultad de farmacia vol. 42.
- Ramyadevi, J., Jeyasubramanian, K., Marikani, A., Rajakumar, G. & Rahuman, A. A. (2012). Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. Materials Letters, 71, 114-116. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.12.055>
- Reyes-Luengas, A., Salinas-Moreno, Y., Ovando-Cruz, M.E., Arteaga-Garibay, R.I., & Martínez-Peña, M.D. (2015). Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) con cálices de colores diversos. Agrociencia, 49, 277-290.
- Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C., Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (Rumex hymenosepalus extracts), Nanoscale Research Letters, 8(1), 318. DOI: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-318>
- Rosenthal, V. D., Bat-Erdene, I., Gupta, D., Belkebir, S., Rajhans, P., Zand, F., Myatra, S. N., Afeef, M., Tanzi, V. L., Muralidharan, S., Gurskis, V., Al-Abdely, H. M., El-Kholy, A., AlKhawaja, S. A. A., Sen, S., Mehta, Y., Rai, V., Hung, N. V., Sayed, A. F., . . . Anh, D. (2020). International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 45 countries for 2012-2017: Device-associated module. American Journal of Infection Control, 48(4), 423-432. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.08.023>

- Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., & Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta biomaterialia*, 4(3), 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.11.006>
- Santos, E. M., Sanchez-Ortega, I., Lorenzo, J. M., Domínguez, R., Munekata, P. E., Falfan-Cortes, R. N., Ibarra, I. S., & Rangel-Vargas, E. (2022). Use of Hibiscus sabdariffa Calyxes in Meat Products. *Frontiers in animal science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fanim.2022.876042>
- Sarkar, D., & Paul, G. (2017). Green Synthesis of Silver Nanoparticles using Mentha asiatica (Mint) Extract and Evaluation of their Antimicrobial Potential. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 4(1), 77-82. <https://doi.org/10.20546/ijcrbp.2017.401.009>
- Seil, J. T., & Webster, T. J. (2012). Antibacterial effect of zinc oxide nanoparticles combined with ultrasound. *Nanotechnology*, 23(49), 495101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/49/495101>
- Singleton, V. L. (1965, 1 enero). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., Swallow, K., & Wichers, H. J. (2000). Determination of total antioxidant activity (TAA) in foodstuff using an easy and fast test to compare a wide range of samples. In 10th Symposium of the ALW-Discussion Group on Secondary Metabolism in Plant and Plant Cell, 11 February, at Free University Amsterdam (Netherlands)
- Schneewind, O., & Missiakas, D. (2014). Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology*, 196(6), 1133–1142. <https://doi.org/10.1128/JB.01155-13>
- Wrolstad, R. (2006). Anthocyanin Pigments-Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science*, 69(5), C419-C425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10709.x>