

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**"Síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto
acuso de *Lippia micromera* (orégano) para la evaluación de su
actividad antifúngica frente al hongo *fusarium oxysporum f. Sp.
Cubense*".**

Tutoras:

Prof. Danisbeth Quiñonez

Lic. Francis Gómez

Trabajo Especial de Grado presentado
ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela por la Br. Yomaira L.
Rodríguez M. para optar al Título de
Licenciado en Química mención
Tecnología

Caracas, octubre de 2024

Yo, Profesora Danisbeth Quiñonez, Investigadora del Laboratorio de Síntesis Organometálica del Centro de Química Organometálica y Macromolecular de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, en conjunto con la Licenciada Francis Gómez, Investigadora de la Gerencia de Energía y Ambiente del Instituto de Estudios Avanzados IDEA.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“Síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto acuso de *Lippia micromera* (Orégano) para la evaluación de su actividad antifúngica frente al hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*”.

Que presenta la Br. Yomaira Lisbeth Rodríguez Marín, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Síntesis Organometálica de la Escuela de Química y en los Laboratorios de la Gerencia de Energía y ambiente del Instituto de Estudios Avanzados, durante el año 2024, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 18 de octubre de 2024.


Prof. Danisbeth Quiñonez
Tutora


Lic. Francis Gómez
Tutora

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: " Síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto acuso de *Lippia micromera* (Orégano) para la evaluación de su actividad antifúngica frente al hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*". Presentado por la Br. Yomaira Lisbeth Rodríguez Marín, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Profa. Danisbeth Quiñonez
Tutora



Lic. Francis Gómez
Tutora



Profa. Sofia Salazar
Jurado



Prof. José Daniel Martínez
Jurado



Resumen

En este trabajo se investigó la síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre (CuNPs) estabilizadas con extracto e infusión acuosa de *Lippia micromera* (orégano) para evaluar su actividad antifúngica contra el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense (Foc)*, principal causante del marchitamiento del banano. El extracto de orégano se obtuvo mediante ultrasonificación a 40°C de la suspensión del polvo de las hojas de orégano en agua durante 30 minutos, mientras que la infusión se preparó calentando 60°C la suspensión del polvo de las hojas de orégano en agua durante 10 minutos. Se cuantificaron los fenoles y flavonoides totales, obteniéndose una concentración (113 ± 6) mg Eq ácido gálico/gT de fenoles totales y (294 ± 21) mg Eq rutina/gT de flavonoides para el extracto, y (150 ± 3) mg Eq ácido gálico/gT de fenoles totales y (315 ± 23) mg Eq rutina/gT de flavonoides para la infusión. La actividad antioxidante fue de (217 ± 2) IC₅₀ (mg/L) para el extracto y (167 ± 6) IC₅₀ (mg/L) para la infusión. Para optimizar la síntesis de las CuNPs, se variaron las condiciones de concentración de sulfato de cobre y extractos (o infusiones), la proporción de volúmenes CuSO₄/Extracto, CuSO₄/Infusión, el tipo de agitación (magnética, ultrasónica o sin agitación), pH y temperatura. Se identificaron las condiciones óptimas como pH 5, temperatura ambiente, independiente de la agitación. Se escogieron los sistemas de nanopartículas Cu/Ore13, Cu/Ore15, Cu/Ore39 y Cu/Ore41. Estos sistemas se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía de fuerza atómica (AFM), espectroscopía UV-visible e infrarroja, y espectroscopía de absorción atómica por llama (FAAS). Los diámetros de las nanopartículas oscilaron entre 5,24 nm y 8,30 nm, confirmándose la estabilización de las CuNPs con extracto o infusión, así como la presencia de óxidos de cobre en los sistemas con infusión. La concentración de cobre en los sistemas de nanopartículas se ubicó entre 6,47 y 58,66 ppm. Finalmente, se evaluó la actividad antifúngica de las CuNPs frente a *Foc* mediante ensayos in vitro por envenenamiento del medio, determinándose que el sistema más activo fue Cu/Ore13-Inf, con una inhibición del diámetro micelar del 41,63% al tercer día, seguido por Cu/Ore13-Ext con un

25,9%. La concentración mínima inhibitoria del sistema más activo Cu/Ore13-Inf fue de 43,33 ppm de cobre.

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a mi amigo, padre, confidente y refugio en mis días oscuros DIOS, a mi madre y padre que con tanto sacrificio fueron aliados, a mis hermanos y demás familiares que siempre me apoyaron, a mi figarito que siempre me esperaba para darme amor.

A amigos que me han dado tanto como Danisbeth, Francis, Valery, Hilmel, pancho, a todas esas personas que de una u otra forma han confiado en mí y me han brindado su apoyo.

Agradecimientos

No podría comenzar sin antes agradecer al DIOS grande creador que obra de la mas manera más inentendible, hacedor de proezas sin él no hubiese logrado nada, por supuesto tampoco sin el apoyo incondicional de mi familia mis padres Carmen D Marín de Rodríguez y Orlando Rodríguez y mis tres hermanos maravillosos Yamilleth, Jeanethe y Jonier a mis sobrinos Roxana, Scarleth, Marlín, jonetxis, jonerly, Juan Carlos, Adonay y Adair, y demás familiares como José francisco santana y José Gregorio molina , Por otro lado mi amiga, confidente, apoyo en todo sentido quien le estaré agradecida por su paciencia a la hora de transmitir sus conocimientos sin importar hora, día etc. Valery John y su madre Hilmel Suarez.

A mi amiga tutora y casi mamá Danisbeth Quiñonez y Francis Gómez por creer en mí antes que yo misma, A mis jurados José Daniel Martínez, a la Profa. Sofía Salazar a mis compañeros y amigos de lucha siempre estudiando y dándonos apoyo: Sugeins Rivero, Juan Telis, Martha Farfán, Adriana Alquati, Celeste Gonzales, Ana Coronado, Norge Viloria, Francis Yanes, Sara Álvarez.

Amigos de otras instituciones como Blanca Rosales, Rosa Ramírez, Isabella Márquez, Cesar Rivera, Laynet puentes, Sayleska Solórzano, Bruno Stella,

A mi casa y forjadora la Universidad Central de Venezuela, lugar donde me formé y conocí grandes personas, me siento tan orgullosa de formar parte de la casa que vence las sombras.

A mi Facultad de Ciencias y Laboratorio de Síntesis Organometálica (UCV), por permitirme desarrollar este proyecto de investigación de la mano de personas comprometidas con la investigación y el avance de las ciencias.

Profesores que dejaron huella en mí como el profesor Gustavo Cabrera haciendo posible entender química orgánica, a la profesora Soraya Taboada, al Prof. José Chirinos, la profesora Jacqueline Pérez, Ynés Rojas, Lewis Valero, Carlos Landaeta.

Agradecimiento especial a las siguientes instituciones y Laboratorios:

- Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. FONACIT por el financiamiento otorgado a través del proyecto 202300051.
- Laboratorio de Espectroscopía Laser (UCV): Prof. Jimmy Castillo (Análisis DLS y AFM).
- Herbario “Víctor Manuel Ovalles” de la Facultad de Farmacia de la Universidad central de Venezuela, a través de su Curadora, la Profesora Giovannina Orsini. Por la identificación taxonómica del orégano
- Laboratorio de Síntesis Orgánica y Química Medicinal. Prof. Jairo Bermúdez, por la realización de la Espectroscopía UV-Vis y espectroscopia infrarrojo (IR), de extractos e infusiones y algunos sistemas de nanopartículas, así como la caracterización del extracto e infusión de *Lippia micromera*.
- Centro de Equilibrios en Solución: Prof. José Daniel Martínez (Espectroscopía UV-Vis), Laboratorio de Catálisis Homogénea (UCV).
- Instituto de Estudios Avanzados IDEA específicamente a la Gerencia de Seguridad alimentaria por entrega e identificación de la cepa del hongo *Fusarium oxysporum. f. sp cubense* y a la Gerencia de Energía y Ambiente donde se llevaron a cabo los análisis invitro.
- Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, por la realización de los análisis de Espectrometría de absorción atómica por llamas.

Índice

Índice de Contenido

I.	Introducción.....	16
1.	Generalidades.....	16
2.	Marco Teórico.....	19
a)	Nanotecnología.....	19
b)	Nanopartículas metálicas.....	21
c)	Métodos de síntesis de nanopartículas [26].....	24
d)	Nanopartículas de cobre (Cu NPs) como agentes biocidas [31] ..	30
e)	Descripción química y biológica del <i>Lippia micromera</i> (Orégano).31	
f)	Técnicas para la caracterización general de extractos acuosos ..	34
g)	Hongo <i>Fusarium oxysporum. f. sp cubense</i>	35
h)	Ensayos Invitro para evaluación de la actividad antifúngica de las Cu-NPs frente a fitopatógenos.....	38
II.	Antecedentes.....	40
III.	Objetivos.....	62
1.	Objetivo general.....	62
2.	Objetivos específicos.....	62
IV.	Parte Experimental.....	63
1.	Condiciones Generales.....	63
2.	Procedimiento Experimental.....	65
2.1.	Obtención del extracto acuoso e infusión de Orégano.....	65
2.2.	Caracterización del extracto e infusión de las hojas de Orégano evaluación de su actividad antioxidante.....	66
2.3.	Síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto / infusión de orégano (Cu/Ore).....	67
2.4.	Ensayos in vitro de la actividad antifúngica de las nanopartículas Cu/Ore frente al hongo <i>Fusarium oxysporum sp cubense</i>	72
3.	Resultados y discusión.....	75

3.1. Identificación de las hojas de <i>Lippia micromera</i> (Orégano).....	75
3.2. Obtención del extracto acuoso e infusión de orégano	75
3.3. Caracterización del extracto e infusión de orégano	76
3.4.1. Síntesis de nanopartículas de cobre con extracto de orégano utilizando agitación magnética:	78
3.4.2. Síntesis de nanopartículas de cobre con extracto de orégano utilizando ultrasonido:.....	81
3.4.3. Síntesis de nanopartículas de cobre con extracto e infusión de orégano sin agitación (in situ):	84
3.5. Caracterización de los sistemas de nanopartículas escogidas sintetizadas con extracto e Infusión.	85
A los sistemas de nanopartículas seleccionados, que se sintetizaron con extractos bajo ultrasonido y los sintetizados con infusión <i>in situ</i> se les realizaron las caracterizaciones completas de DLS, AFM, IRFT, UV-Vis IRFT.....	
3.6. Ensayos in vitro de la actividad antifúngica de las nanopartículas Cu/Ore frente al hongo <i>Fusarium oxysporum.f. sp cubense</i>	108
V. Conclusiones.....	¡Error! Marcador no definido.
VI. Referencias	118
VII. Anexos	126

Índice de Figuras

Figura 1. Color cambiante de la copa de Licurgo (verde con luz reflejada y rojo con luz transmitida) y una de las nanopartículas de oro que contiene el vidrio. [3]	17
Figura 2. Esquema de la interacción entre AgNP y células bacterianas	18
Figura 3. Viales con suspensiones de seleniuro de cadmio (CdSe)[22].....	20
Figura 4. Brecha de energía a medida que se disminuye el tamaño. [23]	21
Figura 5. Estabilización de los coloides metálicos [25].....	23
Figura 6. Estabilización de los coloides metálicos [25].....	24

Figura 7. Etapas de nucleación y crecimiento de Turkevich [26].....	25
Figura 8. (a) Formación electroquímica de nanopartículas de Pd estabilizadas con NR_4^+Cl^- (b) Foto de la celda de dos electrodos utilizada para sintetizar nanopartículas por vía electroquímica [25].....	26
Figura 9. Formación de nanopartículas mediante la reducción de precursores de sales metálicas.....	27
Figura 10. Principales fitoquímicos implicados en la síntesis de nanopartículas [26],	28
Figura 11. Orégano <i>Lippia micromera</i> [36,37]	32
Figura 12. Síntomas causados por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense Raza 4 Tropical en plantas de plátano. A) Amarillamiento típico, en el margen de las hojas más viejas. B) Hoja seca y de color café. C) Agrietamiento del pseudotallo. D y E) Colapso de las hojas más viejas, suspendidas del pseudotallo en forma de “falda”. [47]:	36
Figura 13. Indicios internos causados por <i>Fusarium Oxysporum</i> f. sp. Cúbense Raza 4 Tropical en plantas de plátano. A) Decoloración de los haces vasculares de la base de la hoja en Cavendish (cv. Williams). B, C y D) Corte longitudinal, decoloración café-rojo de los haces vasculares en el pseudotallo. E) Corte transversal, de coloración café-rojo de los haces vasculares en el pseudotallo.[48]	37
Figura 14. Esquema del proceso de determinación de la CMI mediante el método de envenenamiento.). [50].....	40
Figura 15. Micrografía de TEM de las partículas de cobre obtenidas. El recuadro muestra una imagen de TEM de alta resolución del borde de las partículas obtenidas.....	41
Figura 16. Actividad antifúngica de las partículas de cobre contra: (a) <i>Fusarium solani</i> , (b) <i>Neofusicoccum</i> sp. and (c) <i>Fusarium oxysporum</i> . Las columnas indican diferentes concentraciones de partículas de cobre: (I) 0 (control), (II) 0.1, (III) 0.25, (IV) 0.5, (V) 0.75 and (VI) 1.0 mg / mL de partículas de cobre. (51)	41
Figura 17. (a) Micrografía TEM de CuNPs. (b) Histograma de distribución de tamaño de CuNps[52]	42

Figura 18. Actividad antifúngica (a) control (b) extracto de planta (c) 1% de CuSO ₄ y CuNP (d, e, f) 0,12%; 0,18% y 0,24 % respectivamente [52]	42
Figura 19. Imagen TEM de CuNPs estabilizadas con (A) Extracto de eucalyptus and (B) Extracto de menta. (C) Tamaño de partícula por DLS de NPs Cu en Eucalipto y (D) Tamaño de partícula por DLS de NPs Cu en menta [53]	43
Figura 20. Distribución de tamaños mediante DLS de (a) CuNps y b) CuO NP[54]	44
Figura 21. Micrografías de las nanopartículas de cobre (LTCu): a)50,000x, b) 100,000x[54]	45
Figura 22. Micrografías de las nanopartículas de óxido de cobre (LTCuO): a) 50,000x,b) 100,000x [54].....	45
Figura 23. Degradación de AM por LTCu y LTCuO (120 ppm) en oscuridad [54]	46
Figura 24. Crecimiento micelial radial de patógenos bajo estudio con LTCu y LTCu [54].....	47
Figura 25. a) SEM nanopartículas de Cobre; (b) Perfil de distribución de tamaño de nanopartículas de cobre [55].....	48
Figura 26. Actividad antifúngica de nanopartículas de cobre a diferentes concentraciones contra B. cinérea [55]	48
Figura 27. Efecto de las nanopartículas de cobre en la descomposición microbiana del tomate mantenido a 24 °C durante 10 días. [55].....	49
Figura 28. Espectroscopia UV para las nanopartículas de cobre sintetizadas.[56]	50
Figura 29. Zona de inhibición alrededor de discos impregnados con nanopartículas de cobre contra: (A) <i>Aspergillus niger</i> ;(B) <i>Aspergillus flavus</i> [56]	50
Figura 30. Distribución del tamaño de partícula (PSD) de las NP de CuO sintetizadas mediante los métodos DLS, para variar CuSO ₄ ·5H ₂ O de concentración: (A) 15 µl; (B) 20 µL y (C) 25 µL.....	51
Figura 31. (A) espectroscopia UV-visible de NP de CuO sintetizadas verde [57]	52
Figura 32. (B) espectros FTIR del extracto de <i>Morinda citrifolia</i> y nanopartículas de cobre	52
Figura 33. (C) Patrón XRD de las nanopartículas de CuO.....	53

Figura 34. (a) Actividad antibacteriana, y (b) actividad antifúngica de nanopartículas de óxido de cobre estabilizadas con extracto de <i>Morinda citrifolia</i> ; (A) 15 l, (B) 20 l y (C) 25 l; y control de Np CuO. [57]	53
Figura 35. Análisis de distribución del tamaño de CuO Zs NP y Imagen de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de las CuO Zs NP formadas[58]	54
Figura 36. (A) Análisis espectroscópico UV-vis de las CuO-Zs-NP producidas y del extracto de plantas[58]	55
Figura 37. A) Análisis del espectro FT-IR del extracto de hojas de <i>Zizyphus espina</i> y B) CuO-Zs-NP formados (B) [58]	55
Figura 38. Actividad antifúngica de CuO-Zs-NP en diferentes concentraciones, así como un fungicida comercial (Kocide 2000) y un biocida de Trichoderma contra <i>Fusarium solani</i> en medio PDAA: Actividad inhibidora de CuO-Zs-NP contra <i>F. solani</i> crecimiento micelial en medio PDA en comparación con el biocida Trichoderma y el fungicida químico B: Sobre el diámetro de la colonia (cm) C: Sobre porcentaje de crecimiento Inhibición (%). [58]	56
Figura 39 . MEB de nanopartículas de plata (b) Distribución granulométrica según DLS [59]	57
Figura 40 Espectros UV-Vis a diferentes escalas de nanopartículas de plata y <i>cilantro sativum</i> con AgNO ₃ como precursor. [59]	58
Figura 41 Espectro FTIR del extracto de cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>).[59].....	58
Figura 42 Difractograma XRD de nanopartículas de plata entre 2θ=30°y 48°[59].	59
Figura 43.Registro fotográfico del crecimiento de los hongos. <i>Fusarium solani</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i> [59].	60
Figura 44. Esquema para la preparación del extracto acuoso de orégano (propio)	65
Figura 45. Esquema para la preparación de las nanopartículas de cobre a partir de extracto acuoso de orégano (propio).....	68
Figura 46. Esquema para la preparación de las nanopartículas de cobre a partir de extracto acuoso de orégano vía ultrasónica (propio).....	69
Figura 47. Esquema de preparación de infusión de orégano in situ.	71
Figura 48. Esquema para la distribución del antifúngico en las placas Petri.....	73

Figura 49. a) Espectro UV-Vis del sistema de Nps Cu/Ore(2-5), (b) Espectro UV-Vis del sistema de Nps Cu/Ore(6-9).....	80
Figura 50. Suspensión obtenida en las nanopartículas Cu/Ore13-Ext; Cu/Ore15-Ext; Cu/Ore39-Ext y Cu/Ore41-Ext.....	83
Figura 51. Histogramas por DLS de los sistemas de nanopartículas.....	86
Figura 52. AFM Cu/Ore13-Ext.....	87
Figura 53. AFM Cu/Ore15-Ext.....	87
Figura 54. AFM Cu/Ore39-Ext.....	88
Figura 55. AFM Cu/Ore41-Ext.....	88
Figura 56. AFM Cu/Ore13-Inf.....	89
Figura 57. AFM Cu/Ore15-Inf.....	89
Figura 58. AFM Cu/Ore39-Inf.....	90
Figura 59. AFM Cu/Ore41 Inf.....	90
Figura 60. Espectro UV-Vis del extracto de orégano.	92
Figura 61. Espectros UV-Vis. Infusión de orégano.....	92
Figura 62. Espectro UV-Vis Cu/Ore13-Ext.....	93
Figura 63. Espectro UV-Vis Cu/Ore13-Inf.....	94
Figura 64. Espectro UV-Vis Cu/Ore15-Ext.....	94
Figura 65. Espectro UV-Vis Cu/Ore15-Inf.....	95
Figura 66. Espectro UV-Vis Cu/Ore39-Ext.....	95
Figura 67. Espectro UV-Vis Cu/Ore39-Inf.....	96
Figura 68. Espectro UV-Vis Cu/Ore41-Ext.....	96
Figura 69. Espectro UV-Vis Cu/Ore41-Inf.....	97
Figura 70. Difracción de rayos X del sistema Cu/Ore39-Ext.....	98
Figura 71. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier de Extracto Orégano.....	100
Figura 72. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier de Extracto Orégano.....	100
Figura 73. Espectroscopia IRFT de Sulfato de cobre anhidro.....	101
Figura 74. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore13-Ext, sulfato de cobre y extracto de orégano.	102

Figura 75. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore13–Inf, sulfato de cobre e infusión de Orégano.....	103
Figura 76. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore15–Ext, sulfato de cobre y extracto de Orégano.....	103
Figura 77. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore15–Inf, sulfato de cobre e infusión de Orégano.....	104
Figura 78. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore39–Ext, sulfato de cobre y extracto de Orégano.....	104
Figura 79. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore39–Inf, sulfato de cobre e infusión de Orégano,.....	105
Figura 80. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore41–Ext, sulfato de cobre y extracto de Orégano.....	105
Figura 81. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore41–Inf, sulfato de cobre e Infusión de Orégano.....	106
Figura 82. Inhibición del hongo producida por Cu/Ore13-Inf, Sulfato de cobre 1M y 0,01M e infusión 10g/100mL.....	112
Figura 83. Inhibición producida por Cu/Ore13-Ext Sulfato de cobre 1M y 0,01M e extracto 10g/100mL.....	113
Figura 84. Representación gráfica del mecanismo propuesto para la actividad antifúngica en respuesta a nanopartículas de cobre (Cu NP)[73]......	114
Figura 85. CMI de ore13 en infusión al tercer día de incubación.....	116

Índice de gráficos

Gráfico 1. Actividad antioxidante del extracto, infusión y patrones representado como Absorbancia vs Log ₁₀ [Conc. ppm]......	77
Gráfico 2, 3, 4 y 5. % IDM en el tiempo.....	¡Error! Marcador no definido.

Índice de Tablas

Tabla 1. Compuestos presentes en la especie <i>Lippia micromera</i> [20].....	33
---	----

Tabla 2. Efecto de las nanopartículas sobre el crecimiento micelial de <i>Colletotrichum capsici</i> después de 10 días de incubación	44
Tabla 3. Condiciones de síntesis para agitación magnética	68
Tabla 4. Condiciones de síntesis con ultrasonido	69
Tabla 5. Condiciones de síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con infusión de orégano sin agitación	71
Tabla 6. Distribución de las placas para medir porcentaje de inhibición, inoculadas por triplicado	73
Tabla 7. Distribución de las placas para medir porcentaje de inhibición, inoculadas por triplicado	74
Tabla 8. Fenoles totales y flavonoides totales para el Extracto de orégano	76
Tabla 9. Actividad captadora de radicales libres de los extractos e infusión de orégano	77
Tabla 10. Tamaño de nanopartículas obtenidas con agitación magnética	79
Tabla 11. Tamaño de nanopartículas de cobre sintetizadas en ultrasonido	81
Tabla 12. Tamaño de nanopartículas de cobre bajo diferentes tipos de agitación y diferente tipo de agente reductor: extracto o infusión	84
Tabla 13. Comparación de tamaños de los sistemas de nanopartículas por AFM al utilizar extracto e infusión	91
Tabla 14. Concentración de cobre en las nanopartículas de cobre estabilizadas con orégano	107
Tabla 15. Porcentaje de Inhibición del Diámetro Micelar (%IDM) inducido por los antifúngicos bajo estudio	109
Tabla 16. Resumen de los resultados del % de inhibición obtenidos del método de concentración mínima inhibitoria	115

I.Introducción

1. Generalidades

A lo largo de la historia, la nanotecnología ha experimentado avances significativos, impulsados por la curiosidad humana y la necesidad de comprender fenómenos microscópicos. Este conocimiento ha permitido la síntesis de nanomateriales, como nanopartículas metálicas, nanocables metálicos y nanotubos de carbono, mediante diversos métodos químicos, físicos o biológicos. Estas estructuras, con dimensiones entre 1 y 100 nm, presentan propiedades únicas debido a su gran relación superficie/volumen, energía superficial y confinamiento espacial [1,2].

Aunque no se sabe con certeza cuando comenzó la utilización deliberada de materiales a escala nanométrica, se sabe que los romanos, en el siglo IV a.c ya incorporaban nanopartículas metálicas en la fabricación de vidrio. Un ejemplo de eso es la copa de Licurgo (Figura 1) esta copa es vidrio de sosa y cal que contienen nanopartículas de oro y plata, estas partículas le otorgan al vaso un color verde, pero al iluminarlo desde adentro, el color se vuelve rojo intenso. De manera similar, los coloridos vidrios de las catedrales medievales también deben su apariencia a la presencia de nanopartículas metálicas en su composición. Aunque la nanotecnología tenía antecedentes antiguos, su desarrollo moderno comenzó a tomar a tomar forma a partir de la década de 1960. El físico Richard Feynman, ganador del premio nobel, fue un pionero en este campo. En una conferencia titulada “hay mucho espacio en el fondo” Feynman propuso la manipulación individual de átomos para crear estructuras diminutas con propiedades únicas. Esta visión anticipó el gran potencial que se desataría en el campo de la nanotecnología. [3]



Figura 1. Color cambiante de la copa de Licurgo (verde con luz reflejada y rojo con luz transmitida) y una de las nanopartículas de oro que contiene el vidrio. [3]

Gracias a sus excelentes propiedades, las nanopartículas metálicas se aplican en distintos sectores, tales como la medicina, la catálisis, la farmacéutica, la agroindustria, entre otros. En particular, estos sistemas destacan en aplicaciones antimicrobianas gracias a su considerable área superficial que asegura un contacto eficaz con los microorganismos. Se ha demostrado que las nanopartículas en el rango de tamaño de 1-10 nm presentan la mayor actividad antibacteriana [4], ya que a menor tamaño incrementa el área de superficie permitiendo un mayor número de interacciones entre moléculas orgánicas, inorgánicas y las bacterias [5]. En la Figura 2, se esquematizan las interacciones entre las nanopartículas de plata (AgNP) y los iones de plata con una célula bacteriana. Las AgNP tienen la capacidad de entrar en la célula, liberar iones de plata, provocar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como los iones peróxido (O_2^{2-}) y los radicales hidroxilos ($\bullet OH$), para interactuar con proteínas de la membrana, afectando su permeabilidad y afectar el ADN celular [6]. En particular, las nanopartículas de cobre se destacan como componentes clave en aplicaciones agrícolas, gracias a su alta eficacia antimicrobiana. El cobre ha demostrado ser un aliado fundamental en la protección de los cultivos agrícolas, primero, por ser un micronutriente esencial en las plantas al encontrarse en diversas proteínas y metaloenzimas de las mismas, desempeñando un papel vital en su salud y nutrición, y luego, por ser un antimicrobiano [7][8][9].

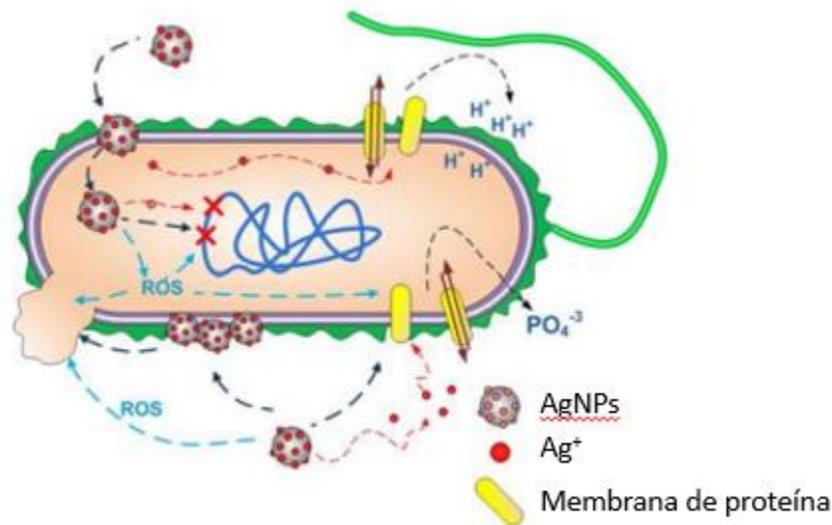


Figura 2. Esquema de la interacción entre AgNP y células bacterianas

La síntesis de nanopartículas de cobre bajo el paradigma de la "Química Verde" busca reducir la dependencia de sustancias químicas tóxicas y contaminantes, utilizando bacterias, hongos, levaduras, algas y extractos acuosos de partes de plantas (tallo, hojas o semillas) para obtener nanopartículas metálicas. Al utilizar algunos fitoquímicos presentes en los extractos de plantas como los fenoles, flavonoides, entre otros, estos actúan como agentes reductores de los iones metálicos, por lo que han demostrado ser un método efectivo para la obtención verde de nanopartículas metálicas [10][11][12].

Diversas investigaciones se han enfocado en el estudio de las propiedades antifúngicas y antioxidantes de extractos de especies botánicas, lo cual ha generado un gran interés debido a los resultados de los ensayos obtenidos tanto in vitro como in vivo [13]. Es importante destacar que los hongos fitopatógenos representan un gran desafío para la industria agrícola, ya que causan pérdidas económicas significativas que ascienden a miles de millones de dólares al año [14]. Además, la resistencia antifúngica dificulta el control de estos hongos y es necesario encontrar opciones de control que sean de bajo costo y no contaminen el ambiente [15]

En Venezuela, la producción de plátanos y bananos (Musáceas) se ve afectada por diversos problemas, entre los cuales destaca el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense (Foc)*[16] Este hongo es considerado devastador a nivel mundial y ha afectado a todos los estados del país, causando innumerables pérdidas económicas a los productores locales. El marchitamiento del banano causado por el hongo *Fusarium* es una enfermedad que afecta principalmente al sistema vascular de la planta. Este patógeno, conocido como *Fusarium*, infecta las raíces de diferentes variedades de banano, tanto las susceptibles como las resistentes. Sin embargo, la infección tiende a propagarse principalmente en las partes del rizoma que están vascularizadas, especialmente en los genotipos más susceptibles [17].

En el presente trabajo, se propone sintetizar nanopartículas de cobre con extracto acuoso de *Lippia micromera* (orégano)[18], una planta regionalmente conocida y utilizada en la gastronomía y que posee compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol [19] que actuarían como agentes estabilizantes y como agentes reductores [20] de los iones metálicos de cobre presentes en solución, facilitando la formación de las nanopartículas de manera eficiente. La combinación de las propiedades antimicrobianas del cobre [7][8][9] y los compuestos antifúngicos del orégano [19] podría ofrecer una estrategia innovadora y respetuosa con el medio ambiente para conseguir soluciones sostenibles y eficaces en la lucha contra el hongo *Foc*.

2. Marco Teórico

a) Nanotecnología

La nanotecnología, un campo en constante avance, abarca la creación, manipulación, estudio, diseño y aplicación de materiales a escalas extremadamente reducidas. Esta disciplina trabaja con materiales y estructuras en niveles atómicos y en una escala nanométrica, siendo

discernibles a nivel macroscópico. Este enfoque revolucionario tiene diversas aplicaciones en medicina, energía, electrónica, computación, materiales avanzados y agroindustria, entre otros. [21].

Uno de los estudios más revolucionarios en este campo es el de los puntos cuánticos, que constituyen componentes clave en el área. Estos sistemas son pequeños agregados de átomos de unos pocos nanómetros de diámetro y poseen propiedades únicas debido a su escala diminuta, por ejemplo, es fascinante observar como las propiedades de la materia pueden cambiar en esa escala, para ilustrar esto, en la Figura 3 se muestran viales que contienen seleniuro de cadmio coloidal, y su color va variando según el tamaño de la esfera coloidal pasando del azul (2.0 nm) al verde (2.5 nm), amarillo (3.0 nm), naranja (3.9 nm) y finalmente al rojo (4.2 nm). [22]

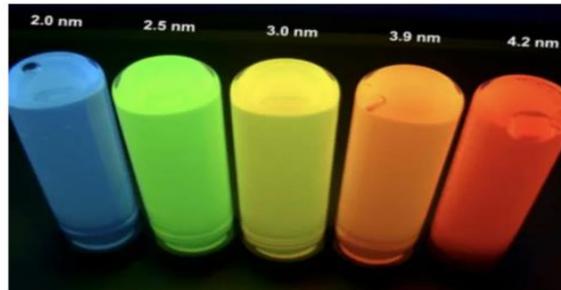


Figura 3. Viales con suspensiones de seleniuro de cadmio (CdSe)[22]

Cuando un material experimenta un cambio gradual en su tamaño genera un efecto directo en la longitud de onda de la luz que emite. En términos generales, a medida que el tamaño del material disminuye, la longitud de onda de la luz que es emitida también disminuye. Esto significa que cuantas más pequeñas sean las esferas que componen el material, mayor será la luz emitida. Este fenómeno puede observarse en la Figura 4, en donde se muestra que, a una escala tan diminuta, surgen niveles discretos de energía entre los bordes de las bandas de conducción y la banda de valencia. Como resultado, las propiedades de los electrones en el

material se ven afectadas, proporcionando oportunidades para ajustar la absorción y emisión de fotones de luz visible. Esta capacidad permite que el material exhiba una amplia variedad de colores. En otras palabras, cuanto más pequeña sea la esfera, mayor será el salto cuántico entre las energías permitidas. Este efecto se conoce como efecto cuántico por confinamiento, y se produce al forzar a los electrones dentro de un espacio de tamaño nanométrico.[23].

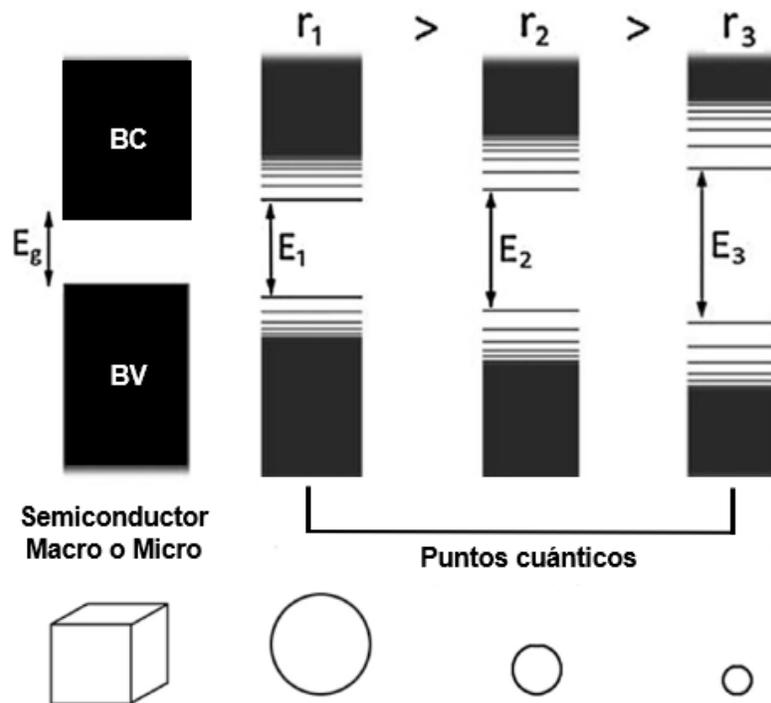


Figura 4. Brecha de energía a medida que se disminuye el tamaño. [23]

b) Nanopartículas metálicas.

Los coloides son partículas que tienen un tamaño mayor que las dimensiones atómicas, pero lo suficientemente pequeño como para exhibir movimiento browniano. Inicialmente un coloide fue definido como la suspensión de una fase sólida, líquida o gaseosa en otra fase y dicha definición se ajustaba a suspensiones que no sedimentaban espontáneamente y tampoco formaban

una fase diferente a simple vista, sin centrifugación. Sin embargo, una definición más amplia y detallada sería, cualquier sustancia que consta de partículas sustancialmente más grandes que los átomos o las moléculas ordinarias, pero demasiado pequeñas para ser visibles a simple vista; y pueden existir como dispersiones de una sustancia en otra. Los agregados metálicos de los elementos de transición con tamaños entre 1 y 100 nm dispersos en otra fase también son considerados coloides y cuando se separan de la fase en donde se encuentran suspendidos se denominan ***nanopartículas metálicas***[24].

Los coloides sólo son estables cinéticamente, ya que cuando dos partículas se encuentran cercanas, puedan ser atraídas entre sí por fuerzas de Van der Waals. Si no hay fuerzas repulsivas que contrarresten esta atracción, esto puede resultar en la aglomeración de las partículas en una dispersión inestable que causa su precipitación como material másico. Por lo tanto, es necesario estabilizarlos para prevenir su aglomeración. Se han utilizado los siguientes tipos de estabilización [25]:

- **Estabilización electrostática:**

La estabilización de las partículas puede ser causada por la presencia de compuestos iónicos disueltos en una solución. Estos compuestos generan una doble capa de cargas alrededor de las partículas que tiene cargas opuestas en cada capa, como resultado, se produce una repulsión electrostática entre las partículas, lo que evita su agregación si la diferencia de potencial en la doble capa es lo suficientemente alta (Figura 5).

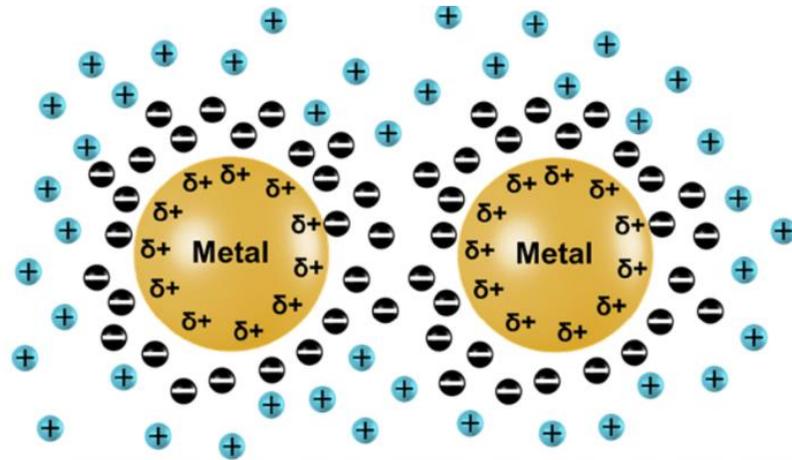


Figura 5. Estabilización de los coloides metálicos [25]

- Estabilización estérica:** Esta se logra mediante la adsorción de grandes moléculas, como polímeros, oligómeros o dendrímeros o mediante la coordinación de ligandos en la superficie de las partículas, formando una capa protectora que evita su agregación, cuando dos capas protectoras comienzan a interpenetrarse se produce un aumento local en la concentración de las moléculas adsorbidas (Figura 6), lo que genera una repulsión osmótica, esto se debe a que el solvente intenta restablecer el equilibrio diluyendo las moléculas y separando así las partículas.

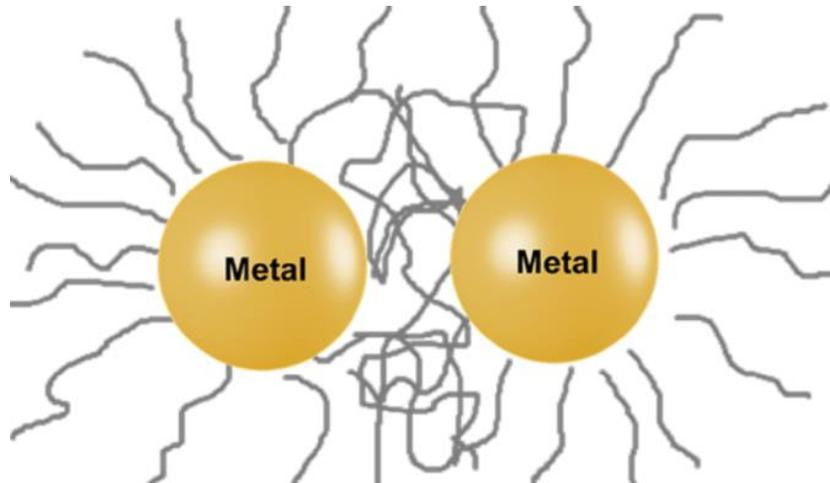


Figura 6. Estabilización de los coloides metálicos [25]

La comprensión y aplicación efectiva de estos métodos de estabilización no solo preservan la estabilidad de los coloides, sino que también aseguran su viabilidad en diversas aplicaciones y procesos, subrayando la importancia de la estabilización en la utilidad práctica de estos sistemas dispersos.

c) Métodos de síntesis de nanopartículas [26]

Los métodos de síntesis de nanopartículas se pueden clasificar en dos categorías fundamentales: el enfoque "de arriba hacia abajo" y el enfoque "de abajo hacia arriba". El primero implica la reducción de sólidos másicos en porciones más pequeñas, ya sea a través de procesos de molienda o desgaste. Por otro lado, el enfoque "de abajo hacia arriba" se centra en la obtención de nanopartículas mediante la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución. Es importante destacar que este último enfoque es considerablemente más popular en la síntesis de nanopartículas.

En la gran mayoría de los métodos y rutas sintéticas, la formación de las nanopartículas depende crucialmente de la nucleación que ocurre durante la síntesis y de la estabilidad que se confiere a la partícula nanométrica en el momento de su formación. La síntesis de nanopartículas se basa en dos procesos esenciales y distintos: la formación de núcleos y su subsiguiente crecimiento (Figura 7). La nucleación en partículas metálicas resulta de factores

complejos, y la velocidad de nucleación y crecimiento se determina por la probabilidad de colisiones entre átomos-átomos, átomos-núcleo y núcleo-núcleo. Tiempos cortos de nucleación favorecen partículas monodispersas. La rápida inyección de agentes reductores fuertes, como los hidruros de las sales metálicas, se emplea para separar la etapa de nucleación de la de crecimiento.

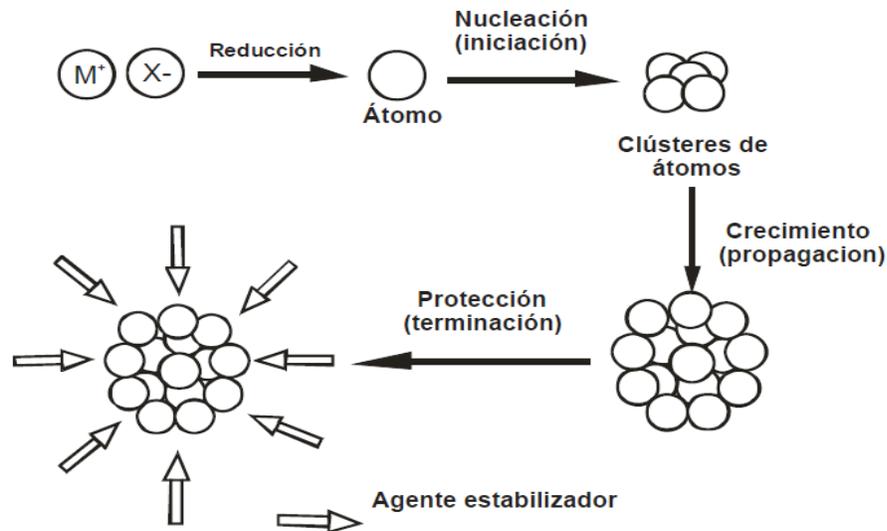


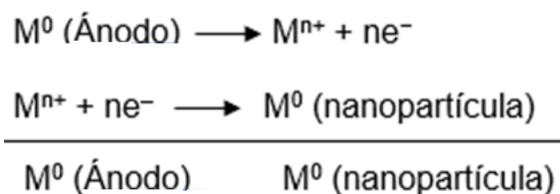
Figura 7. Etapas de nucleación y crecimiento de Turkevich [26]

Estos procesos desempeñan un papel fundamental en las variaciones de diversos parámetros, como estructura, forma, tamaño y composición, de las partículas, ejerciendo así una influencia significativa en las propiedades ópticas, térmicas, electrónicas y catalíticas de las nanoestructuras.

En el contexto de la obtención de nanopartículas metálicas, existen varios métodos químicos destacados.

Método de vapor metálico: El vapor atómico de un metal se condensa en un líquido frío, que contiene un estabilizador. Al calentarse, los átomos de metal disueltos forman nanopartículas (NPs). Cuando el propio líquido actúa como estabilizador, el vapor metálico puede condensarse con el vapor del solvente, dando como resultado una matriz sólida.

Electroquímica: implica la aplicación de una diferencia de potencial entre dos placas que forman un arreglo ánodo-cátodo para generar las nanopartículas. Es posible manipular el tamaño de las partículas mediante la variación del potencial aplicado, la distancia entre los electrodos, la temperatura y la polaridad del solvente (esquema 1).



Esquema 1. Síntesis de nanopartículas por electroquímica

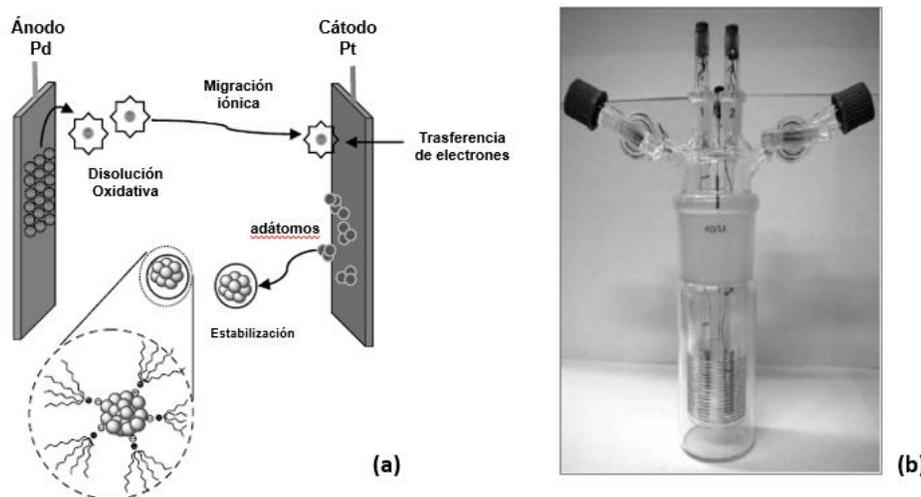


Figura 8. (a) Formación electroquímica de nanopartículas de Pd estabilizadas con $NR_4^+Cl^-$ (b) Foto de la celda de dos electrodos utilizada para sintetizar nanopartículas por vía electroquímica [25].

Reducción y desplazamiento de ligandos orgánicos presentes en compuestos organometálicos. Aquí, se emplea un compuesto organometálico de bajo estado de oxidación como reactivo, y se procede a reducir los ligandos mediante hidrógeno o monóxido de carbono para dejar el centro metálico en estado cero (Esquema 2).



Esquema 2. Reducción y desplazamiento de ligandos

Reducción de sales metálicas: En este enfoque (Esquema 3), el agente reductor (por ejemplo, hidrógeno, alcohol, hidracina o borohidruro) se mezcla con la sal precursora de metal en presencia de agentes estabilizadores (ligandos, polímeros o surfactantes). Estos últimos evitan la aglomeración indeseada y la formación de polvos metálicos (Fig. 9).



Esquema 3. Reducción de sales metálicas

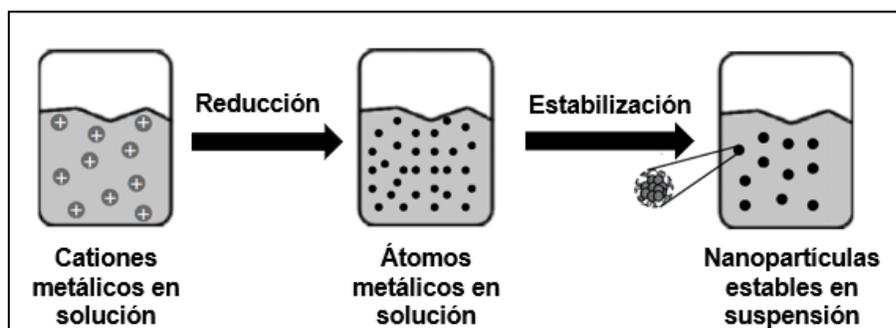


Figura 9. Formación de nanopartículas mediante la reducción de precursores de sales metálicas

Fitosíntesis de nanopartículas metálicas: implica la obtención de extractos acuosos de biomasa vegetal, que se mezclan con una solución de los iones metálicos a la temperatura deseada con o sin agitación para obtener nanopartículas metálicas. Los componentes celulares o extracelulares presentes en los extractos vegetales como proteínas, carbohidratos, ácidos orgánicos, fenoles y otros metabolitos de las plantas (Figura 10), actúan como agentes reductores, ya que aportan electrones a los cationes de los metales, lo que los lleva a una forma metálica con carga cero y de escala nanométrica[26]

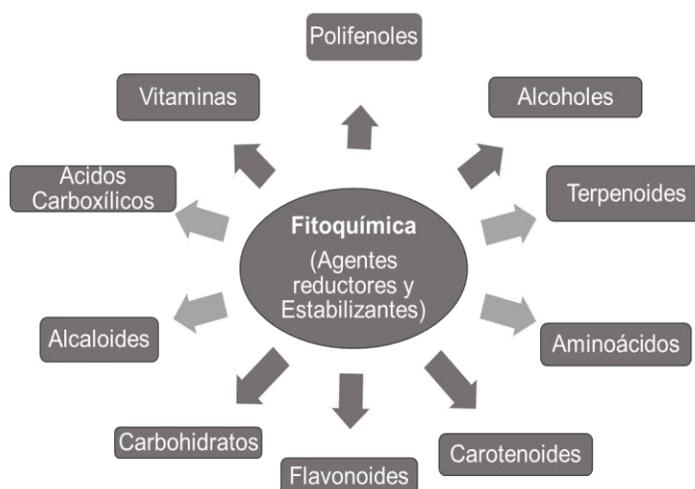


Figura 10. Principales fitoquímicos implicados en la síntesis de nanopartículas[26],

En general, el proceso de obtención de nanopartículas de metales como Cu, Ag, Pd, Au, Ni y Ce, entre otros, con extractos vegetales es como sigue [28]:



El compuesto reductor mencionado en la Ec-1 puede referirse tanto un único metabolito o compuesto químico como a varios de ellos presentes en un extracto vegetal o en células vivas.

Por otro lado, el Cu de valencia cero (Cu^0) indicado en la Ec-2 se obtiene a través de una reducción en dos etapas: primero del Cu^{2+} al Cu^+ y luego a Cu^0 , luego la formación de complejos con otros átomos de Cu^0 ; estos complejos se agregan entre sí para formar una nanopartícula, que puede tener una estructura cristalina o amorfa y que tendrá dimensiones y geometría específicas, estas características dependen del ambiente químico en donde se desarrolle la reacción y los compuestos que aportan el potencial reductor.[28]

La síntesis de nanopartículas a partir de compuestos fitoquímicos no sigue un procedimiento estándar, sino que depende de los componentes específicos presentes en cada planta. Durante este proceso de síntesis de nanopartículas,

se pueden manipular una serie de parámetros de control que influyen tanto en la reacción misma como en las características finales de las partículas resultantes. Sin embargo, lograr un control directo sobre estas características es un desafío considerable debido a la variabilidad inherente de los compuestos reductores y a la dificultad de lograr una reproducibilidad precisa. Como alternativa, se ha optado por influir de manera indirecta en estas características mediante la modificación de otros parámetros, tales como [29]:

Relación de reactantes: la relación entre los reactivos utilizados en la reacción puede afectar el tamaño, la forma y la composición de las nanopartículas. Cambios en la relación molar de los reactantes pueden controlar la cinética y las características finales de las partículas.

Temperatura de síntesis: El incremento de la temperatura durante la síntesis promueve una mayor tasa de nucleación, lo que resulta en la formación de nanopartículas generalmente más pequeñas, esto se debe a que todos los núcleos se formen y consumen los iones metálicos simultáneamente.

Tiempo de reacción: El tiempo de reacción es un elemento a tomar en cuenta en la síntesis de nanopartículas, ya que tienen un impacto significativo en el tamaño de las partículas resultantes. Al detener la reacción o modificar las condiciones, es posible evitar que las partículas continúen creciendo en sus tamaños iniciales. Los cambios de color y la medición del espectro UV-visible son indicadores indirectos del crecimiento de las nanopartículas.

Concentración de reactantes: si la cantidad de catión metálico supera un umbral crítico de concentración, se favorece la formación de núcleos, lo cual resulta en una reducción del tamaño promedio de las nanopartículas y un aumento en su cantidad.

pH: la modificación del pH afecta la composición de los fitoquímicos presentes en los extractos vegetales, lo que a su vez puede influir en su capacidad para reducir y estabilizar las nanopartículas.

Agente estabilizante: la presencia de agentes estabilizantes, como polímeros surfactantes, extractos pueden influir en la estabilidad y dispersión de las nanopartículas, estos agentes ayudan a evitar la aglomeración y la sedimentación de las partículas.

El uso de extractos de plantas en la preparación de nanopartículas no solo demuestra un enfoque respetuoso con el medio ambiente, sino también, lo convierte en el método preferido para la síntesis de nanopartículas en diversas aplicaciones. Estos procedimientos no requieren el uso de productos químicos tóxicos o peligrosos, como tensioactivos, ni la necesidad de instalaciones de laboratorios sofisticadas o costosos instrumentos. Por lo tanto, la síntesis de nanopartículas cumple con los principios fundamentales de la química verde.[30].

d) Nanopartículas de cobre (Cu NPs) como agentes biocidas [31]

El cobre ha estado presente en la humanidad desde tiempos remotos, ya que es uno de los metales que en bajas concentraciones desempeña un papel esencial en el metabolismo de las células animales y vegetales. En el contexto de los estudios del cobre como biocida, surge el interés por las Cu-NPs. Estas nanopartículas como todo compuesto nano, tienen una gran área superficial con respecto a su volumen, lo que hace resaltar las propiedades del cobre y favorece la liberación de iones cobre siendo aún más nocivo para microorganismos patógenos. El mecanismo íntimo que explica la actividad antibacteriana del cobre no está totalmente dilucidado pero un elemento crucial en la actividad antibacteriana es la capacidad del cobre para ceder y aceptar electrones en un proceso continuo. Algunos estudios sugieren que el cobre, en concentraciones elevadas, tiene un efecto tóxico sobre las bacterias debido a la liberación de radicales de hidroperóxido, los iones de cobre potencialmente podrían sustituir iones esenciales para el metabolismo bacteriano como el hierro, interfiriendo inicialmente con la función de la membrana celular y luego a nivel del citoplasma alterando la síntesis proteica, ya sea inhibiendo la formación de proteínas o provocando la síntesis de proteínas disfuncionales, alterando la actividad de enzimas esenciales para el metabolismo bacteriano.

El cobre también ha demostrado capacidad para destruir diferentes especies de hongos. Estudios recientes indican que la actividad antifúngica ocurre mediante un proceso complejo denominado "muerte por contacto" en el

cual se produce fundamentalmente un daño a la membrana citoplasmática, que se despolariza; no está claro si el daño afecta a las proteínas o los lípidos de la membrana. Esto facilita la entrada de iones de cobre a la célula, amplificando el daño y secundariamente se produce un aumento en el estrés oxidativo, sin apreciar daño aparente del ADN de estas células.

La sinergia entre nanopartículas de cobre y extractos vegetales se presenta como una estrategia prometedora en la lucha contra patógenos. Pues las biomoléculas no solo desempeñan un papel fundamental como agentes estabilizantes y reductores en la síntesis de las nanopartículas de cobre, sino que también contribuyen con sus propiedades antimicrobianas inherentes. Este doble beneficio refuerza significativamente la capacidad del sistema para combatir eficazmente a los patógenos. Así, la combinación estratégica de estas dos fuentes de actividad antimicrobiana abre nuevas perspectivas para el desarrollo de soluciones más efectivas económicas y respetuosas con el medio ambiente en la lucha contra los microorganismos patógenos en ámbitos como la agricultura [32][33][34].

e) Descripción química y biológica del *Lippia micromera* (Orégano).

La especie *Lippia micromera* (orégano) (figura 11), una planta nativa de centro américa, es una hierba aromática perenne, presenta crecimiento ramificado, gregario. Sus ramas son tetrágonas, con brotes axilares foliosos y sistema radical axonomorfo. Las hojas con filotaxia opuestas decusadas, pecíolos muy cortos y limbos pequeños, entre 6-12 mm de largo y 3-6 mm de ancho por lo general ovado, subagudos en el ápice, estrechados en el pecíolo hacia la base, comúnmente enteras, esparcidos-crenados o con algunos dientes cerca del ápice, hojas pubescentes por el haz, nervio medio y secundario en su mayoría impresos por el haz. Inflorescencia capitada, subglobosa, solitaria en las axilas, con pedúnculos muy cortos, parecidos a las hojas que lo subtienden. Las flores tienen un cáliz comprimido-tubuloso, la corola gamopétala cigomorfa de color blanco con garganta amarillenta, punteada, flor pentámera, limbo con el lóbulo central mayor. Estambres dinamos y estilo inclusos y adheridos a la

corona. En lo que respecta al órgano femenino, se caracteriza por presentar un ovario de color blanco verdoso, con dos carpelos, 2 lóculos, placentación axial y estilo terminal. [35].



Figura 11. Orégano *Lippia micromera* [36,37]

El orégano se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera [38]:

- **Reino: Plantae - Plantas**
- **Subreino: Traqueobionta - Plantas vasculares**
- **Superdivisión: Espermatofita - Plantas con semillas**
- **División: Magnoliophyta - Plantas con flores**
- **Clase: Magnoliopsida - Dicotiledóneas**
- **Subclase: Astéridae**
- **Orden: Lamiales**
- **Familia: Verbenaceae J. St.-Hil. - familia verbena**
- **Género: Lippia L. - lippia P**
- **Especie: *Lippia Micromera***

Los aceites esenciales son mezclas complejas de sustancias con diferentes funciones químicas que pueden exhibir reactividades variadas frente a especies radicales. Los aceites esenciales, aislados de las especies del género *Lippia*, destacan no solamente por la variedad química de sus componentes, sino por su diversa actividad biológica. Los aceites esenciales y extractos, obtenidos de *Lippia*, poseen propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiprotozoica, insecticida y antioxidantes; la última actividad, quizás, es de las más estudiadas. Stashenko y colaboradores [20] identificaron 102 sustancias diferentes en 12 aceites esenciales de diferentes especies vegetales de orégano, para el orégano *Lippia micromera* algunos de los compuestos identificados se pueden ver en la Tabla 1:

Tabla 1. Compuestos presentes en la especie *Lippia micromera*[20]

Compuestos oxigenados (CO)	Monoterpenos oxigenados (MO)	Hidrocarburos monoterpénicos (MH)	Hidrocarburos sesquiterpenos (SH)
Timol	Linalol	α - tujeno	Trans- β -cariofileno
Carvacrol	Borneol	α - pineno	α -humuleno
Metil timil éter	Terpinen-4-ol	canfeno	γ -muuroleno
Acetato de timilo	Geranial	Sabineno	Germacreno D

Las sustancias oxigenadas, Monoterpenos o fenilpropanoides fueron los constituyentes más frecuentemente encontrados en los aceites esenciales de las especies del género *Lippia* estudiados y desempeñan un papel determinante en la capacidad antioxidante exhibida por estos [20].

f) Técnicas para la caracterización general de extractos acuosos

La aplicación de las técnicas de espectroscopía UV-visible ha permitido corroborar la existencia de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante en el extracto acuosos de plantas.

- **Determinación de Polifenoles:**

Los polifenoles, que engloban una amplia variedad de compuestos como flavonoides, flavonoles, flavonoles, flavononas, isoflavonas, flavonas, antocianidinas, flavanoles, chalconas, antocianinas, isómeros del ácido clorogénico, familias de los ácidos cinámico y benzoico, estilbenos, ligninas, lignanos, taninos, tocoferoles y tocotrienoles [39], desempeñan un papel fundamental en las propiedades antioxidantes de las plantas. La evaluación de estos compuestos se realiza mediante el método de Folin y Ciocalteu (1927), un procedimiento estándar utilizado para medir los "fenoles" totales que mide indirectamente los "fenoles totales" a través de la capacidad reductora de los componentes de muestras de alimentos o bebidas. El mecanismo básico es una interacción de oxidación/reducción que detecta la presencia de fenoles y agentes reductores y posiblemente quelantes metálicos. Los fenoles y polifenoles se detectan mediante la transferencia de electrones en un medio alcalino desde los compuestos fenólicos a complejos de ácido fosfomolibdico/fosfotungstico en el reactivo de Folin-Ciocalteu. [40,41] Se forma un color azul con los compuestos reductores y los reactivos de Folin-Ciocalteu, finalmente se mide la absorbancia a 725 nm. La concentración de cada muestra se debe calibrar frente a ácido gálico.

- **Determinación de Flavonoides:**

El contenido total de flavonoides del extracto se determina mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio, a través del procedimiento descrito en Lamaison J (1990) [42]. En el cual se mezcla el extracto acuoso con una solución de cloruro de aluminio y se mide la absorbancia a 595nm. El contenido

total de flavonoides se calcula a partir de una curva de calibración utilizando concentraciones crecientes de quercetina, y el resultado se expresa como mg equivalentes de quercetina por g extracto.

- **Actividad antioxidante [43][44]:**

La actividad antioxidante determinada mediante el ensayo de atrapamiento del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH.), descrito por Villano et. al (2007) [43] con algunas modificaciones. Para tal fin, se deben mezclar extracto con etanol y una solución de DPPH, posteriormente fueron incubados en oscuridad a temperatura ambiente 30 min. La absorbancia de la mezcla fue registrada a 595 nm. La quercetina debe ser utilizada como antioxidante de referencia. La capacidad de la muestra para captar el DPPH. (% de inhibición o atrapamiento) se determina a partir de la siguiente ecuación:

$$Inhibición\ DPPH = \frac{A_i - A_t}{A_i} \times 100$$

Donde A_i es la absorbancia control y A_t la absorbancia de la muestra.

g) Hongo *Fusarium oxysporum.f. sp cubense*.

Los hongos son organismos eucariotas tanto unicelulares como pluricelulares que se encuentran en ambientes húmedos y con poca luz. En su estructura, las células de los hongos se agrupan en filamentos llamados hifas en su conjunto forman lo que se conoce como micelio. Existen distintos tipos de hongos que atacan a las plantas, siendo cada uno de ellos específico para uno o más tipos de plantas. Algunos hongos se consideran parásitos obligados o biotrófos, ya que requieren establecer una asociación con las plantas para poder crecer y reproducirse a lo largo de todo su ciclo de vida. Otros hongos, conocidos como parásitos no obligados, pueden requerir de una planta hospedante en ciertas etapas de su ciclo de vida, pero pueden completar su desarrollo en materia orgánica muerta o seguir creciendo y reproduciéndose tanto en plantas vivas como en materia muerta. En resumen, los hongos tienen diferentes estrategias de parasitismo y relación con las plantas. [44]

El Hongo *Fusarium oxysporum.f.sp. cubense* (Foc), en su variante Raza 4 tropical (R4T) cubense es responsable de causar la enfermedad conocida como marchitamiento por *Fusarium* (fusariosis de las musáceas y fusarium de las musáceas). Esta enfermedad provoca procesos infecciosos que pueden resultar en la muerte de plantas del género *Musa* spp., afectando a varias especies de plátanos y bananas, incluyendo cultivos, como Cavendish, Lakatan y Pisang , así como otros cultivos susceptibles a las razas 1 y 2, como Gros Michel, Silk, Pome y Bluggoe. Debido a los significativos daños económicos, sociales y ambientales que ha ocasionado, se considera que esta enfermedad es la más destructiva para las musáceas a nivel mundial. En las últimas décadas, ha tenido una amplia distribución geográfica debido a la falta de control químico efectivo y la capacidad del agente causante de sobrevivir en el suelo durante largos periodos [46]. En Venezuela, la enfermedad del marchitamiento por fusarium afecta principalmente a variedades locales de plátano y banano como cambur ‘manzano’, ‘cuyaco’ (gros Michel, musa aaa) y ‘topocho’ (musa abb) etc. [47].

Los indicios externos e internos que indican la contaminación de plantas con el hongo *Fusarium oxysporum. f. sp. cubense* muestran en la Figuras 12 y 13 respectivamente [48]:

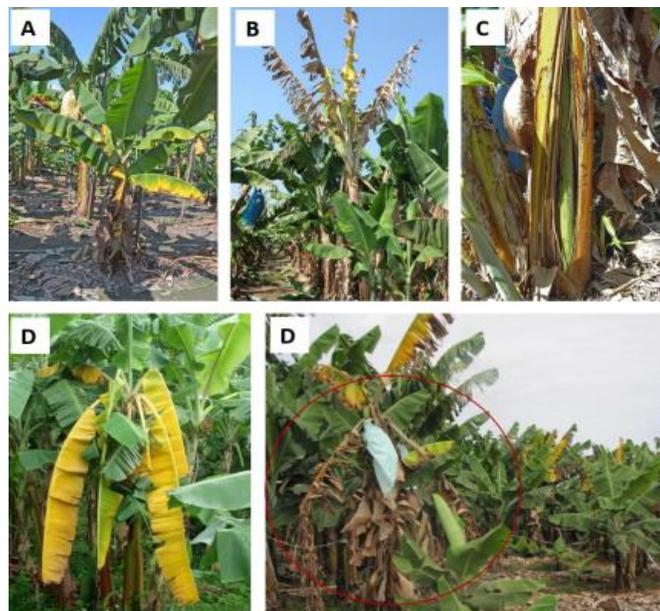


Figura 12. Síntomas causados por *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* Raza 4 Tropical en plantas de plátano. A) Amarillamiento típico, en el margen de las hojas

más viejas. B) Hoja seca y de color café. C) Agrietamiento del pseudotallo. D y E) Colapso de las hojas más viejas, suspendidas del pseudotallo en forma de “falda”. [47]:

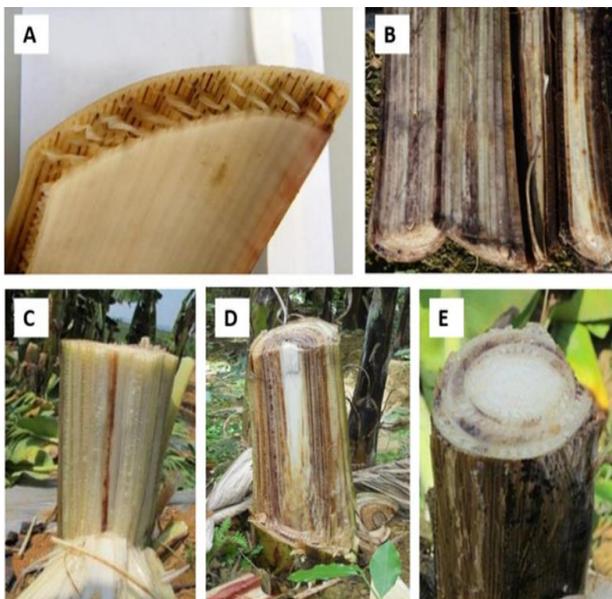


Figura 13. Indicios internos causados por *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Cúbense* Raza 4 Tropical en plantas de plátano. A) Decoloración de los haces vasculares de la base de la hoja en Cavendish (cv. Williams). B, C y D) Corte longitudinal, decoloración café-rojo de los haces vasculares en el pseudotallo. E) Corte transversal, de coloración café-rojo de los haces vasculares en el pseudotallo.[48]

Los síntomas externos se caracterizan por un amarillamiento uniforme de las hojas adultas a lo largo del margen foliar (Figura 12A), el cual se extiende hacia la nervadura central de la hoja, hasta que esta queda completamente seca y de color café (Figura 12B); puede o no manifestarse un agrietamiento en la base del pseudotallo (Figura 12C). Posteriormente, todas las hojas se marchitan, quedan suspendidas de la planta y unidas al pseudotallo (Figura 12D y 12E). En algunos cultivares las hojas permanecen verdes hasta que el peciolo se curva y colapsa. Los síntomas internos se caracterizan por un cambio de color de los haces vasculares el cual se observa al cortar las raíces, el cormo o el pseudotallo. Esta decoloración del tejido vascular (amarilla o café-oscuro) avanza hacia los haces vasculares del pseudotallo y algunas veces en el raquis. La primera decoloración vascular ocurre en las vainas de las hojas externas del pseudotallo, las más internas cambian de color al final (Figura 13A). Al realizar un

corte vertical del pseudotallo de una planta infectada, se observan líneas color café, rojo o amarillo; mientras que en un corte transversal se observan en forma de anillos (Figura 13B-E). En el rizoma se observan manchas y filamentos de color amarillo.

h) Ensayos Invitro para evaluación de la actividad antifúngica de las Cu-NPs frente a fitopatógenos

- **Método del envenenamiento de medio:**

A los extractos vegetales y nanopartículas obtenidas se les evalúa su potencial biológico en los diferentes modelos biológicos a nivel in vitro e in vivo. En su mayoría los métodos de evaluación biológica sobre hongos fitopatógenos consisten en la exposición del hongo a diferentes concentraciones de extracto en medio agar papa dextrosa (PDA). Uno de los métodos comúnmente empleados es el envenenamiento del medio de cultivo en el cual se adiciona una concentración conocida de extracto disuelta en el medio de cultivo junto con un testigo absoluto y posteriormente se adiciona el inóculo del patógeno en el centro de la cápsula[49]:

- **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria mediante métodos de dilución.**

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en un medio de cultivo (caldo o agar). La ventaja de los métodos de dilución radica en una mayor sensibilidad cuando se trabaja con bajas concentraciones de antimicrobiano y, además, permite determinar si hay efecto bactericida (muerte del microorganismo) o efecto bacteriostático (inhibición de crecimiento). Por otra parte, la gran cantidad de variables (microorganismo, medio de cultivo, inóculo) que influyen en

estos métodos son responsables de una variabilidad en el resultado obtenido, por lo que para su correcta evaluación es necesario que se realicen de forma estandarizada.[50]

- **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria mediante el método de Envenenamiento del medio [50]**

En este método se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar, se inocula con el microorganismo en el centro de la placa y se observa si hay crecimiento del microorganismo. El procedimiento (Figura14) consta de tres etapas: preparación del antimicrobiano, preparación e incorporación del inóculo y lectura del resultado. En primer lugar, se incorporará el antimicrobiano en el agar (1). En la mayoría de los casos, el medio de cultivo a emplear es agar, pero en función de los microorganismos y de sus necesidades nutritivas puede ser adecuado o necesario añadir algún suplemento a este medio, o incluso, emplear un medio diferente. Para ello, se esteriliza el agar y se deja enfriar a 50°C, momento en cual se adicionan los suplementos (si fuera necesario) y la solución del antimicrobiano. Hay que tener en cuenta la dilución en el agar para el cálculo final de la concentración de antimicrobiano. El pH del medio debe estar comprendido entre 7.2 y 7.4. Tras la incorporación del antimicrobiano, se mezcla bien y se vierte en las placas Petri (3-4 mm de espesor) evitando en todo momento la formación de burbujas. Posteriormente se dejan solidificar las placas, que se usarán inmediatamente o se almacenarán en frigorífico en bolsas de plástico.

Una vez preparadas las placas, se procede a preparar el inóculo. La concentración del mismo debe ser aproximadamente de 10^5 UFC/mL. Existen diferentes métodos para determinar la concentración del inóculo: usando la escala de Macfarlán, a continuación, se deposita una gota del inóculo (aproximadamente 10^4 UFC/mL) y se mantienen a temperatura ambiente hasta que las gotas se hayan secado (2). En una misma placa se puede depositar gotas con inóculos de diferentes microorganismos.

Paralelamente, se inocula una placa control sin antimicrobiano. Posteriormente se incuban durante un tiempo y a una temperatura adecuada para el microorganismo (3). Finalmente se determina la CMI (4), siendo la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano. Para ello no se considera crecimiento la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo).[51]

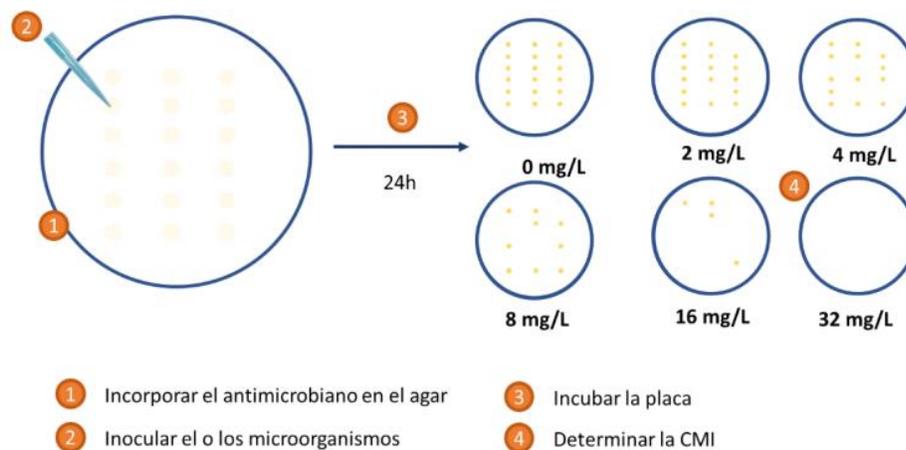


Figura 14. Esquema del proceso de determinación de la CMI mediante el método de envenenamiento.). [50]

II. Antecedentes

A continuación, se muestra una revisión de publicaciones relacionadas con el uso de extractos de plantas en la producción de nanopartículas de cobre y la evaluación de su actividad antifúngica.

Pariona y colaboradores en el 2019 [51] reportaron la síntesis verde en medio acuoso de nanopartículas de cobre utilizando citrato de sodio tribásico deshidratado, sulfato de cobre pentahidratado, ácido ascórbico e hidróxido de sodio. Como se observa en la Figura 15, obtuvieron partículas con tamaños entre 200 y 500 nm.

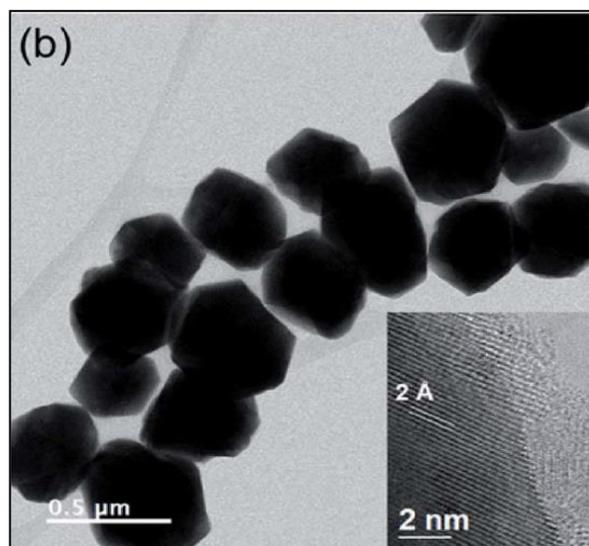


Figura 15. Micrografía de TEM de las partículas de cobre obtenidas. El recuadro muestra una imagen de TEM de alta resolución del borde de las partículas obtenidas

Al determinar la actividad antifúngica contra los hongos *Fusarium solani*, *Neofusicoccum sp.* y *Fusarium oxysporum*, mostraron una alta actividad antifúngica. Figura 16

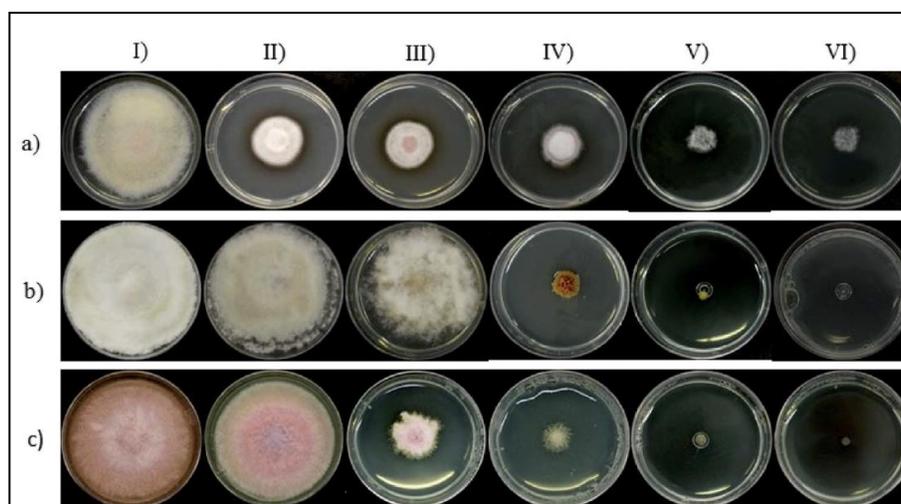


Figura 16. Actividad antifúngica de las partículas de cobre contra: (a) *Fusarium solani*, (b) *Neofusicoccum sp.* and (c) *Fusarium oxysporum*. Las columnas indican diferentes concentraciones de partículas de cobre: (I) 0 (control), (II) 0.1, (III) 0.25, (IV) 0.5, (V) 0.75 and (VI) 1.0 mg / mL de partículas de cobre. (51)

En 2020 **Mali** y colaboradores [52] publicaron un artículo donde reportan una ruta verde para la síntesis de CuNP utilizando extracto acuoso de hojas de

C.paniculatus, y la evaluación de su actividad antifúngica frente al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Los estudios TEM (Figura. 17) revelaron la forma esférica de partículas con un tamaño que oscilaba entre 2 y 10 nm con un diámetro promedio de partícula de 5 nm.

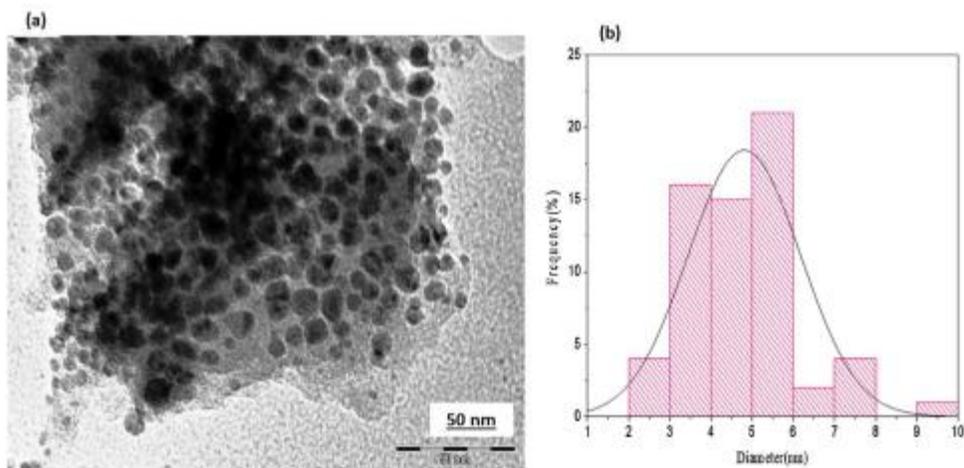


Figura 17. (a) Micrografía TEM de CuNPs. (b) Histograma de distribución de tamaño de CuNps[52]

En la Figura 18, se puede observar que las nanopartículas mostraron una buena actividad antifúngica frente al *Fusarium oxysporum* con 76,29 -1,52 % de inhibición micelial máxima.

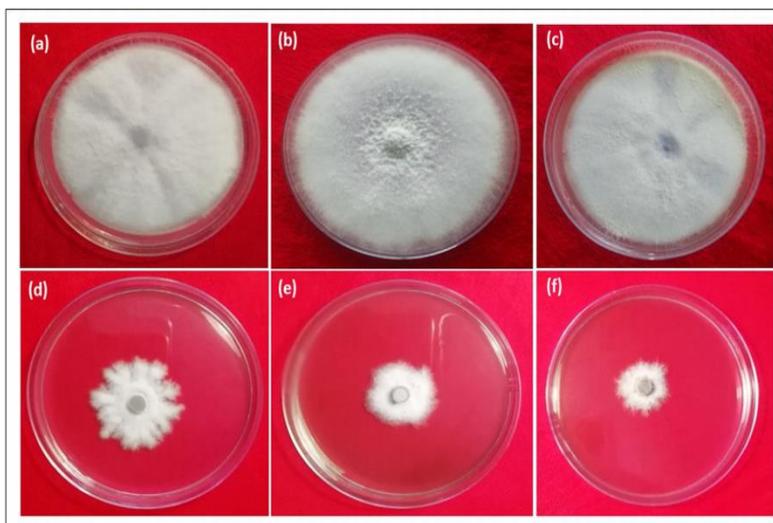


Figura 18. Actividad antifúngica (a) control (b) extracto de planta (c) 1% de CuSO₄ y CuNP (d, e, f) 0,12%; 0,18% y 0,24 % respectivamente [52]

En 2020 **Iliger** y colaboradores [53] reportaron la síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre para evaluar su eficacia contra el patógeno de la pudrición de la fruta del cultivo de chile, el hongo *Colletotrichum capsici*. La síntesis verde de nanopartículas se realizó a partir de extractos acuosos de hojas de Eucalipto y Menta. El tamaño medio de estas partículas sintetizadas por el extracto de hoja de eucalipto (CuNP-E) osciló entre 10 y 130 nm, mientras que el tamaño de las partículas sintetizadas con extracto de hoja de menta (CuNP-M) osciló entre 23 y 39 nm, lo que confirma su tamaño nanométrico (Figura 19).

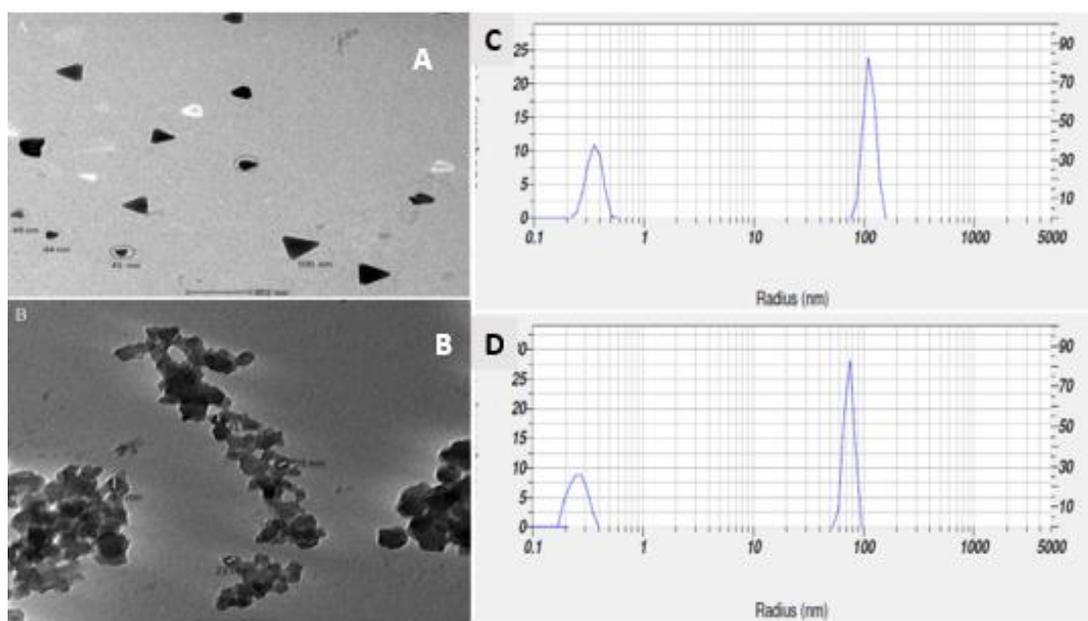


Figura 19. Imagen TEM de CuNPs estabilizadas con (A) Extracto de eucalyptus and (B) Extracto de menta. (C) Tamaño de partícula por DLS de NPs Cu en Eucalipto y (D) Tamaño de partícula por DLS de NPs Cu en menta [53]

Estas nanopartículas de cobre sintetizadas se evaluaron frente a la inhibición del micelio del hongo *Colletotrichum Capsici* encontrando que estos sistemas muestran una alta efectividad a bajas concentraciones de nanopartículas de cobre en comparación con los fungicidas convencionales. Tabla 2.

Tabla 2. Efecto de las nanopartículas sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum capsici* después de 10 días de incubación

Concentration Treatments	Mycelial diameter (mm)							
	25 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	
CuNP-E	63.50	50.42	47.50	38.25	32.83	11.25	4.75	
CuNP-M	61.42	45.25	38.58	30.92	27.83	4.75	0.25	
Carbendazim 50 WP*	20.75	20.75	20.75	20.75	20.75	20.75	20.75	
Copper oxychloride 50 WP**	11.25	11.25	11.25	11.25	11.25	11.25	11.25	
Control	76.00	76.00	76.00	76.00	76.00	76.00	76.00	
Mean	46.58	40.73	38.82	35.43	33.73	24.80	22.60	
CD $p \leq 0.05$								
Treatments 0.44	Concentrations 0.52	Treatment \times Concentration 1.18						

* 500 ppm.

** 2500 ppm.

En 2021, **Sánchez [54]**, reportó la síntesis de nanopartículas de cobre y óxidos de cobre mediante extracto acuoso de *Larrea tridentata*, una planta ampliamente distribuida en el territorio mexicano con una diversidad fitoquímica atractiva como reactivo ecológico para la biorreducción y como agente de recubrimiento. El proceso de reacción fue asistido por agitación empleando cloruro de cobre como precursor. Como se puede ver en la Figura 20, se obtuvieron nanopartículas de cobre con tamaños promedio de 590.7 nm (Figura 20a) y nanopartículas de óxido de cobre con tamaño promedio de 378.7 nm. (Figura 20b)

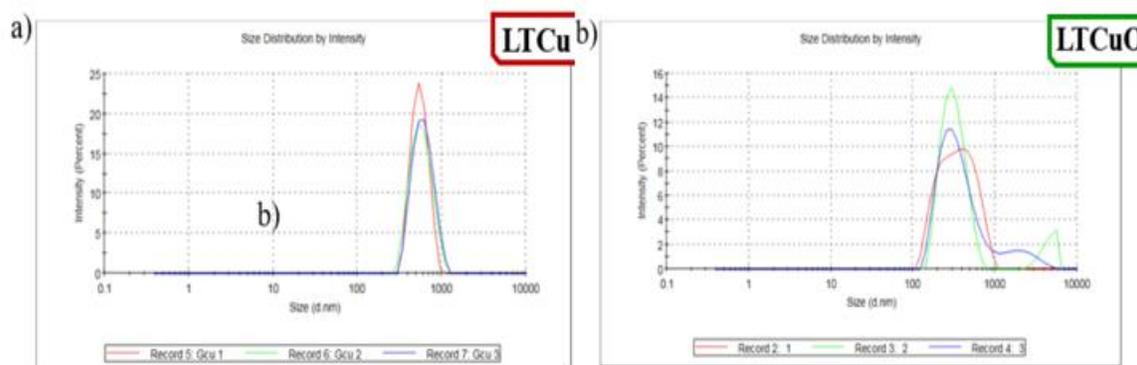


Figura 20. Distribución de tamaños mediante DLS de (a) CuNps y b) CuO NP[54]

En las Figuras 21 y 22 se observa que obtuvieron los materiales LTCu y LTCuO con aglomeración. En la Figura 21 se muestra la morfología de LTCu cuasi-esférica. En la Figura 22 se observa que el sistema LTCuO mostró una morfología poliédrica

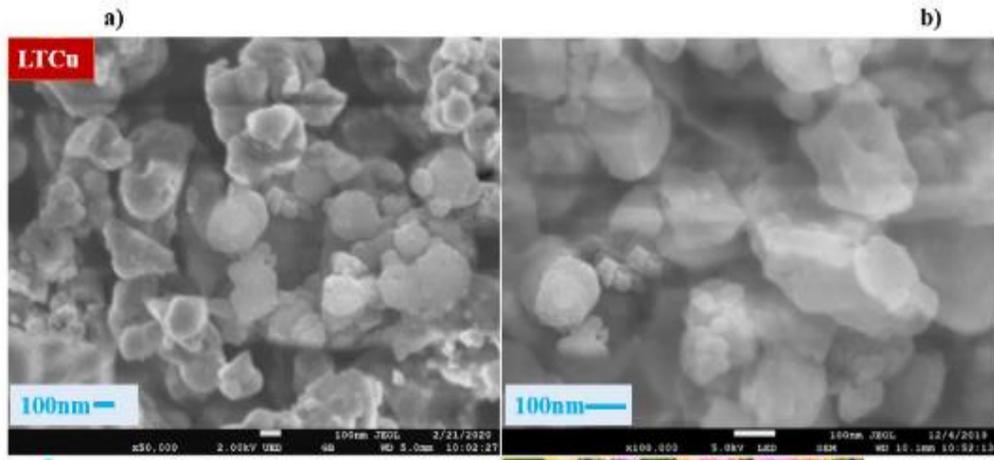


Figura 21. Micrografías de las nanopartículas de cobre (LTCu): a)50,000x, b) 100,000x[54]

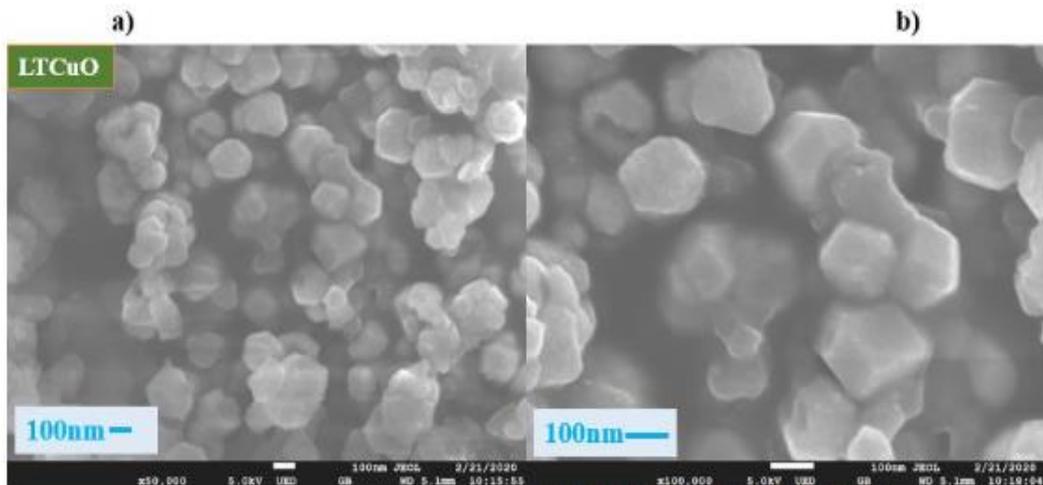


Figura 22. Micrografías de las nanopartículas de óxido de cobre (LTCuO): a) 50,000x,b) 100,000x [54]

Para evaluar el desempeño de LTCu y LTCuO en la degradación de colorantes se empleó azul de metileno se puede observar en la Figura 23 que el sistema LTCu mostró resultados de degradación favorables incluso en oscuridad, mientras que el desempeño de LTCuO fue menor

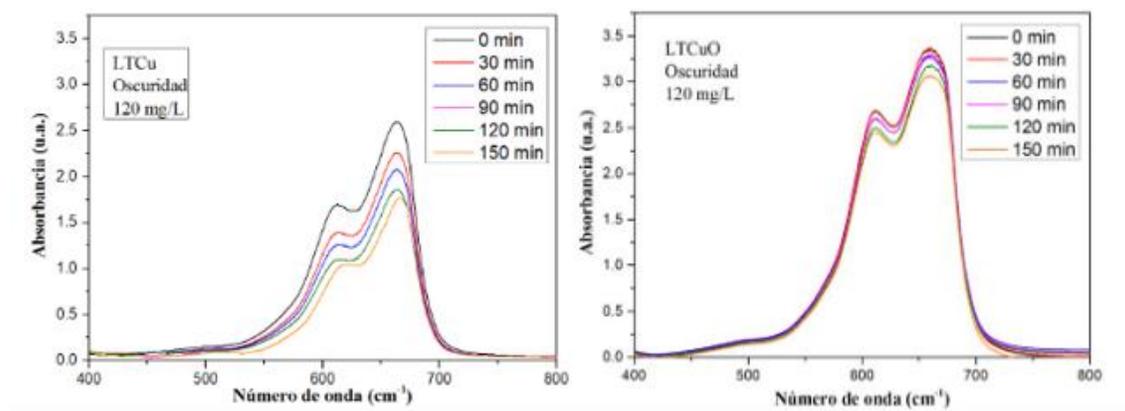


Figura 23. Degradación de AM por LTCu y LTCuO (120 ppm) en oscuridad [54]

En la Figura 24 se muestra la evaluación de la actividad antifúngica de LTCu y LTCuO contra *Fusarium euwallaceae*, *Fusarium solani* y *Colletotrichum gloeosporioides*, respectivamente. Se identificó el efecto inhibitor de LTCu contra el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos fue menor al obtenido con el sistema LTCuO.

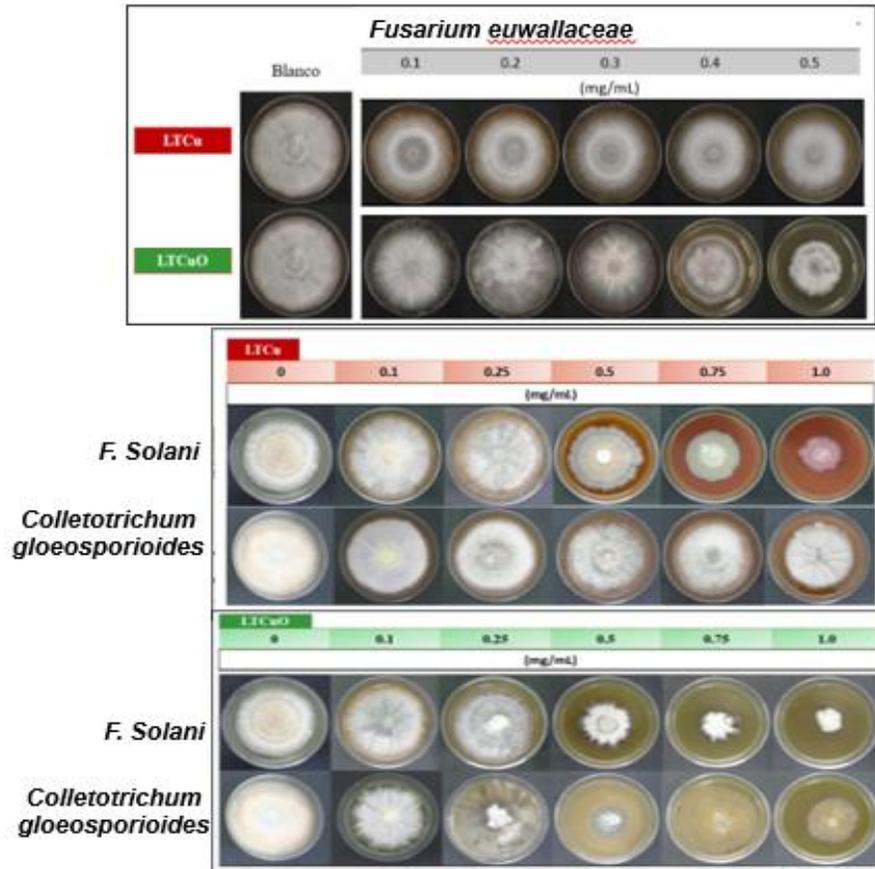


Figura 24. Crecimiento micelial radial de patógenos bajo estudio con LTCu y LTCuO [54]

En el mismo año **Mahdi Bikeloo** y colaboradores [55] reportaron la síntesis verde nanopartículas de cobre utilizando el extracto de *Rosmarinus officinalis*. El tamaño de las nanopartículas de cobre obtenido fue de aproximadamente 100-300 nm (Figura 25).

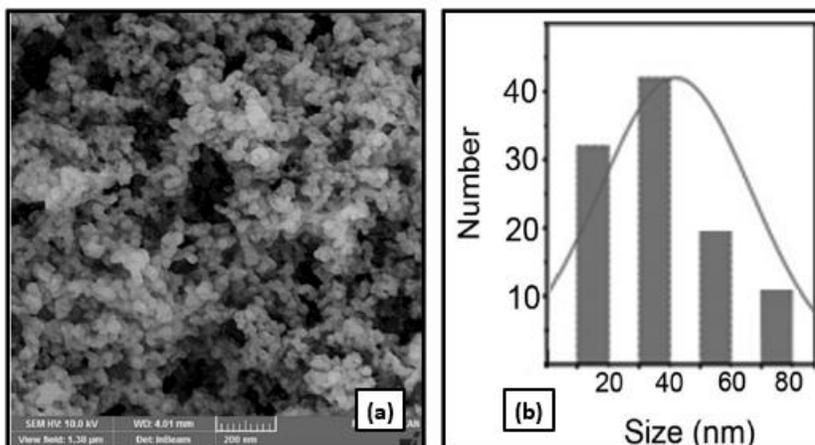


Figura 25. a) SEM nanopartículas de Cobre; (b) Perfil de distribución de tamaño de nanopartículas de cobre [55]

Al examinar la actividad antifúngica in vitro de nanopartículas de cobre verde contra *B. cinérea* mostraron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento del patógeno *B. cinérea* en comparación con el control. En cultivo in vitro, las tasas inhibitorias de nanopartículas de cobre a concentraciones de 0, 3, 7, 11 y 15 mmol/l fueron del 45.71%, 74.78%, 85.43% y 100%, respectivamente, cinco días después de la inoculación (Figura.26)

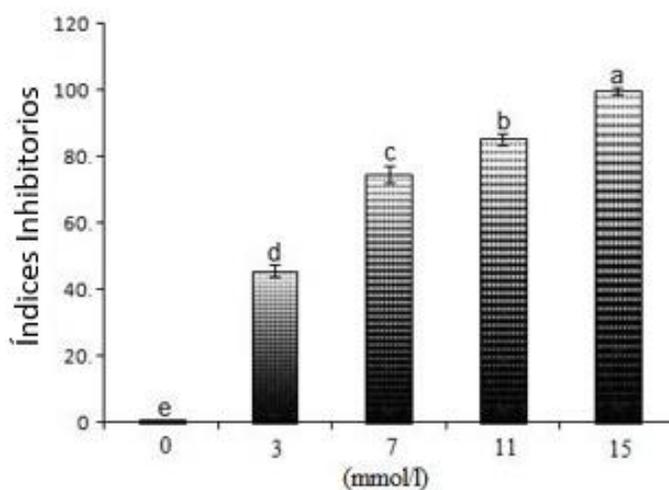


Figura 26. Actividad antifúngica de nanopartículas de cobre a diferentes concentraciones contra *B. cinérea* [55]

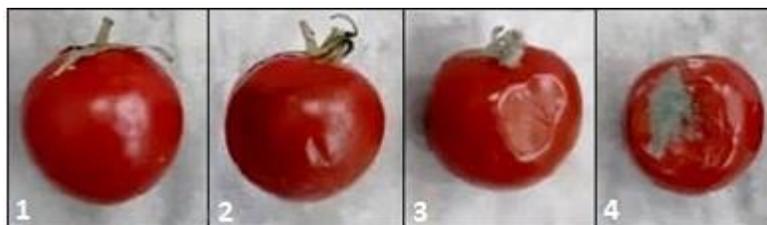


Figura 27. Efecto de las nanopartículas de cobre en la descomposición microbiana del tomate mantenido a 24 °C durante 10 días. [55]

Como puede observarse en la Figura 27, la calidad de frutos de tomate a los 10 días después de inoculados artificialmente por *Botrytis cinerea* mantenidos a 24 °C se mejoraron al aumentar las concentraciones de nanopartículas de cobre. De acuerdo con estos resultados, las nanopartículas de cobre pueden ser una buena alternativa para disminuir las pudriciones de frutos de tomate en comparación con fungicidas químicos.

En el 2023 **Ifeoluwa Israely** colaboradores [56] reportaron la determinación cualitativa de los fitoquímicos presentes en el extracto etanólico de la fruta africana *Kigelia* revelando la presencia de alcaloides, glucósidos, quinonas, saponinas, flavonoides, fenoles, carbohidratos, esteroides, taninos, terpenoides y antraquinona. El extracto fue usado como agente reductor y estabilizante en la síntesis de nanopartículas de cobre. Obtuvieron nanopartículas de cobre metálico, lo que se puede observar en el espectro UV-Vis (Figura 28) con una banda de absorción según ubicada en la región de 560 cm^{-1} a 600 cm^{-1} , y se observa la banda correspondiente a extracto del estabilizante de la fruta entre 265 y 300 nm atribuibles a compuestos fenólicos. Estas partículas se probaron como antifúngicos frente a dos hongos patógenos: *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*. Las CuNP mostraron una considerable actividad inhibitoria de $8,0 \pm 2,83\text{ mm}$ y $3,0 \pm 4,24\text{ mm}$ respectivamente lo que se observa en la (Figura 29).

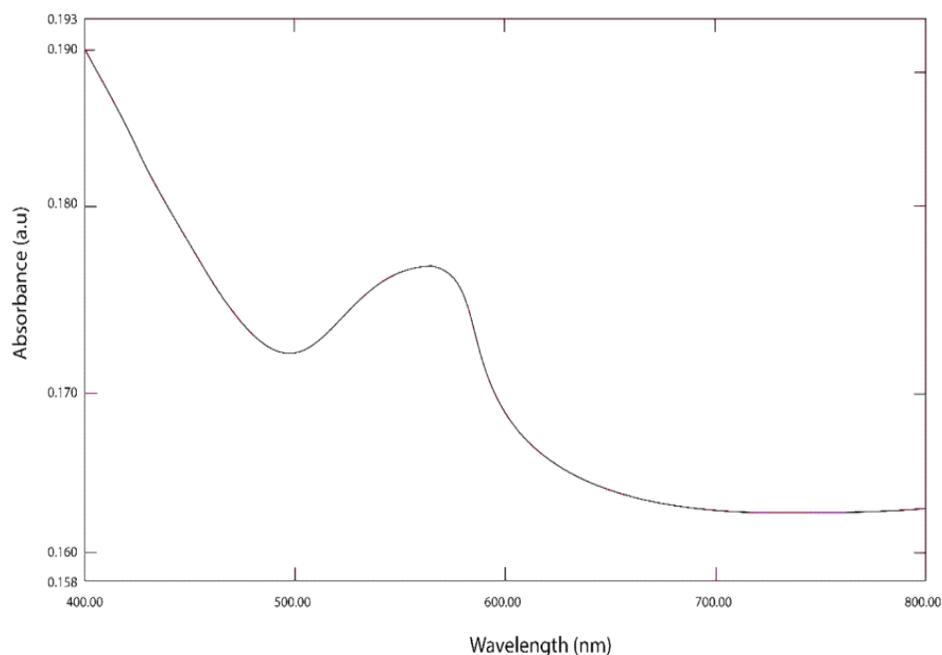


Figura 28. Espectroscopia UV para las nanopartículas de cobre sintetizadas.[56]

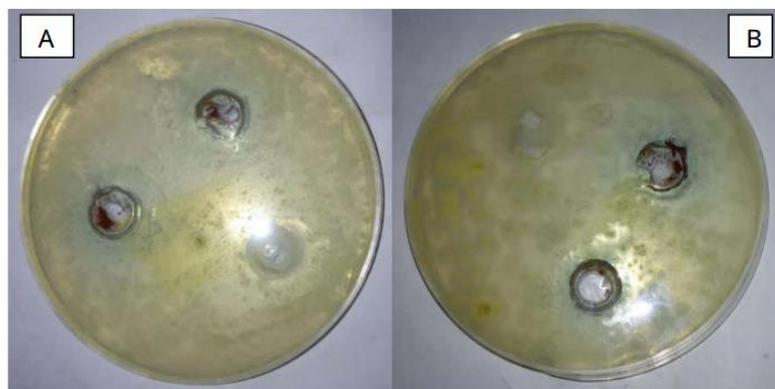


Figura 29. Zona de inhibición alrededor de discos impregnados con nanopartículas de cobre contra: (A) *Aspergillus niger*; (B) *Aspergillus flavus*[56]

Manogar P., Raja V., Simón D., y colaboradores [57] en 2023 publicaron un trabajo sobre la síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de cobre(II) utilizando extracto de hojas de *Morinda citrifolia* y el estudio de su actividad antifúngica y antibacteriana. El extracto de hoja de *Morinda citrifolia* se mezcló con una solución de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de sodio como

catalizador. Formaron nanopartículas de cobre muy estables, con forma de esfera y tamaños de partículas entre 20 y 50 nm (Figura 30).

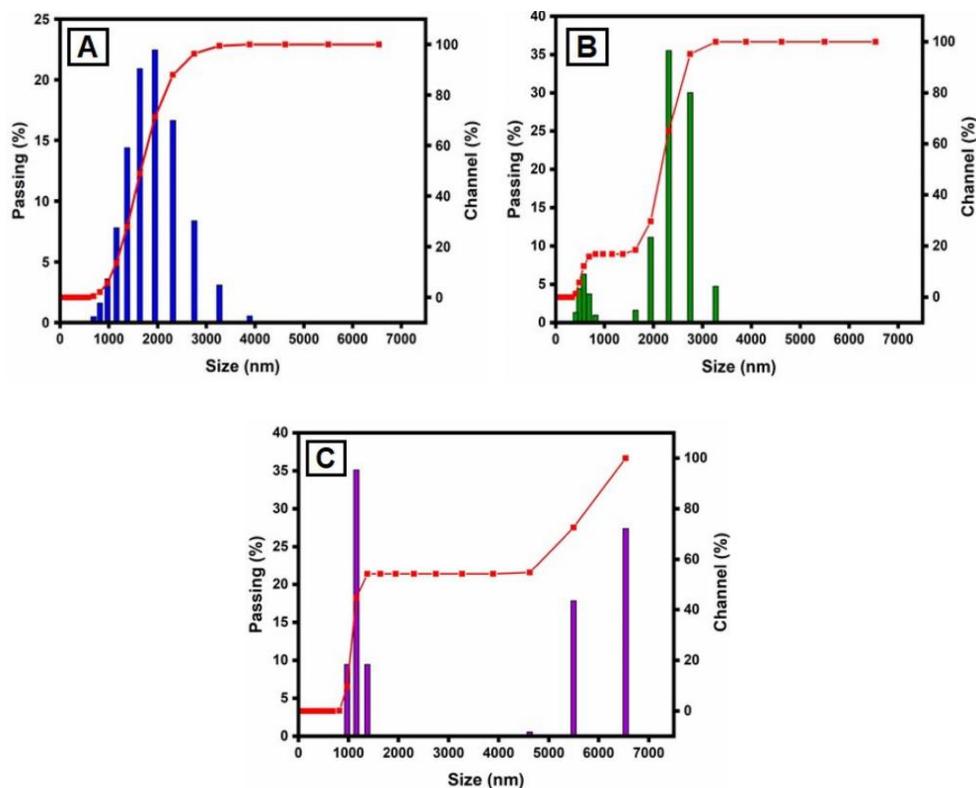


Figura 30. Distribución del tamaño de partícula (PSD) de las NP de CuO sintetizadas mediante los métodos DLS, para variar $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de concentración: (A) 15 μL ; (B) 20 μL y (C) 25 μL .

El espectro UV-Vis de la síntesis de nanopartículas de óxido de cobre en solución coloidal se observó en longitudes de onda que oscilaban entre 200 y 800 nm. Dentro del proceso de síntesis, el espectro de absorción UV-visible reveló un cambio hacia el azul a medida que aumentaba el porcentaje de extracto vegetal en la mezcla resultante. Se encontró una máxima de absorción a 256 nm, que podría asignarse a la resonancia de plasmón superficial (SPR) de NP de CuO.

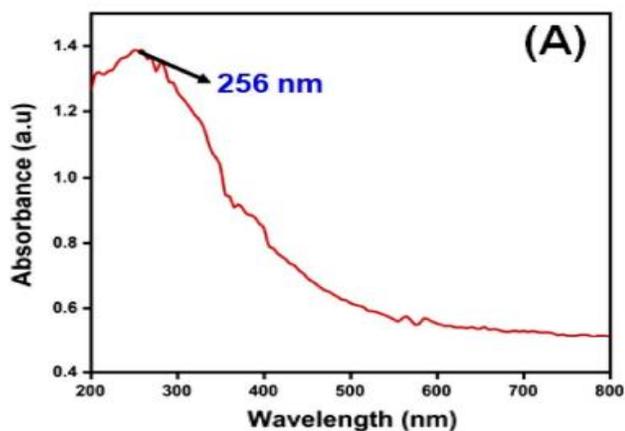


Figura 31. (A) espectroscopia UV-visible de NP de CuO sintetizadas verde [57]

En la Figura 32. Se muestran los espectros de FTIR en KBr (tomados entre 4000 y 400 cm^{-1}) del extracto de *Morinda citrifolia* y el de las NP de CuO estabilizadas con el extracto de planta. Se observó la existencia de diferentes grupos funcionales que ayudaron en la reducción química y estabilización de las nanopartículas, así como la presencia de una banda típica de la vibración Cu-O

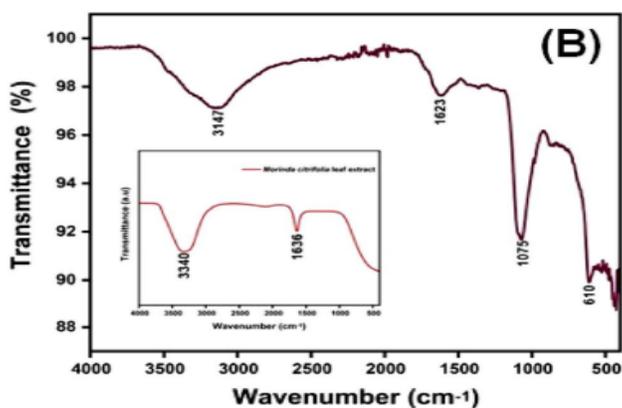


Figura 32. (B) espectros FTIR del extracto de *Morinda citrifolia* y nanopartículas de cobre

La medición XRD de las NP de CuO, revelaron las características cristalinas de las nanopartículas de cobre obtenidas.

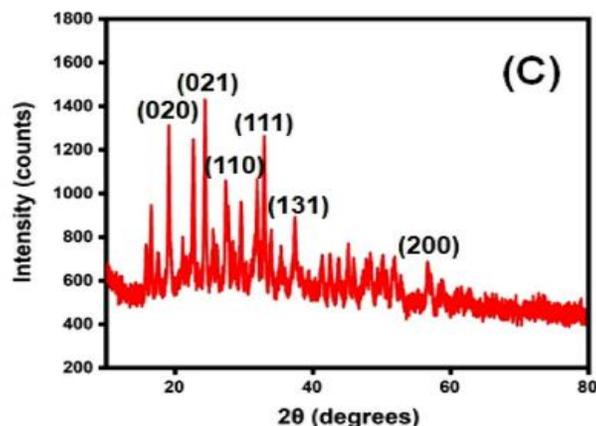


Figura 33. (C) Patrón XRD de las nanopartículas de CuO.

Las NP de CuO mostraron una fuerte actividad antibacteriana contra las bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, y *Estafilococo aureus*) y bacteria Gram negativas (*Escherichia coli*), así como actividad antifúngica frente a los hongos . *Aspergillus flavus* , *Aspergillus niger* y *Penicillium frequentans*. Como resultado, los datos muestran que la actividad antifúngica de las NP de CuO es mayor que su actividad antibacteriana. (Figura 34)

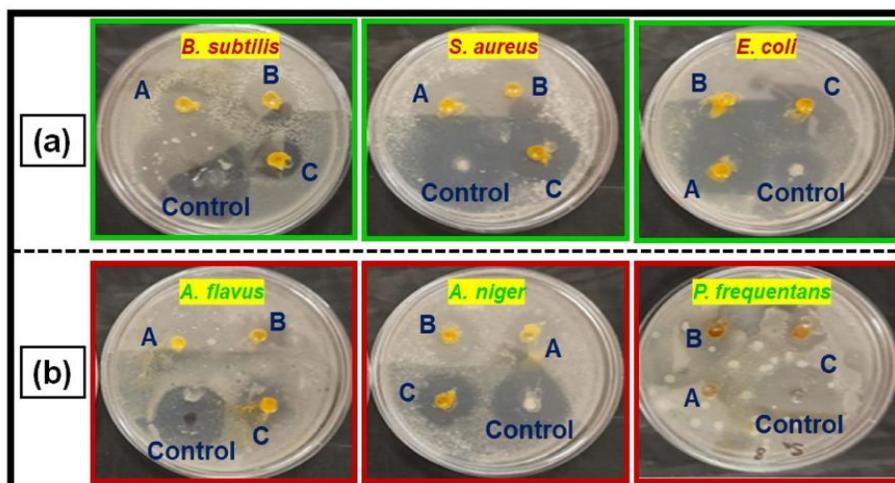


Figura 34. (a) Actividad antibacteriana, y (b) actividad antifúngica de nanopartículas de óxido de cobre estabilizadas con extracto de *Morinda citrifolia*; (A) 15 I, (B) 20 I y (C) 25 I; y control de Np CuO. [57]

En 2023 **Sozan E. El-Abeid, Mohamed A. Mosa** y colaboradores [58] publicaron el trabajo de la actividad antifúngica de nanopartículas de óxido de

cobre derivadas de extracto de hoja de *Zizyphus espinia* contra la pudrición de la raíz por *Fusarium* en plantas de tomate. Obtuvieron nanopartículas de CuO-Zs-NP de forma esférica con un rango de tamaño de partícula de 13,4 - 30,9 nm y tamaño promedio de 34,1 nm ($\pm 4,379$) Figura 35. El espectro UV-visible de las nanopartículas de óxido de cobre bio sintetizadas (CuO-Zs-NPs) mostraron una banda de absorción intensa ubicada aproximadamente a 290 nm, que representa la síntesis exitosa de nanopartículas (NP) de CuO (Figura 35). Como se muestra en la Figura 36, en donde se compara el espectro IRFT del extracto de la planta con el espectro IRFT de las nanopartículas sintetizadas, el extracto de la planta no tan solo fungió como agente reductor, sino que también estabilizó las nanopartículas

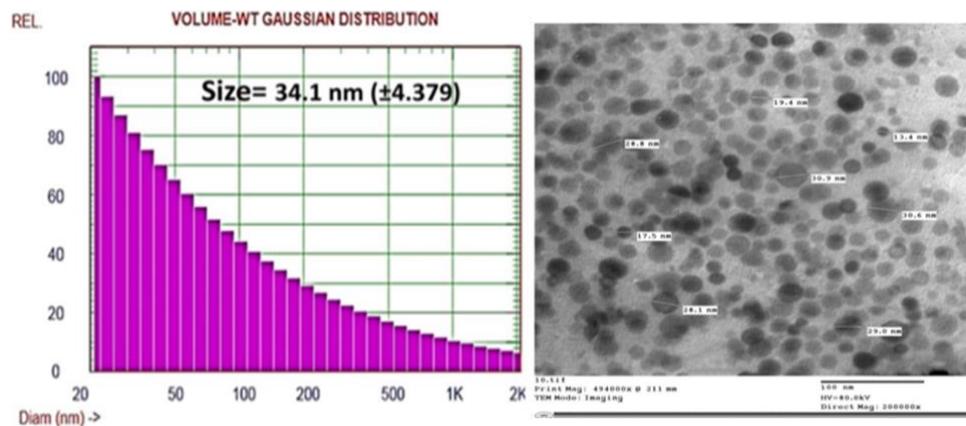


Figura 35. Análisis de distribución del tamaño de CuO Zs NP y Imagen de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de las CuO Zs NP formadas [58]

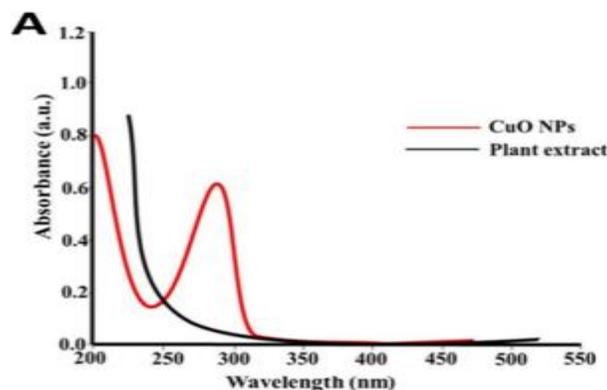


Figura 36. (A) Análisis espectroscópico UV-vis de las CuO-Zs-NP producidas y del extracto de plantas [58]

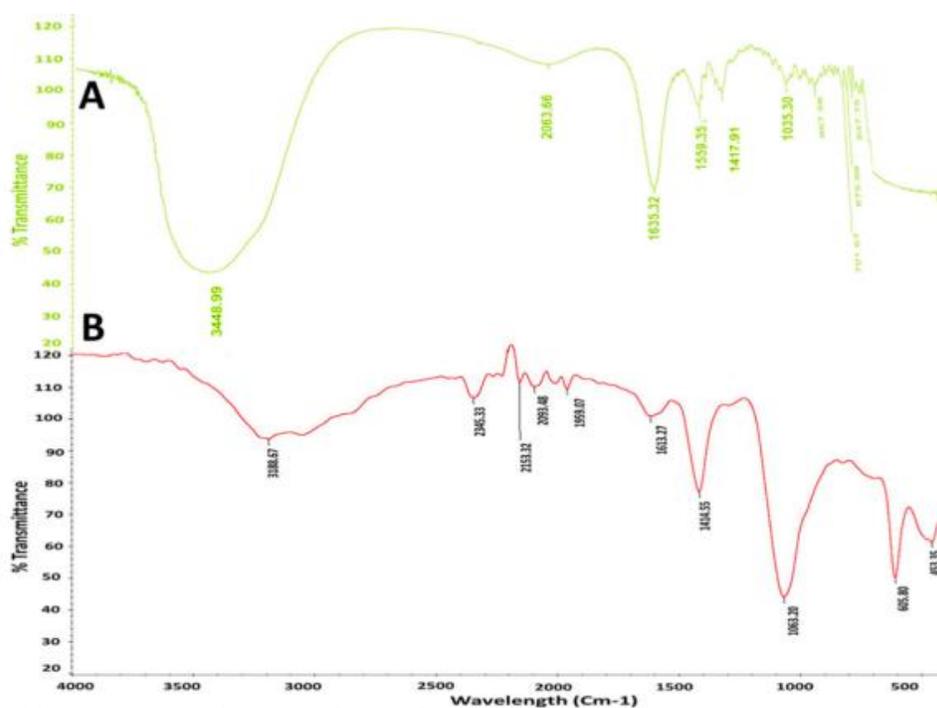


Figura 37. A) Análisis del espectro FT-IR del extracto de hojas de *Zizyphus espina* y B) CuO-Zs-NP formados (B) [58]

Los sistemas de nanopartículas sintetizadas CuO-Zs-NP mostraron posibles propiedades antifúngicas prometedoras in vitro e in vivo contra la cepa fúngica seleccionada de *F. solani* causante de la enfermedad de la pudrición de la raíz del tomate. Los resultados in vivo indicaron que, para todas las concentraciones de CuO-Zs-NP, se produjo una reducción significativa en la pudrición de la raíz por

Fusarium entre 72,0 y 88,6 % en comparación con el 80,5 % de la gravedad de la enfermedad en el control infectado. (Figura 38)

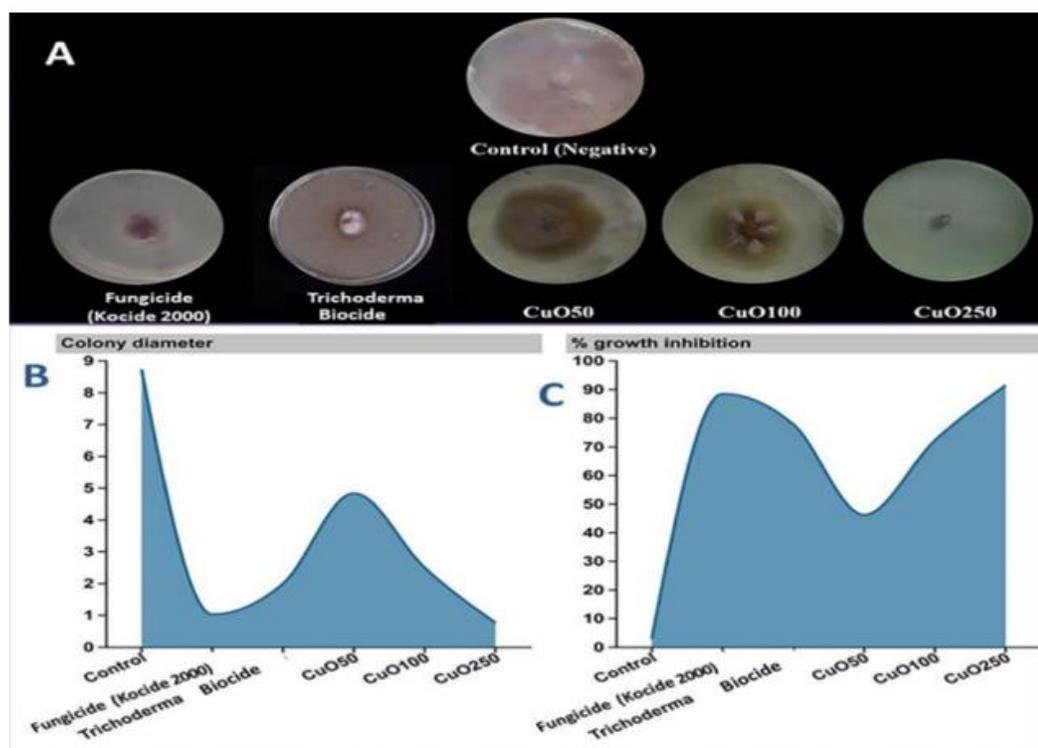
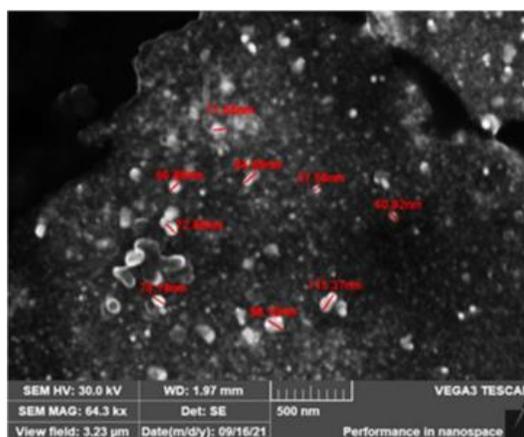


Figura 38. Actividad antifúngica de CuO-Zs-NP en diferentes concentraciones, así como un fungicida comercial (Kocide 2000) y un biocida de Trichoderma contra *Fusarium solani* en medio PDAA: Actividad inhibidora de CuO-Zs-NP contra *F. solani* crecimiento micelial en medio PDA en comparación con el biocida Trichoderma y el fungicida químico B: Sobre el diámetro de la colonia (cm) C: Sobre porcentaje de crecimiento Inhibición (%). [58]

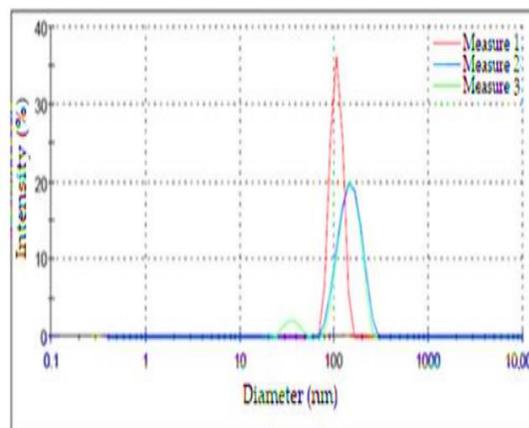
Las CuO-NP inhibieron el crecimiento micelial de FOL en un 67,3 %, en comparación con el 15,6 % de un fungicida comercial basado en hidróxido de cobre, lo que los hace beneficiosos contra diversos patógenos microbianos que atacan a las plantas consideran un reemplazo prometedor de los fungicidas tradicionales en la protección de cultivos.

En 2023 **JM Moreno-Vargas** y colaboradores [59]. Presentaron la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata utilizando nitrato de plata como agente precursor, extracto de hoja de cilantro como agente reductor y tensioactivos, las cuales mostraron actividad antifúngica frente a *Fusarium solani*

y *Rhizopus stolonifera*. Obtuvieron nanopartículas de formas irregulares tendientes a la forma esférica (Figura 39a) con tamaños entre 40 y 60nm (Figura 39 b). Como se observa en la Figura40, la suspensión de nanopartículas generó una banda de absorción en el espectro de UV-Vis en 428 nm indicando la obtención de nanopartículas de plata. El espectro de IRFT del extracto de cilantro (Figura 41) muestra los grupos funcionales responsables de la estabilización de nanopartículas, como carbonilos, hidroxilos, amidas, carboxilos, y grupos fenólicos. El análisis estructural por Difracción de Rayos X (DRX) (Figura 42) presentó el patrón de difracción de AgNP. Identificaron óxido de plata a bajas intensidades indicativa de la presencia de un pequeño número de NP con una capa superficial de óxido de plata en forma de un sistema núcleo-capa.



(a)



(b)

Figura 39 . MEB de nanopartículas de plata (b) Distribución granulométrica según DLS [59]

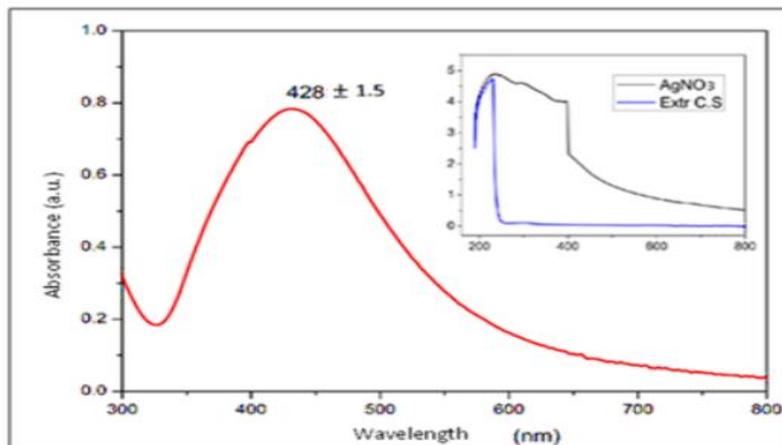


Figura 40 Espectros UV-Vis a diferentes escalas de nanopartículas de plata y *cilantro sativum* con AgNO₃ como precursor. [59]

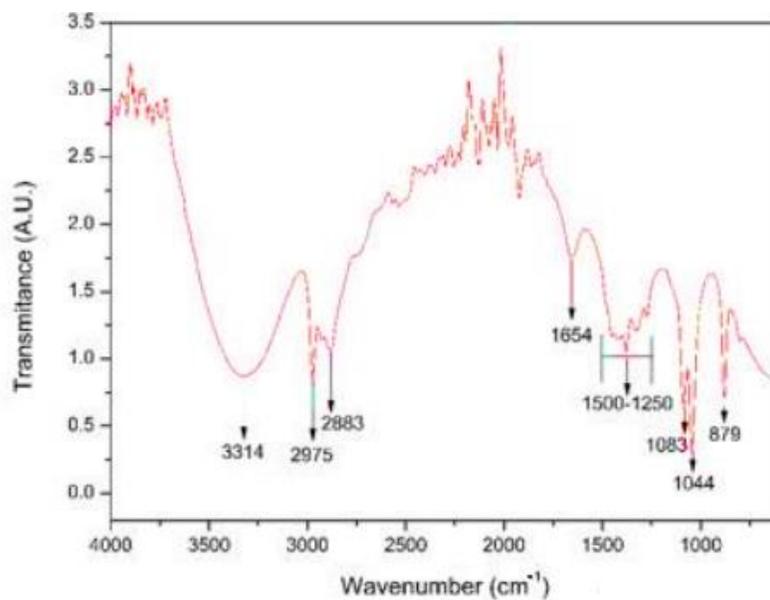


Figura 41 Espectro FTIR del extracto de cilantro (*Coriandrum sativum*). [59]

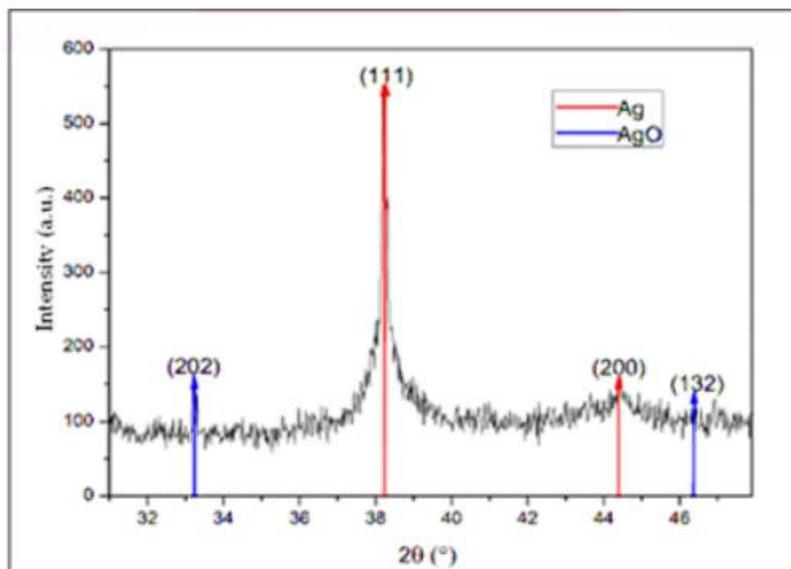


Figura 42 Difractograma XRD de nanopartículas de plata entre $2\theta=30^\circ$ y 48° [59].

Las Pruebas Microbiológicas (Difusión en Agar) se muestran en la Figura 43 el un registro fotográfico del crecimiento de los hongos *Fusarium solani* y *Rhizopus stolonifer* cultivados en agar dopado con concentraciones de 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL y 1 mg/mL de AgNPs en tiempos de observación de 24, 48 y 120 h. Se observa cómo el dopado del agar con AgNP de plata provocó un retraso en el crecimiento de los hongos. Para el hongo *Fusarium solani*, se registró un retraso del crecimiento para concentraciones de 0,1 a 0,5 mg/mL y una inhibición total para una concentración de 1 mg/ mL. De igual manera, esta misma situación ocurrió para el hongo *Rhizopus stolonifer*, aunque el comportamiento de *Rizopus* era algo diferente; fue más agresivo y creció más rápido tanto en la muestra estándar como en las muestras tratadas.

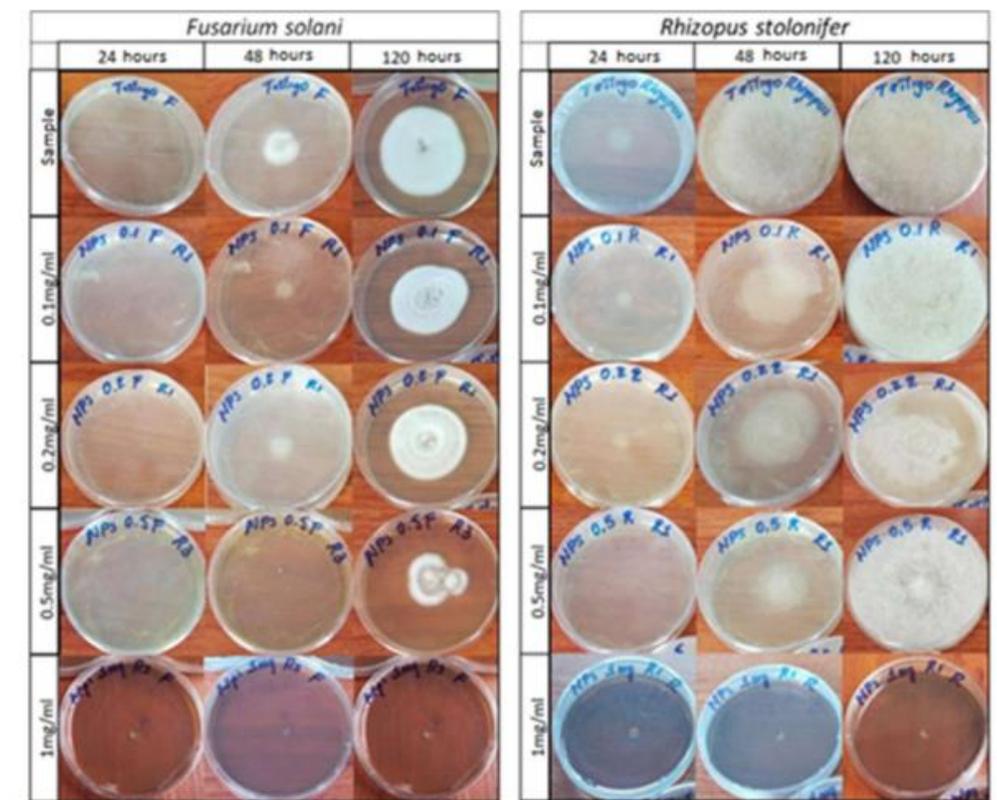


Figura 43. Registro fotográfico del crecimiento de los hongos. *Fusarium solani* y *Rhizopus stolonifer* [59].

La revisión sistemática de estudios cronológicos sobre el uso de nanopartículas metálicas, particularmente aquellas de cobre estabilizadas con extractos vegetales, ha demostrado avances significativos en diversas aplicaciones. Estas nanopartículas han sobresalido por su eficacia en el control de hongos patógenos, la inhibición de bacterias y la degradación de colorantes en medios acuosos, entre otras aplicaciones relevantes. Sin embargo, no se ha reportado hasta la fecha la síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extracto de *Lippia micromera* (orégano) como agente reductor. Se plantea que este sistema podría presentar un efecto sinérgico entre dos agentes antifúngicos: las nanopartículas de cobre y el extracto o infusión de orégano, en la lucha contra *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. En este contexto, la presente investigación se enfoca en la síntesis y caracterización de dichas nanopartículas,

con el objetivo de evaluar su eficacia contra el *Foc* y aportar al desarrollo científico en este campo.

III. Objetivos

1. Objetivo general

Sintetizar nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto acuoso de *Lippia micromera* (Orégano) con potencial actividad antifúngica frente al hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*.

2. Objetivos específicos

- Obtener el extracto acuoso de *Lippia micromera*(orégano)
- Sintetizar nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto acuoso de *Lippia micromera*(orégano)
- Caracterizar las nanopartículas de cobre estabilizadas con *Lippia micromera* (orégano) mediante: a) Dispersión dinámica de luz (DLS); b) Espectroscopía de UV- visible y c) Espectroscopía de Infrarrojo, d) Microscopía de Fuerza Atómica e) Microscopia electrónica de alta resolución f) Difracción de rayos X y f) Microscopia Fotelectrónica de rayos x.
- Evaluar la actividad antifúngica de las nanopartículas de cobre estabilizadas con *Lippia micromera* (orégano) frente al hongo *Fusarium Oxysporum.f. sp cubense* mediante pruebas invitro.

IV. Parte Experimental

1. Condiciones Generales

Todas las síntesis se llevaron a cabo mediante el método de Fitoreducción de sales, utilizando el extracto e infusión de *Lippia Micromera* (Orégano) como agente reductor y estabilizante, y soluciones acuosas de sulfato de cobre. Se probaron varias formas de agitación en las síntesis de nanopartículas tales como a) Agitación magnética en donde se emplearon barras de agitación magnética para mezclar el extracto con la solución precursora de sulfato de cobre b) Agitación ultrasónica utilizando un equipo de ultrasonido AceGlass - High Intensity Ultrasonic Processor, con condiciones de 15 minutos de tiempo (total 30 minutos), pulso de 2,5 segundos/2,5 segundos y amplificación del 40% (US); c) Mezcla simple de extractos o infusiones con la sal precursora de sulfato de cobre sin someter a agitación

La caracterización del extracto e infusión del orégano se realizaron en el Laboratorio de Síntesis Orgánica y Química Medicinal de la Facultad de Ciencias, Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, utilizando un equipo Accuris SmartReader™ UV-Vis Microplate Readers, modelo MR9610

Para la caracterización de las nanopartículas de cobre se usaron las siguientes técnicas:

- **Dispersión dinámica de la luz (DLS).**

Se determinó la distribución de tamaños de las nanopartículas mediante un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS) desarrollado en el laboratorio de espectroscopia laser de la facultad de ciencias de la UCV. Este equipo utiliza un láser de He-Ne de 635 nm de longitud de onda, dos polarizadores para controlar la intensidad del haz, una lente para enfocarlo sobre la muestra y un fotomultiplicador que detecta la luz dispersada a un ángulo variable, transformándola en una señal eléctrica. Los análisis se realizaron bajo las siguientes condiciones: longitud de onda del láser de 635 nm, ángulo de detección de 90° y temperatura de 298K.

- **Microscopia de Fuerza Atómica:**

Se usó el microscopio de Fuerza Atómica (Dimensions Edge, Bruker) en CONTACT MODE para determinar el tamaño y la morfología de las Cu NPs. Las condiciones del registro de medida fueron Set Point: 2.90V; P: 2,0024; I: 1,0087; D: 0.0; Muestras: 512; Líneas: 512; Velocidad de escáner: 0,7 Hz; Rango de escáner: 2.49 μm ; Punta: modelo SNL- 10.

- **Espectroscopia de UV-Visible (UV-Vis):**

Se utilizó un espectrómetro de doble haz Perkin-Elmer modelo Lambda 35 con un software UV Winlab, utilizando el extracto acuoso o infusión de orégano como línea base para sus respectivas nanopartículas.

- **Difracción de rayos X:**

Se utilizó un Equipo: Bruker D2 Phaser, Software: Difrac. Suite. Las Condiciones para la medición del espectro, fueron: Voltaje: 30KV, Corriente: 10mA amstroms, Tubo Cu 1.54184Aamstroms, y ángulo 2θ 30-80.

- **Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (IRFT).**

Se utilizó un equipo de Infrarrojo Perkin Elmer modelo Frontier, con adaptador de lectura para muestras líquidas y software Spectrum 10.

- **Absorción atómica por Llamas (FAAS).**

Equipo: atomic absorption spectrometer, marca perkin Elmer modelo 3110. Patrón de cobre marca: high-purity standard cooper 1000 \pm 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 2% HNO_3

Los estudios de la actividad in vitro tanto de las nanopartículas de cobre como del extracto e infusión se llevaron a cabo utilizando los métodos de envenenamiento y concentración mínima inhibitoria en la Gerencia de Energía y Ambiente del instituto de estudios avanzados (IDEA).

2. Procedimiento Experimental

2.1. Obtención del extracto acuoso e infusión de Orégano

2.1.1. Obtención del extracto acuoso de Orégano:

Se utilizó la metodología utilizada por Figueroa [60] pesando 1,0500 g, 5,0780 g, 10,0054 g, 30,0078 g y 60,0042 g de polvo de hojas de orégano y se suspendieron en 100 mL de agua destilada para preparar concentraciones de 0,01 g/mL, 0,05 g/mL y 0,10 g/mL, 0,3 g/mL y 0,6 g/mL respectivamente. Dichas suspensiones se sometieron a ultrasonido durante 30 minutos, las cuales se filtraron por gravedad y se centrifugaron a 15,000 rpm para separar las partículas vegetales del extracto.



Figura 44. Esquema para la preparación del extracto acuoso de orégano (propio)

4.1.2. Preparación de la Infusión de orégano:

Se colocó en una plancha de calentamiento agua destilada hasta llegar a 60 ° C se tomó 100 ml de esta agua y se agregó en un Becker que contenía 10,0000 g o 30,0000 g de hojas de orégano pulverizado, estas mezclas se mantuvieron a 60°C por 10 min, luego se retiró del

calentamiento se dejó enfriar se filtró, y se centrifugó por 10 min a 6000 rpm a fin de extraer cualquier material sólido de las plantas e la infusión.

2.2. Caracterización del extracto e infusión de las hojas de Orégano evaluación de su actividad antioxidante

2.2.1. Determinación de fenoles totales:

El contenido de fenoles totales del extracto e infusión de orégano se determinó por la técnica colorimétrica, a través del método descrito por la international organization for standarization (ISO) 14502-1 (2005) [61]. Se utilizó ácido gálico como estándar, el método se basó en colocar 20 μL de diluciones del extracto y/o infusión y verterlas por duplicado en columnas de una placa, luego en cada pozo que contenía el extracto y/o infusión se le agregó 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu's se dejó reposar 1 min y se vertieron 80 μL de carbonato de sodio (7,5 % p/v). Luego la mezcla se mantuvo en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora y se midió la absorbancia a 515 nm. El resultado se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto o infusión. [60]

2.2.2. Determinación de Flavonoides totales:

El contenido total de flavonoides del extracto e infusión de orégano se determinó espectrofotométricamente mediante la técnica descrita por Lamaison [42] con algunas modificaciones, el método está basado en la formación de un complejo con aluminio. En resumen, 50 μL de la dilución extracto e infusión se mezclaron cada uno con 50 μL de metanol y 100 μL de solución de AlCl_3 al 2% m/v, en pozos de columnas de una placa; luego se dejó en reposo durante 30 min, posteriormente se midió la absorbancia a 415 nm. El contenido total de flavonoides se calculó a partir de una curva de calibración utilizando concentraciones crecientes de rutina y el resultado se expresó como mg equivalentes de rutina por g extracto). [42]

2.2.3. Actividad antioxidante:

La actividad antioxidante del extracto e infusión de las hojas de orégano, se determinó mediante el ensayo de atrapamiento del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). Para tal fin, se mezclaron 50 μ L del extracto o infusión en 100 μ L de metanol y 50 μ L DPPH, posteriormente fueron incubados en oscuridad a temperatura ambiente 30 min. La absorbancia de la mezcla se registró a 517 nm. La rutina fue utilizada como antioxidante. [43]

2.3. Síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto / infusión de orégano (Cu/Ore).

Se realizaron diversos ensayos de síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto o infusión de orégano a fin de encontrar condiciones óptimas que aseguraran buen rendimiento y tamaños pequeños de nanopartículas de cobre: a) agitación magnética: en esta metodología se variaron parámetros como tiempo, temperatura, pH, concentración de sulfato de cobre, concentración de extracto y relación de volumen de extracto a volumen de sulfato de cobre. b) Agitación ultrasónica: en esta metodología se variaron parámetros como: concentración de sulfato de cobre, concentración de extracto y proporción de volumen de sulfato de cobre/volumen de extracto. c) Síntesis Insitu: mezcla simple de extractos o infusiones con la solución la sal precursora de cobre sin someter a ningún tipo de agitación.

2.3.1. Síntesis de nanopartículas de cobre con extracto utilizando agitación magnética:

Como se muestra en la Figura 45, en un vaso de precipitados de 10 mL se mezclaron soluciones de sulfato de cobre a una concentración de 0,01 M y extracto de orégano a una concentración de 0,1 g/mL, ajustando las proporciones de volumen entre ambos reactivos a 9:1 y 9.5:0.5, respectivamente.

Se controlaron parámetros como el tiempo, la temperatura y el pH según los valores indicados en la tabla 3. La mezcla fue sometida a agitación magnética constante y, posteriormente, centrifugada durante 10 minutos. Finalmente, se lavó con pequeñas porciones de agua destilada para eliminar los residuos de reactivos no deseados.



Figura 45. Esquema para la preparación de las nanopartículas de cobre a partir de extracto acuoso de orégano (propio)

Tabla 3. Condiciones de síntesis para agitación magnética

Ensayo	t (h)	pH	T (°C)	VCuSO ₄ : VOre
Cu/Ore2-Ext	2	5	ambiente	9:1
Cu/Ore3-Ext	2	10	ambiente	9:1
Cu/Ore4-Ext	2	5	80	9:1
Cu/Ore5-Ext	2	10	80	9:1
Cu/Ore6-Ext	2	5	ambiente	9,5:0,5
Cu/Ore7-Ext	2	10	ambiente	9,5:0,5
Cu/Ore8-Ext	2	5	80	9,5:0,5
Cu/Ore9-Ext	2	10	80	9,5:0,5
Cu/Ore10-Ext	24	5	ambiente	9:1
Cu/Ore11-Ext	24	5	80	9:1

Cu/Ore-Ext: Nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto de orégano

2.3.2. Síntesis de nanopartículas de cobre con extracto utilizando ultrasonido:

Para esta síntesis se siguió el procedimiento utilizado por Figueroa [60] con algunas modificaciones: En un beacker con capacidad de 30 mL, se mezclaron soluciones de sulfato de cobre (1M, 0,1M y 0,01M) y extracto de orégano (0,6g/mL, 0,3g/mL, 0,1g/mL, 0,05g/mL y 0,01g/mL), ajustando la proporción de volúmenes entre ambos reactivos (1:1, 2:1 y 1:2), respectivamente)(ver tabla 4). Luego la mezcla de extracto y solución precursora de cobre, se sometieron a en ultrasonido a 40°C durante 30 minutos. Finalmente, la mezcla fue centrifugada a 15.000 rpm durante 10 minutos y lavada con pequeñas porciones de agua destilada para eliminar el exceso de reactivantes.



Figura 46. Esquema para la preparación de las nanopartículas de cobre a partir de extracto acuoso de orégano vía ultrasonónica (propio)

Tabla 4. Condiciones de síntesis con ultrasonido

Ensayo	[Extracto] (g/mL)	[CuSO ₄] mol/L	V _{CuSO₄} : V _{Ore}
Cu/Ore1-Ext	0,1	0,01	9:1
Cu/Ore12-Ext	0,1	0,01	1:1
Cu/Ore13-Ext	0,1	0,01	2:1
Cu/Ore14-Ext	0,1	0,01	1:2
Cu/Ore15-Ext	0,1	0,1	1:1

Cu/Ore16-Ext	0,1	0,1	2:1
Cu/Ore17-Ext	0,1	0,1	1:2
Cu/Ore18-Ext	0,1	0,001	1:1
Cu/Ore19-Ext	0,1	0,001	2:1
Cu/Ore20-Ext	0,1	0,001	1:2
Cu/Ore21-Ext	0,01	0,01	1:1
Cu/Ore22-Ext	0,01	0,01	2:1
Cu/Ore23-Ext	0,01	0,01	1:2
Cu/Ore24-Ext	0,01	0,1	1:1
Cu/Ore25-Ext	0,01	0,1	2:1
Cu/Ore26-Ext	0,01	0,1	1:2
Cu/Ore27-Ext	0,01	0,001	1:1
Cu/Ore28-Ext	0,01	0,001	2:1
Cu/Ore29-Ext	0,01	0,001	1:2
Cu/Ore30-Ext	0,05	0,01	1:1
Cu/Ore31-Ext	0,05	0,01	2:1
Cu/Ore32-Ext	0,05	0,01	1:2
Cu/Ore33-Ext	0,05	0,1	1:1
Cu/Ore34-Ext	0,05	0,1	2:1
Cu/Ore35-Ext	0,05	0,1	1:2
Cu/Ore36-Ext	0,05	0,001	1:1
Cu/Ore37-Ext	0,05	0,001	2:1
Cu/Ore38-Ext	0,05	0,001	1:2
Cu/Ore39-Ext	0,3	0,1	1:1
Cu/Ore40-Ext	0,3	0,1	1:1
Cu/Ore41-Ext	0,3	1	1:1

2.3.3. Síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto o infusión de orégano sin agitación (In situ).

El procedimiento general involucró básicamente la mezcla de extracto o infusión con solución precursora de cobre (utilizando los parámetros de síntesis mostrados en la tabla 5), y sin agitación la mezcla se dejó en reposo durante 24 horas, y posteriormente el medio de reacción fue centrifugado a 15.000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, los sistemas de nanopartículas sintetizadas fueron lavadas con pequeñas porciones de agua destilada para eliminar el exceso de reactivos.



Figura 47. Esquema de preparación de infusión de orégano in situ.

Tabla 5. Condiciones de síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con infusión de orégano sin agitación

Ensayo	[Ext] ó [Inf] (g/mL)	[CuSO ₄] mol/L	VCuSO ₄ : VOre
Cu/Ore13-Ext* Cu/Ore13-Inf	0,1	0,01	2:1
Cu/Ore15-Ext* Cu/Ore15-Inf	0,1	0,1	1:1
Cu/Ore39-Ext* Cu/Ore39-Inf	0,3	0,1	1:1
Cu/Ore41Ext* Cu/Ore41-Inf	0,3	1	1:1

- Cu/Ore-Ext*: Nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto de orégano sintetizadas sin agitación

2.4. Ensayos in vitro de la actividad antifúngica de las nanopartículas Cu/Ore frente al hongo *Fusarium oxysporum sp cubense*

En el presente estudio, se llevaron a cabo evaluaciones in vitro de la actividad antifúngica de los sistemas de nanopartículas sintetizados Cu/Ore-Ext (nanopartículas cobre estabilizadas con extracto de orégano) y Cu/Ore-Inf (nanopartículas de cobre estabilizadas con infusión) frente al hongo *Fusarium oxysporum cubense* (Foc). A continuación, se describen los procedimientos experimentales utilizados:

2.4.1. Preparación de las placas Petri:

Se prepararon 36 placas Petri utilizando la metodología utilizada por Espinel-Ingroff y colaboradores [62] con algunas modificaciones: En una botella de reactivo de 900 ml de agua estéril se agregaron $35,1000 \pm 0,0001$ g de potato dextrose agar (PDA), y $2,0000 \pm 0,0001$ g de agar puro para prolongar la solidificación del medio. La mezcla fue llevada a esterilizar por 45 min, se dejó enfriar hasta 50 °C, se agitó y posteriormente la mezcla distribuyó en porciones iguales en cada placa, todo esto fue llevado a cabo en una campana de flujo laminar con los estándares de esterilidad requeridos.

2.4.2. Determinación del porcentaje de inhibición por la técnica de envenenamiento del medio:

Se utilizó una metodología híbrida basada en los trabajos de Pariona [51] y Kiran [63] como se muestra en la tabla 6, se distribuyeron por triplicado y por separado en placas Petri 50 μ L de los siguientes antifúngicos: extractos e infusiones de orégano a concentraciones de 10g/100ml y 30g/100ml, respectivamente; nanopartículas de cobre obtenidas mediante extracto acuoso con ultrasonido (US); y nanopartículas de cobre obtenidas por infusión sin el uso de equipos especializados (SE). Como controles negativos, se utilizaron soluciones de

sulfato de cobre en concentraciones de 1 M, 0,1 M y 0,01 M, y como control positivo, una placa de agar sin antifúngicos. En el centro de cada placa, se colocaron 5 μ L de una solución del hongo con una concentración de 7.76×10^5 UFC.

Una vez completada la carga, las placas se mantuvieron en condiciones estériles para permitir la absorción completa de los antifúngico y el hongo. Después de eso, las placas se incubaron a 30°C y se midió el porcentaje de inhibición cada 24 horas entre los 3 y 6 días. Finalmente se calculó el porcentaje de inhibición fúngico con base en el % de inhibición del Crecimiento Micelar (ICM) [63] de la siguiente manera:

$$\%ICM = \frac{d_c - d_t}{d_c}$$

- *%ICM*: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelar
- d_c : Diámetro de control (diámetro del hongo)
- d_t : Diámetro de tratamiento (diámetro del hongo) con antifúngico



Figura 48. Esquema para la distribución del antifúngico en las placas Petri

Tabla 6. Distribución de las placas para medir porcentaje de inhibición, inoculadas por triplicado.

Placas con Inóculos del extracto	Placas con Inóculos de la infusión	Placas con Controles negativos	Placa con control positivo
Extracto 0,1g/mL	Infusión 0,1g/mL	CuSO ₄ 0,01 M	5 mL de solución de hongo 7.78×10^5
Extracto 0,3 g/mL	Infusión 0,3g/mL		
Cu/Ore13-Ext	Cu/Ore13-Inf	CuSO ₄	

		0,1 M	UFC
Cu/Ore15-Ext	Cu/Ore15-Inf		
Cu/Ore39-Ext	Cu/Ore39-Inf	CuSO ₄ 1 M	
Cu/Ore39-Ext	Cu/Ore39-Inf		

2.4.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Se prepararon placas de prueba con 20mL de Agar de Papa Dextrosa (PDA) para el método de envenenamiento del medio. Después de que el medio se solidificó, se añadieron 50µL de una suspensión del antifúngico a estudiar Cu/Ore13-Inf (Diluciones 1/2 ,1/4, y 1/8 de la concentración inicial del antifúngico) el cual se distribuyó uniformemente sobre las placas utilizando un hisopo. Se colocó en el centro de la placa, 5 µL de la solución del hongo con 7.76×10^5 UFC (Tabla 7). Una vez completada la carga, las placas se mantuvieron en condiciones asépticas para permitir la absorción completa de los antifúngico y el hongo. Después de eso, las placas se incubaron a 30°C y se midió el porcentaje de inhibición cada 24 horas entre los 3 y 6 días.

Tabla 7. Distribución de las placas para medir porcentaje de inhibición, inoculadas por triplicado

Placas con Inóculos del extracto	Concentración Del inóculo	V hongo sembrado 7.78×10^5 UFC
Cu/Ore13-Inf	Concentrada	5 µL
	1/2	
	1/4	
	1/8	

2.4.4. Determinación de las Unidades Formadoras de Colonia:

El cálculo de UFC se realizó mediante diluciones sucesivas del hongo concentrado, proporcionado por el IDEA (instituto de estudios avanzados). Se tomó 0,1 µL del hongo concentrado y se llevó a un volumen de 15mL con agua

destilada, de esta solución se tomó una alícuota de 1mL para hacer 7 diluciones sucesivas de 1/20 posteriormente se procedió a inocular 50 µL de cada dilución en placas con PDA,. Seguidamente se incubaron por 48 horas y se procedió a realizar el conteo del número de colonias y posteriormente calcular número de UFC [63]

$$UFC = \frac{(n^{\circ} \text{ colonias en placa}) * \text{factor de dilución (T)}}{\text{Vol. sembrado}}$$

UFC= unidades formadoras de colonias

n° colonias en placa = 56

Factor de dilución total= 1/20

Volumen sembrado = 0,05 mL

3. Resultados y discusión

3.1. Identificación de las hojas de *Lippia micromera* (Orégano)

Las hojas de orégano se recolectaron en la Urbanización de Club de Campo, Altos Mirandinos e identificadas en el Herbario “Víctor Manuel Ovalles” de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela bajo el Número de registro MYF 29530. Se identificó botánicamente como *Lippia micromera*, perteneciente a la Familia Verbenaceae, Nombre común reportado: “Orégano”. En adelante la especie y sus nanopartículas se nombran por el nombre común.

3.2. Obtención del extracto acuoso e infusión de orégano

Al comparar la extracción por ultrasonido con la obtención de la infusión por calentamiento, se observan diferencias significativas en el proceso y en los extractos obtenidos. En la extracción por ultrasonido, la acción mecánica del ultrasonido generó una turbidez notable en la suspensión, indicando una ruptura

efectiva de las paredes celulares para una liberación de los compuestos intracelulares. Visualmente, se pudo apreciar una mayor liberación de partículas finas en comparación con la infusión. Por otro lado, en la infusión, el calentamiento gradual favoreció la difusión de los compuestos solubles en agua hacia el solvente, resultando en extractos con una apariencia generalmente más oscura. Sin embargo, el color de los extractos podría haber variado dependiendo de la concentración de los compuestos extraídos y de su naturaleza. Estas diferencias en el aspecto visual de los extractos reflejan los distintos mecanismos de extracción involucrados en cada método.

3.3. Caracterización del extracto e infusión de orégano

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de la cantidad de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto y en la infusión de orégano.

Tabla 8. Fenoles totales y flavonoides totales para el Extracto de orégano

	Extracto de orégano	Infusión de orégano
Fenoles totales (mg Eq Ac. Gálico/g total ext)	113± 6	150 ±3
Flavonoides totales(mg Eq Rutina/g total ext)	294± 21	315±23

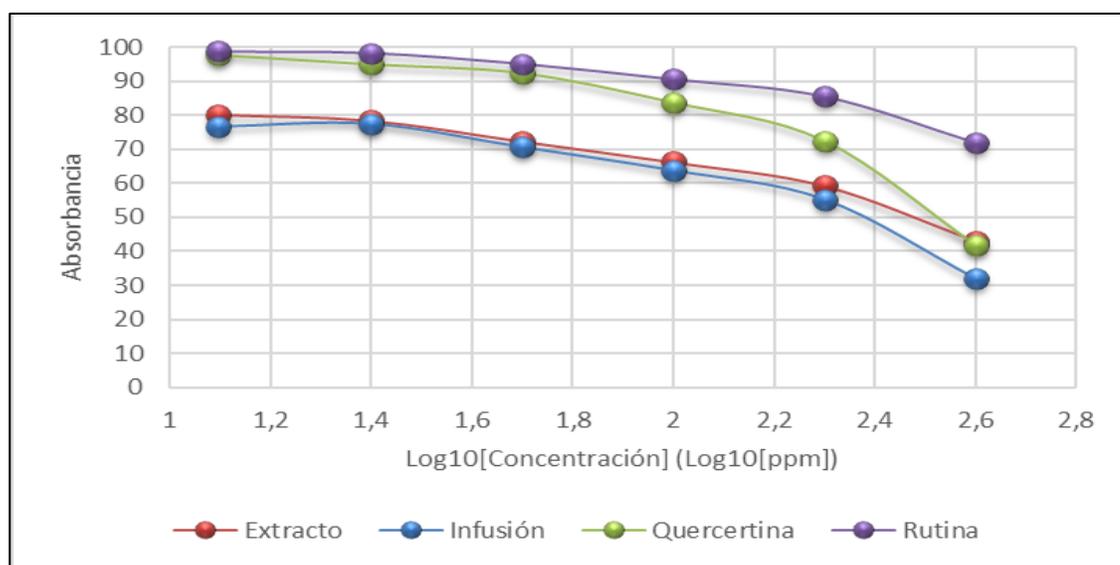
Como se puede observar, la cantidad de fenoles y flavonoides totales fue mayor en la infusión que en el extracto de orégano. Esto podría atribuirse a factores como la solubilidad diferencial de estos compuestos en agua. Dado que los fenoles y flavonoides presentan distintas solubilidades, la temperatura juega un papel crucial en su extracción. En este caso, la infusión con agua a 60°C pudo haber sido suficiente para solubilizar ciertos fenoles y flavonoides que no se extrajeron a 40°C.

En el grafico 1, se puede observar que los valores de IC50 (concentración inhibitoria 50) de los patrones para la determinación de la actividad antioxidante,

las cuales fueron: quercetina ($403,8 \pm 0,9$)ppm y rutina ($1045,0 \pm 88$)ppm, respectivamente.

Un IC50 bajo indica una mayor capacidad antioxidante, ya que se necesita una menor concentración del compuesto para inhibir el radical DPPH a la mitad. En este caso la infusión presenta una mayor capacidad antioxidante porque mostro la menor absorbancia, en cuanto al extracto de orégano presento un IC50 menor que ambos patrones.

Gráfico 1. Actividad antioxidante del extracto, infusión y patrones representado como Absorbancia vs Log10 [Conc. ppm].



En la tabla 9 se muestran los resultados de la actividad antioxidante del extracto y la infusión de orégano, las cuales se calcularon utilizando quercetina y rutina como patrones de referencia.

Tabla 9. Actividad captadora de radicales libres de los extractos e infusión de orégano

Extracto de orégano IC50 (mg/L)	217±2
Infusión de orégano IC50 (mg/L)	167±6

Tal y como se muestra en la tabla 9, la infusión de orégano presentó una actividad antioxidante superior a la del extracto de orégano, lo que es congruente con sus concentraciones de fenoles y flavonoides.

3.4. Síntesis de nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto acuoso de orégano (Cu/Ore)

3.4.1. Síntesis de nanopartículas de cobre con extracto de orégano utilizando agitación magnética:

Se realizaron ensayos variando las relaciones de volumen de la sal precursora (CuSO_4) con volumen de extracto (9:1 y 9,5: 0,5), el efecto de pH y la temperatura en el tamaño de las nanopartículas dispersas en el medio. Tal y como se observa en la tabla 10, cuando la relación de volúmenes de CuSO_4 /Extracto es 9:1 y el pH=5, al aumentar la temperatura disminuye el tamaño de las nanopartículas obtenidas, lo que es consistente con lo reportado en la literatura, ya que a medida que aumenta la temperatura de reacción, aumenta la velocidad de nucleación, consumiendo iones metálicos para formar los núcleos de las NPs; esto puede conducir a tamaños de NPs más pequeñas. Sin embargo, cuando el pH=10 un aumento en la temperatura produjo un aumento del tamaño de las nanopartículas, indicando que pH elevados favorecen la aglomeración de las nanopartículas [64]. Cuando la relación de volúmenes es de 9,5:0,5, se generan nanopartículas de tamaños similares entre sí, independientemente de la temperatura y el pH utilizado, indicando esto que, al elevar la proporción de sulfato de cobre en el medio, este determina el tamaño de las nanopartículas obtenidas. Al aumentar el tiempo de síntesis de 2 a 24 horas, se obtienen nanopartículas de cobre de un tamaño superior, como es de

esperarse ya que un aumento en el tiempo bajo agitación continua favorece la aglomeración de las nanopartículas.

Tabla 10. Tamaño de nanopartículas obtenidas con agitación magnética

Ensayo	t(h)	pH	T(°C)	V _{CuSO₄} :V _{Ore}	Tamaño (nm)
Cu/Ore2-Ext	2	5	25	9:1	3,28
Cu/Ore3-Ext	2	10	25	9:1	2,90
Cu/Ore4-Ext	2	5	80	9:1	1,72
Cu/Ore5-Ext	2	10	80	9:1	3,27
Cu/Ore6-Ext	2	5	25	9,5:0,5	1,78
Cu/Ore7-Ext	2	10	25	9,5:0,5	1,77
Cu/Ore8-Ext	2	5	80	9,5:0,5	1,67
Cu/Ore9-Ext	2	10	80	9,5:0,5	1,72
Cu/Ore10-Ext	24	5	25	9:1	9,24
Cu/Ore11-Ext	24	5	80	9:1	6,08

- [CuSO₄]= 0,01 M y [Orégano]=10g/100mL

Como se puede observar las variaciones de los tamaños de las nanopartículas no se rige controlando específicamente un factor. La elección de la concentración de la sal precursora juega un papel fundamental en la síntesis de nanomateriales, impactando directamente en el tamaño de las nanopartículas resultantes. Estudios previos han demostrado que aumentar la concentración de la solución precursora, aumenta el tamaño de las nanopartículas obtenidas [65]. Sin embargo, este efecto no siempre se mantiene al aumentar la concentración de los extractos de hojas usados en la síntesis. En un estudio específico, se observó que la concentración de la solución precursora redujo el tamaño de las partículas, pero un aumento adicional en la concentración llevó a un incremento en el tamaño de las partículas. Este fenómeno se explica por la formación de un

exceso de núcleos a altas concentraciones, lo que promueve la aglomeración de las nanopartículas y, en consecuencia, un aumento en su tamaño.[66]

Posteriormente se analizaron las nanopartículas obtenidas por agitación magnética con espectroscopía de UV-Vis y determinar el efecto de los parámetros estudiados sobre la concentración de las nanopartículas en solución.

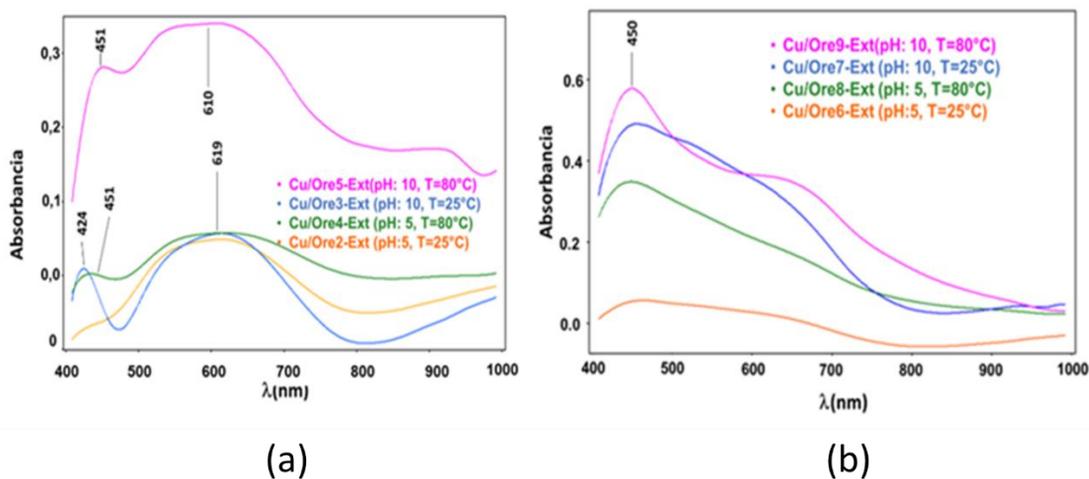


Figura 49.a) Espectro UV-Vis del sistema de NpsCu/Ore(2-5), (b) Espectro UV-Vis del sistema de NpsCu/Ore(6-9)

Como se observa en la Figura 49, la concentración (absorbancia) de las nanopartículas en solución aumenta a medida que se incrementan el pH y la temperatura del medio de reacción, lo que podría deberse a una reducción en el tamaño de las partículas, lo que es consistente con los estudios realizados por K.M. Rajesha y colaboradores [64]. La banda alrededor de 610 nm mostrada en la Figura 49a corresponden a nanopartículas de cobre metálico [65]. La banda entre 400 y 500 nm mostrada en los espectros de la Figura 41 a y b son asignables a nanopartículas de óxido de cobre (I) [66]. Cuando el pH alcanza un valor de 10 y se aumenta la temperatura a 80°C, se intensifica la señal de óxido de cobre (I) esto puede ser resultado de la reacción entre el hidróxido de sodio y el sulfato de cobre, que posteriormente forman nanopartículas de óxido de cobre en presencia del extracto [68]. Asimismo, al comparar la relación de volúmenes de sulfato de cobre y extracto de 9:1 (Figura 49a) con 9,5:0,5 (Figura 49b), se

nota que en la relación de volúmenes 9:1 la banda alrededor de 610 nm se vuelve más intensa debido a que una mayor proporción de sulfato de cobre favorece la formación nanopartículas de cobre, en cambio cuando la relación de volúmenes es de 9,5:0,5, se favorece la formación de óxido de cobre (I). Estos resultados sugieren que el uso de bajas proporciones de extracto, junto con a pH más elevados o un aumento de la temperatura, favorecen la formación de nanopartículas de óxido de cobre. Por esta razón, en los ensayos utilizando ultrasonido se optó por aumentar la proporción de extracto respecto al sulfato de cobre, realizar las síntesis a temperatura ambiente, con el pH natural del extracto, que es aproximadamente igual a 5.

3.4.2. Síntesis de nanopartículas de cobre con extracto de orégano utilizando ultrasonido:

La reducción de iones de cobre a nanopartículas de cobre durante la exposición al agente reductor y de protección se notó mediante los cambios de color que se observaban a medida que el extracto se mezclaba con la solución acuosa de sulfato de cobre, y es que la coloración azul de la solución precursora de cobre se tornó a verde y luego en marrón indicando la presencia de nanopartículas de cobre, las cuales aparecieron en suspensión y precipitaron luego de 24 horas.

En la tabla 11, se pueden observar los tamaños obtenidos de las nanopartículas de cobre utilizando ultrasonido. Los datos están organizados en orden creciente de la concentración de sulfato de cobre y agrupados en tríadas según la concentración del extracto de orégano utilizada.

Tabla 11. Tamaño de nanopartículas de cobre sintetizadas en ultrasonido

Ensayo	[CuSO ₄]mol/ L	[Extracto]g/m L	VCuSO ₄ :Vore	Tamaño (nm)
Cu/Ore18-Ext	0,001	0,1	1:1	2,11
Cu/Ore20-Ext	0,001	0,1	1:2	2,06
Cu/Ore19-Ext	0,001	0,1	2:1	5,00

Cu/Ore36-Ext	0,001	0,05	1:1	6,00
Cu/Ore38-Ext	0,001	0,05	1:2	4,46
Cu/Ore37-Ext	0,001	0,05	2:1	6,43
Cu/Ore27-Ext	0,001	0,01	1:1	2,60
Cu/Ore29-Ext	0,001	0,01	1:2	2,09
Cu/Ore28-Ext	0,001	0,01	2:1	4,14
Cu/Ore1-Ext	0,01	0,1	1:1	2,35
Cu/Ore12-Ext	0,01	0,1	1:1	4,37
Cu/Ore14-Ext	0,01	0,1	1:2	2,23
Cu/Ore13-Ext	0,01	0,1	2:1	5,17
Cu/Ore30-Ext	0,01	0,05	1:2	4,07
Cu/Ore32-Ext	0,01	0,05	2:1	2,01
Cu/Ore31-Ext	0,01	0,05	1:1	6,30
Cu/Ore21-Ext	0,01	0,01	1:2	4,43
Cu/Ore23-Ext	0,01	0,01	2:1	3,58
Cu/Ore22-Ext	0,01	0,01	1:1	6,51
Cu/Ore15-Ext	0,1	0,1	1:1	5,96
Cu/Ore17-Ext	0,1	0,1	1:2	4,93
Cu/Ore16-Ext	0,1	0,1	2:1	6,32
Cu/Ore33-Ext	0,1	0,05	1:1	5,05
Cu/Ore35-Ext	0,1	0,05	1:2	4,47
Cu/Ore34-Ext	0,1	0,05	2:1	6,83
Cu/Ore24-Ext	0,1	0,01	1:1	4,71
Cu/Ore26-Ext	0,1	0,01	1:2	4,24
Cu/Ore25-Ext	0,1	0,01	2:1	8,08
Cu/Ore39-Ext	0,1	0,3	1:1	5,10
Cu/Ore40-Ext	0,1	0,6	1:1	2,45
Cu/Ore41-Ext	1	0,3	1:1	8,77

Al observar los tamaños mostrados, la dependencia del tamaño más consistente no proviene de la concentración de sulfato de cobre si no de la relación $V_{CuSO_4} : V_{Extracto}$, de hecho, al pasar de una concentración de sulfato de 0,001 M a 1 M los tamaños se encuentran entre 2 y casi 9 nm. Pero,

generalmente cuando el volumen sulfato de cobre es mayor a la del extracto (es decir, relaciones de 2:1), los tamaños de las partículas tienden a ser mayores. Por otro lado, cuando la proporción es de 1:1 o 1:2, los tamaños son generalmente menores. Aunque la concentración de sulfato de cobre y la concentración de extracto muestran ciertas variaciones en los resultados, el patrón predominante es que una mayor cantidad relativa de sulfato de cobre frente al extracto favorece el crecimiento de las partículas. Este comportamiento sugiere que el equilibrio entre el sulfato y el extracto durante el proceso de síntesis es un factor clave en la determinación del tamaño final, probablemente relacionado con la disponibilidad de agentes reductores y estabilizantes proporcionados por el extracto. La cantidad de extracto vegetal utilizado y la concentración de biomoléculas dentro de él influyen directamente en la síntesis de las NP, ya que determinan la disponibilidad de los compuestos necesarios para la reducción de los iones metálicos y la estabilización de las nanopartículas recién formadas.

Se seleccionaron 4 ensayos designados como: (Cu/Ore13-Ext; Cu/Ore15-Ext; Cu/Ore39-Ext y Cu/Ore41-Ext) porque aparentemente esos ensayos generaron mayor cantidad de nanopartículas de cobre en suspensión en comparación con los otros ensayos. Abajo se puede observar la figura de las nanopartículas seleccionadas.

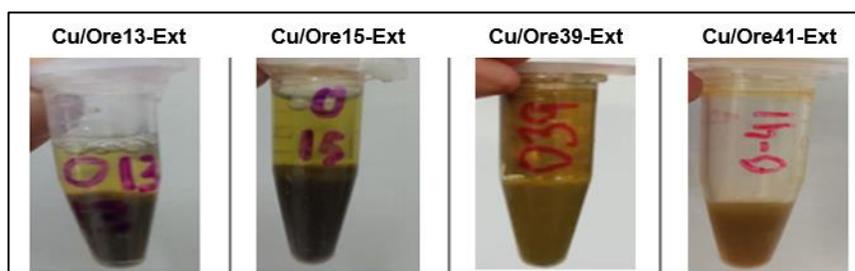


Figura 50. Suspensión obtenida en las nanopartículas Cu/Ore13-Ext; Cu/Ore15-Ext; Cu/Ore39-Ext y Cu/Ore41-Ext.

3.4.3. Síntesis de nanopartículas de cobre con extracto e infusión de orégano sin agitación (in situ):

Tal y como se muestra en la Tabla 12, estas nanopartículas se sintetizaron en ausencia de agitación y utilizando las condiciones de síntesis de los sistemas de nanopartículas escogidos con la síntesis bajo ultrasonido, a fin de observar el efecto en el tipo de agitación con los tamaños obtenidos.

Tabla 12. Tamaño de nanopartículas de cobre bajo diferentes tipos de agitación y diferente tipo de agente reductor: extracto o infusión

Sistema	Tamaño de partícula (nm)		
	Síntesis Ultrasonido Extracto	Síntesis In-situ Extracto	Síntesis In-situ Infusión
Cu/Ore13	5,17	3,72	5,89
Cu/Ore15	5,96	5,74	5,20
Cu/Ore39	5,10	5,73	6,31
Cu/Ore41	8,67	7,06	7,40

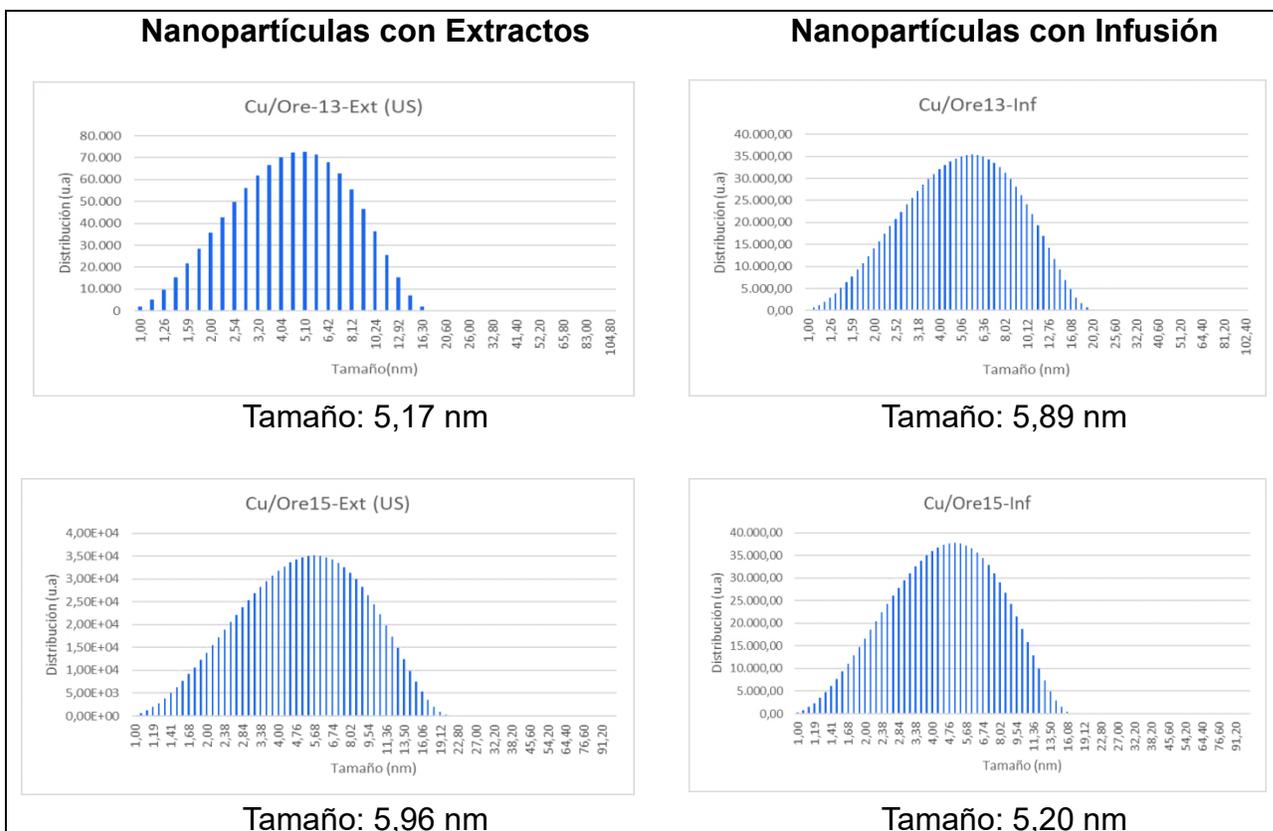
Se puede observar que los tamaños de nanopartículas no variaron de manera importante con el tipo de agitación ni con el tipo de agente reductor/protector utilizado: extracto o infusión, lo que pudiese ser una gran ventaja, ya que se pueden obtener nanopartículas de cobre de tamaños pequeños sin necesidad de agitación.

3.5. Caracterización de los sistemas de nanopartículas escogidas sintetizadas con extracto e Infusión.

A los sistemas de nanopartículas seleccionados, que se sintetizaron con extractos bajo ultrasonido y los sintetizados con infusión *in situ* se les realizaron las caracterizaciones completas de DLS, AFM, IRFT, UV-Vis IRFT.

3.5.1. Caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS):

En la Figura 51, se pueden observar los espectros correspondientes a los histogramas de tamaños generados por DLS



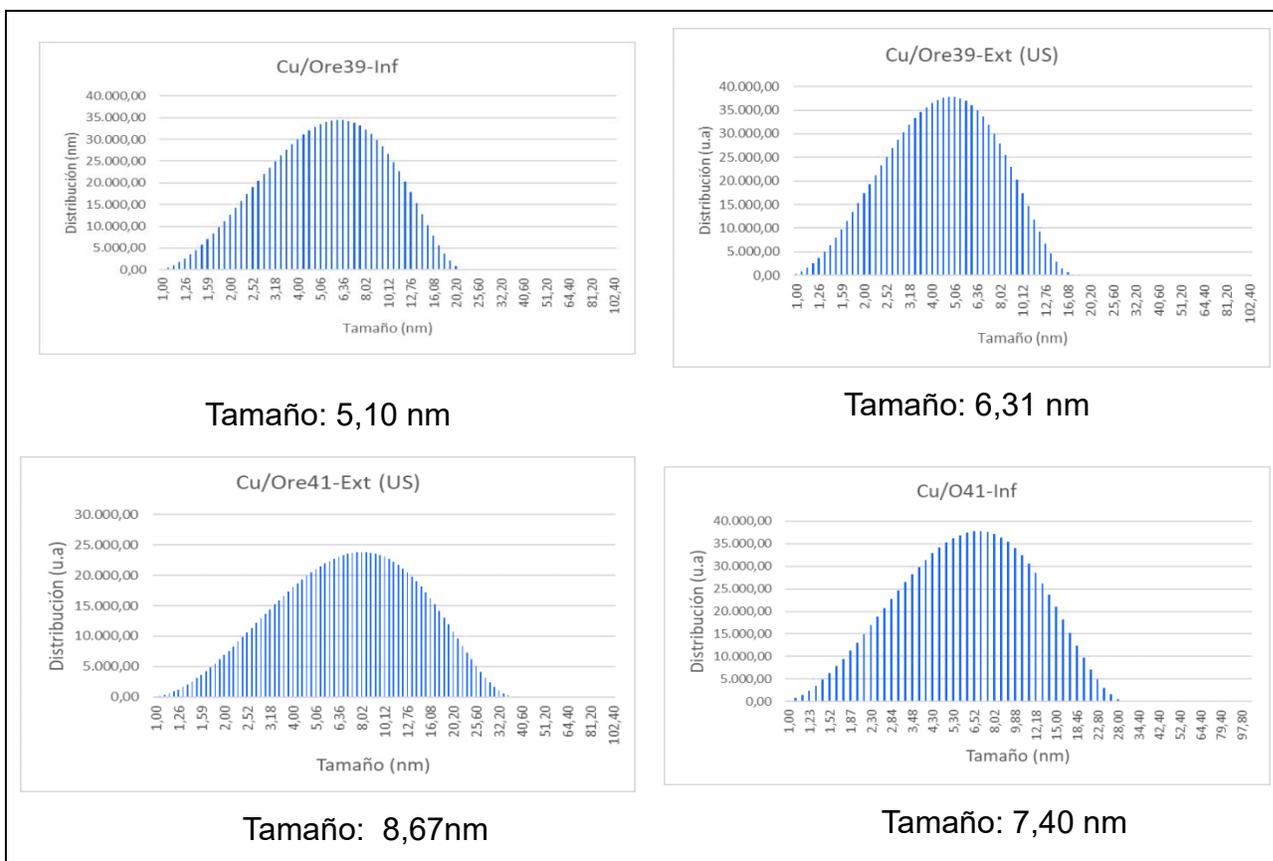


Figura 51. Histogramas por DLS de los sistemas de nanopartículas

Como puede observarse se obtuvieron nanopartículas metálicas con tamaños inferiores a 9nm con una estrecha distribución de tamaños. Se puede notar que los tamaños aumentaron ligeramente al aumentar la concentración de sulfato de cobre de 0,01M a 0,1M y de 0,1M a 1M el aumento en tamaños fue mayor. Sin embargo solo cuando se utiliza infusión hay un aumento de tamaño al pasar de una concentración de 0,1 g/mL a 0,3 g/mL.

3.5.2. Caracterización por Microscopia de Fuerza atómica (AFM)

Los tamaños obtenidos por dispersión dinámica de luz (DLS), fueron verificados por fuerza atómica y se observan en las siguientes figuras.

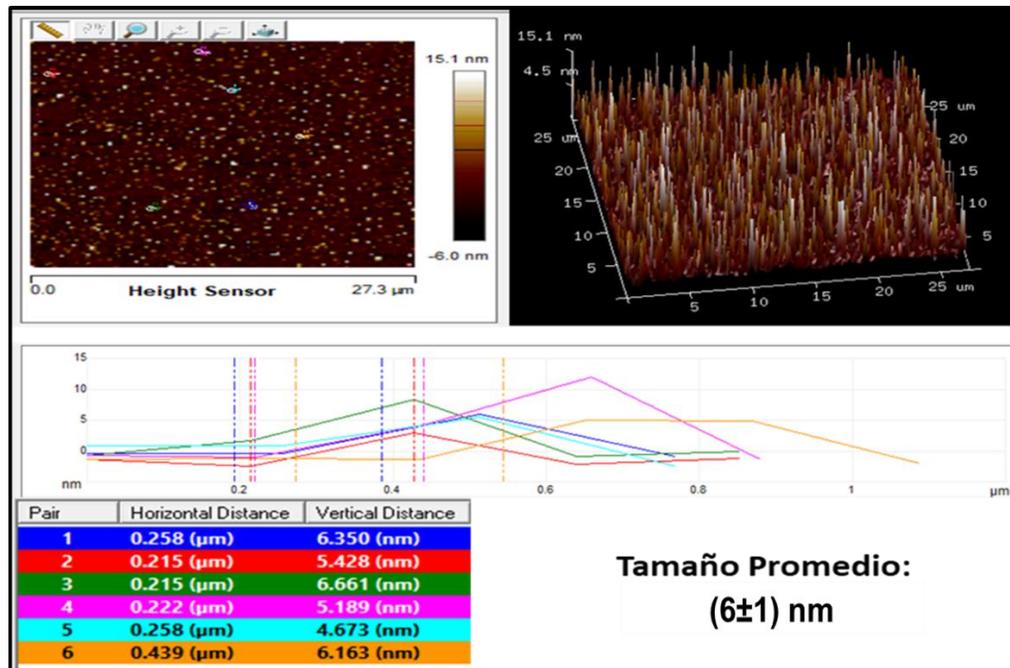


Figura 52. AFM Cu/Ore13-Ext

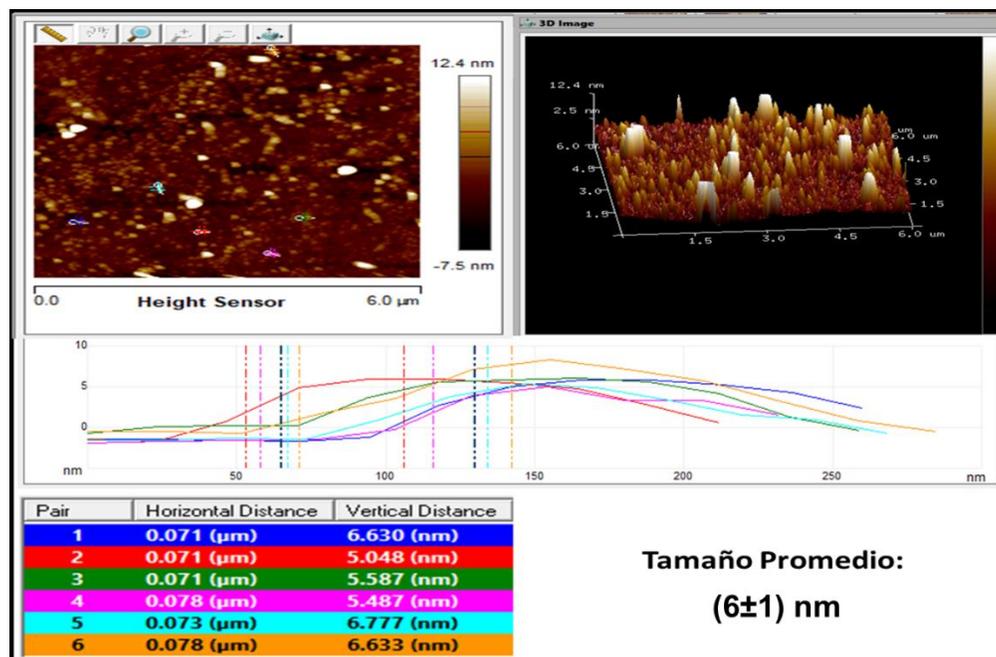


Figura 53. AFM Cu/Ore15-Ext

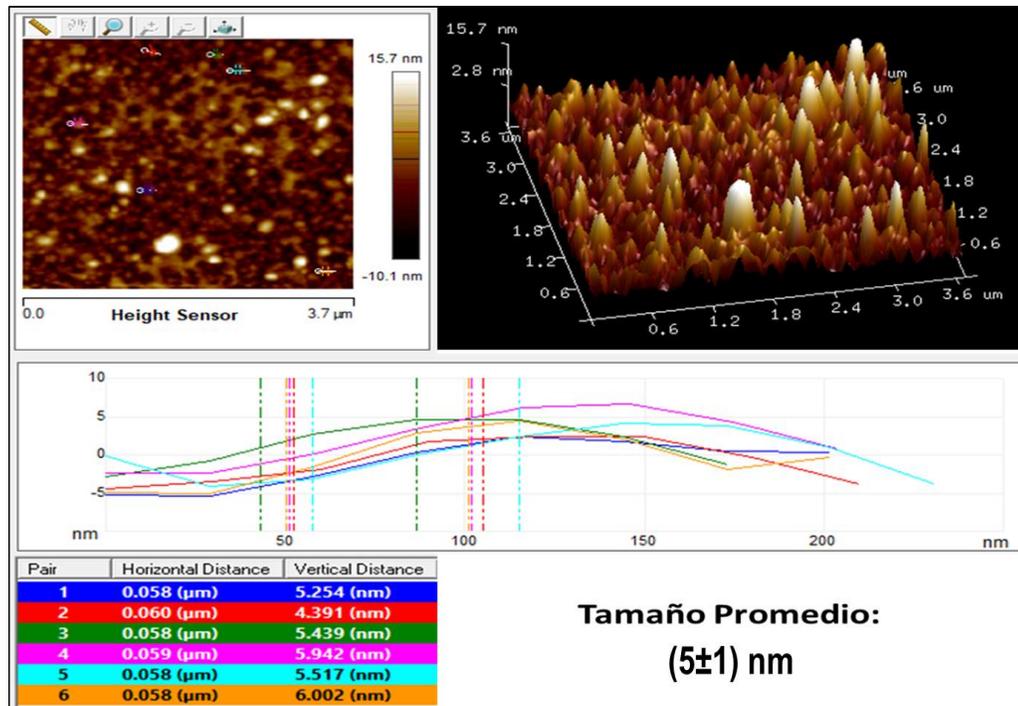


Figura 54. AFM Cu/Ore39-Ext

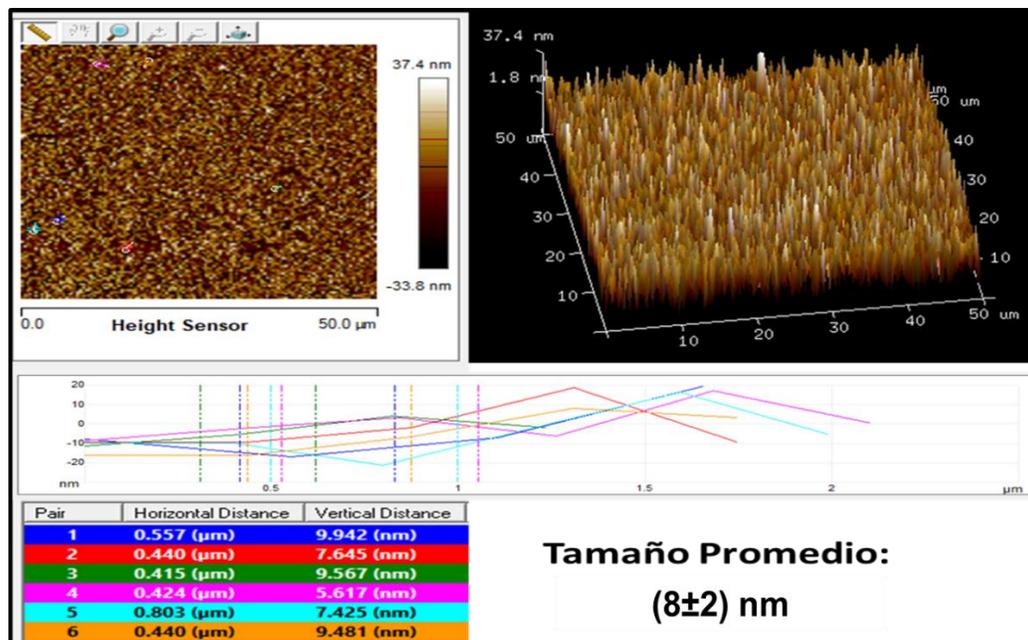


Figura 55. AFM Cu/Ore41-Ext

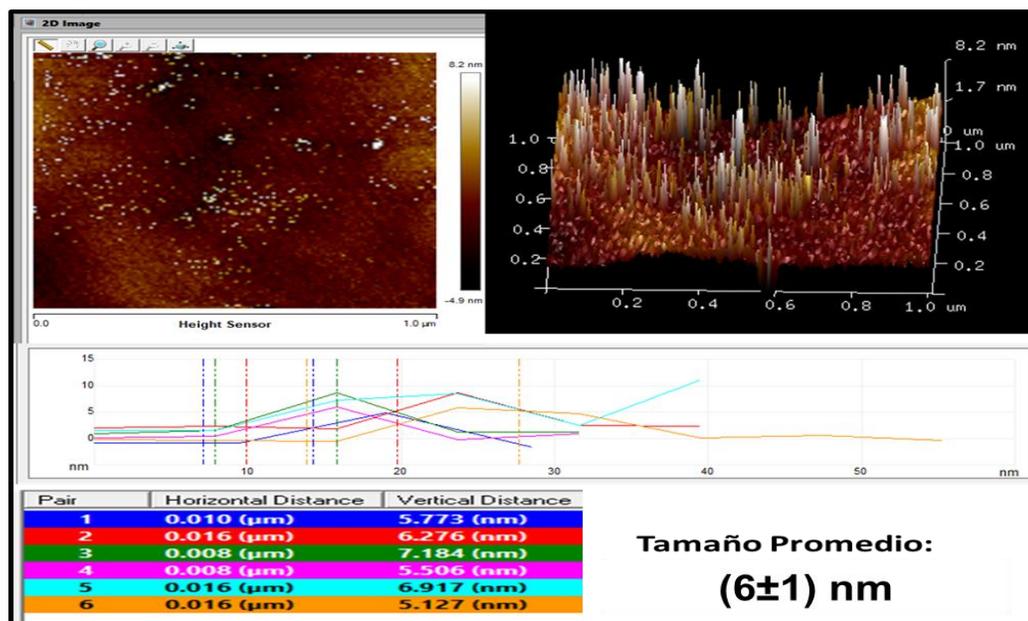


Figura 56. AFM Cu/Ore13-Inf

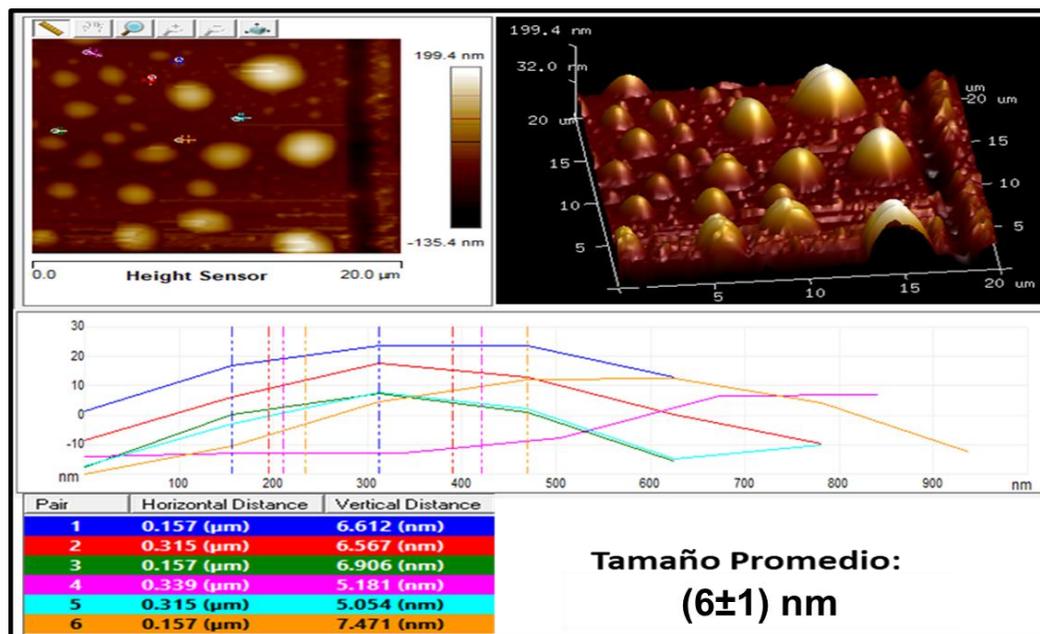


Figura 57. AFM Cu/Ore15-Inf

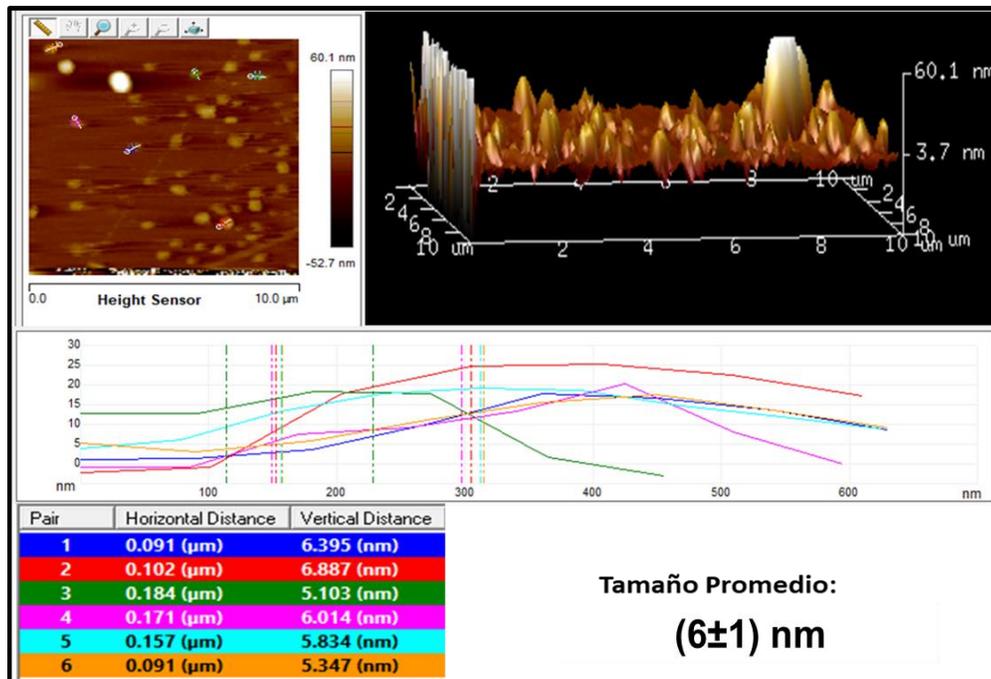


Figura 58. AFM Cu/Ore39-Inf

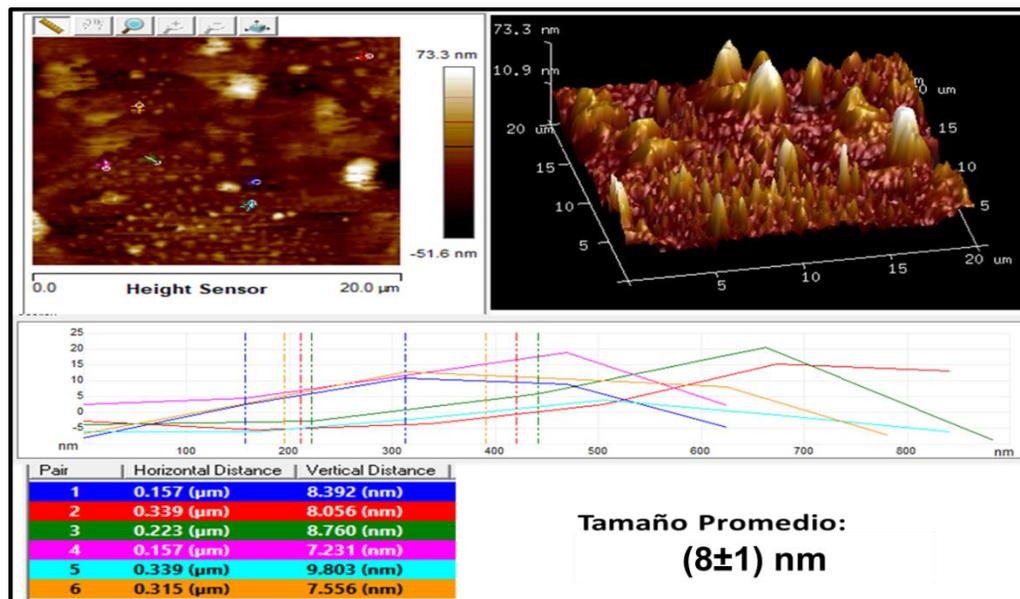


Figura 59. AFM Cu/Ore41 Inf

Se puede observar mediante la Microscopía de Fuerza Atómica que se generaron nanopartículas esféricas y como se muestra en la tabla 13, los tamaños se ajustaron a lo reportado por la Dispersión de Luz Dinámica. Sin

embargo, en algunos casos se observaron aglomerados de los sistemas de nanopartículas.

Tabla 13. Comparación de tamaños de los sistemas de nanopartículas por AFM al utilizar extracto e infusión

Sistema	Tamaño de nanopartículas por AFM (nm)	
	Extracto	Infusión
Cu/Ore13	6±1	6±1
Cu/Ore15	6±1	6±1
Cu/Ore39	5±1	6±1
Cu/Ore41	8±2	8±1

En general puede observarse que el tamaño de las nanopartículas obtenidas no varía de manera importante al utilizar el extracto o la Infusión. Al pasar de Cu/Ore13 a Cu/Ore15 la concentración de sulfato de cobre aumenta de 0,01 M a 0,1M manteniendo la concentración de extracto en 0,1 g/mL, el tamaño de las nanopartículas aumenta ligeramente pasando de 5 nm a 6 nm, indicando que al aumentar la concentración de sulfato de cobre el tamaño aumenta en pequeñas cantidades. Luego al pasar de Cu/Ore15 a Cu/Ore39 la concentración de sulfato de cobre se mantiene en 0,1M, pero aumenta la concentración de extracto a 0,3 g/mL y el tamaño de las nanopartículas disminuye de 6 nm a 5 nm indicando que al aumentar la concentración de extracto disminuye el tamaño de las nanopartículas, que es lo esperado, ya que hay mayor cantidad de extracto en el medio impidiendo de alguna manera el proceso de nucleación en la formación de las nanopartículas. Y finalmente al pasar de Cu/Ore39 a Cu/Ore41, la concentración de sulfato de cobre aumenta de 0,1 M a 1M manteniendo la concentración de extracto en 0,3 g/mL, en este caso el aumento en el tamaño de las nanopartículas si se vio influenciado por la alta concentración del sulfato de cobre y del extracto o infusión de orégano.

3.5.3. Caracterización por espectroscopia UV-Visible:

Para realizar el análisis se efectuó un barrido de los extractos e infusiones como de los sistemas de nanopartículas en un rango de longitud de onda de 200 a 800 nm.

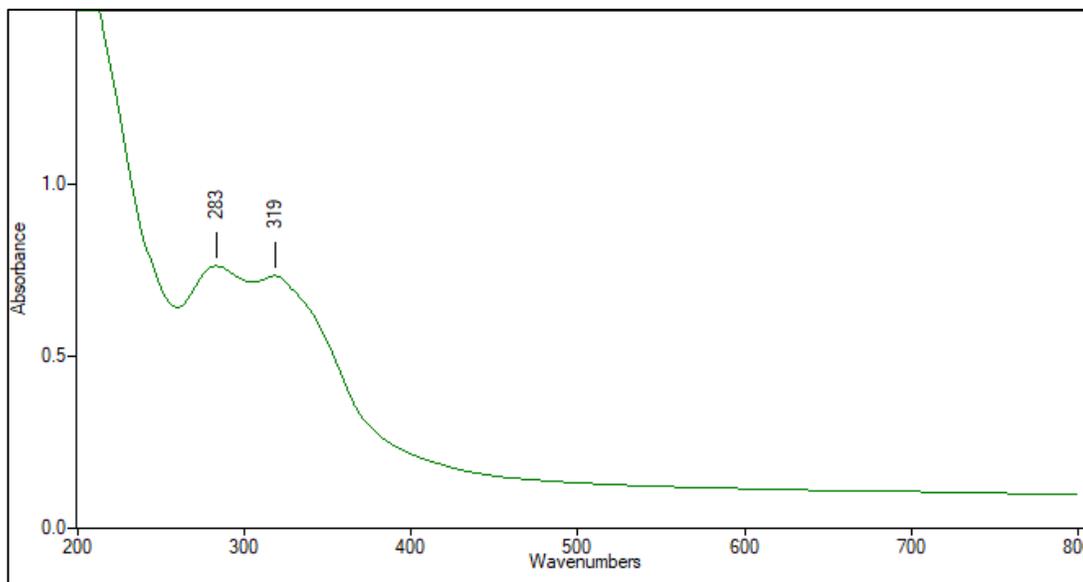


Figura 60. Espectro UV-Vis del extracto de orégano.

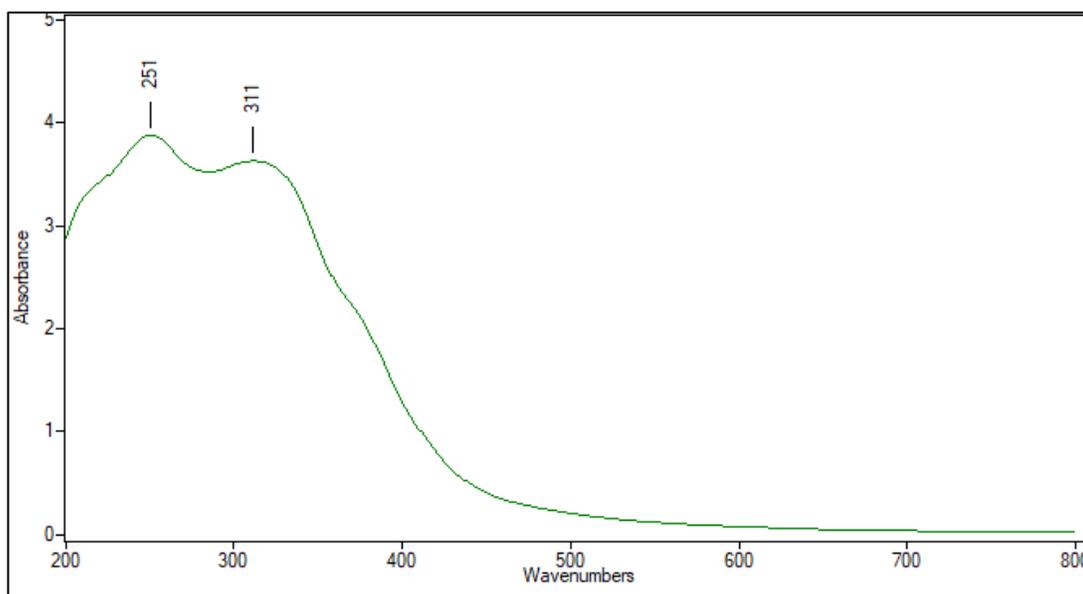


Figura 61. Espectros UV-Vis. Infusión de orégano

Como se observa en los espectros UV-Vis mostrados en las Figura 60 y 61 aparecen dos bandas, en el extracto aparecen en 283 nm y 319 nm y en la

infusión aparecen en 251 nm y 311 nm, las bandas observadas de 283 y 251 nm respectivamente se deben a enlaces π de estructuras aromáticas y dobles enlaces conjugados, asignables a fenoles, flavonoides, terpenos entre otros fitoquímicos presentes con enlaces π , y las bandas de 319nm y 312 nm, se deben a otras estructuras químicas cromóforas diversas.[68]

A continuación, se muestran los espectros de los sistemas de nanopartículas de cobre sintetizadas con extracto o infusión.

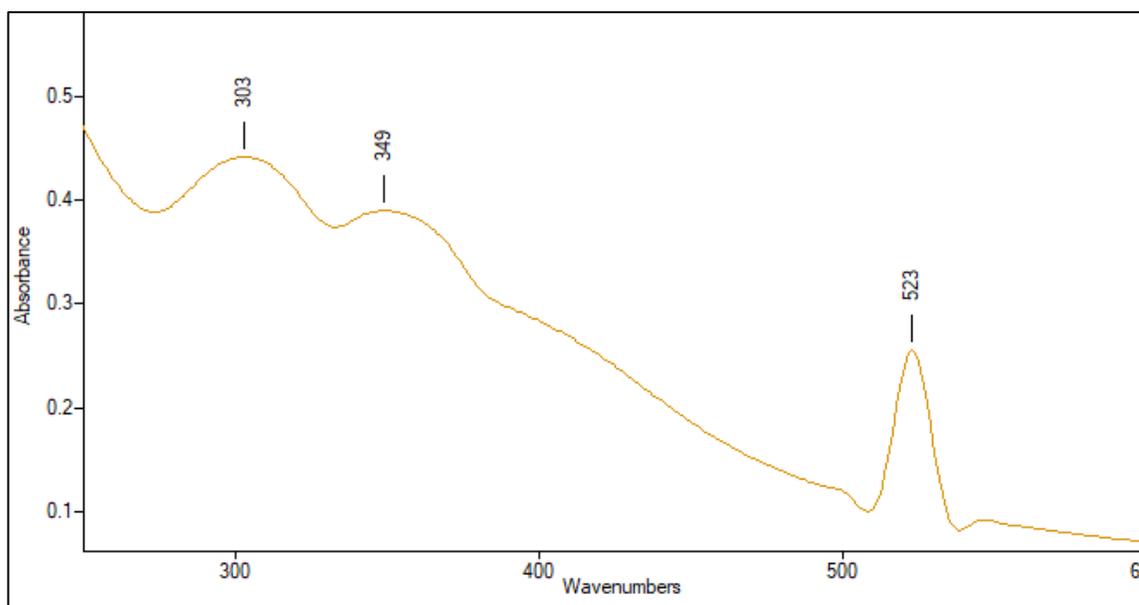


Figura 62. Espectro UV-Vis Cu/Ore13-Ext

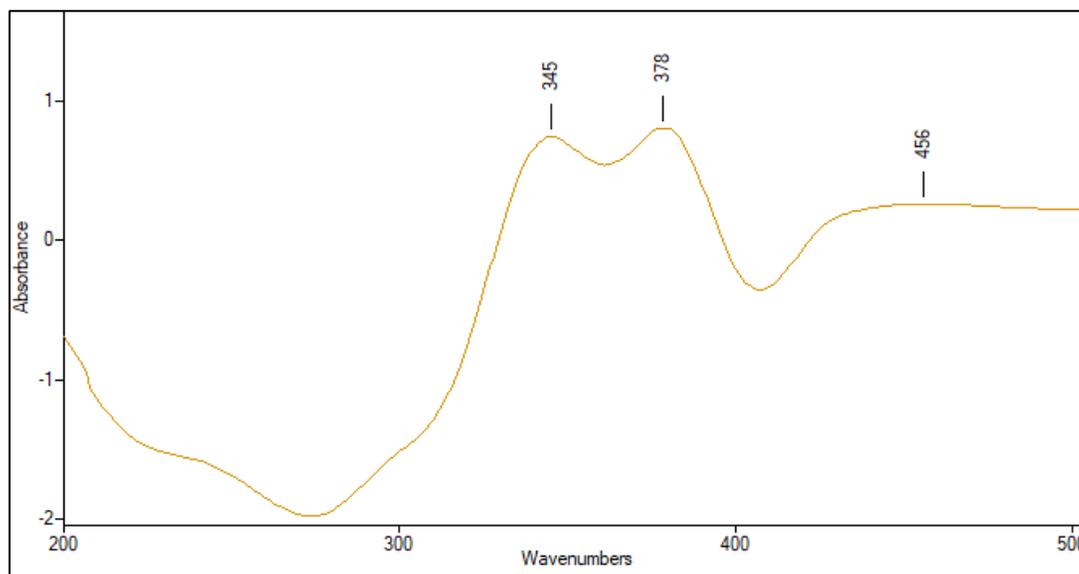


Figura 63. Espectro UV-Vis Cu/Ore13-Inf

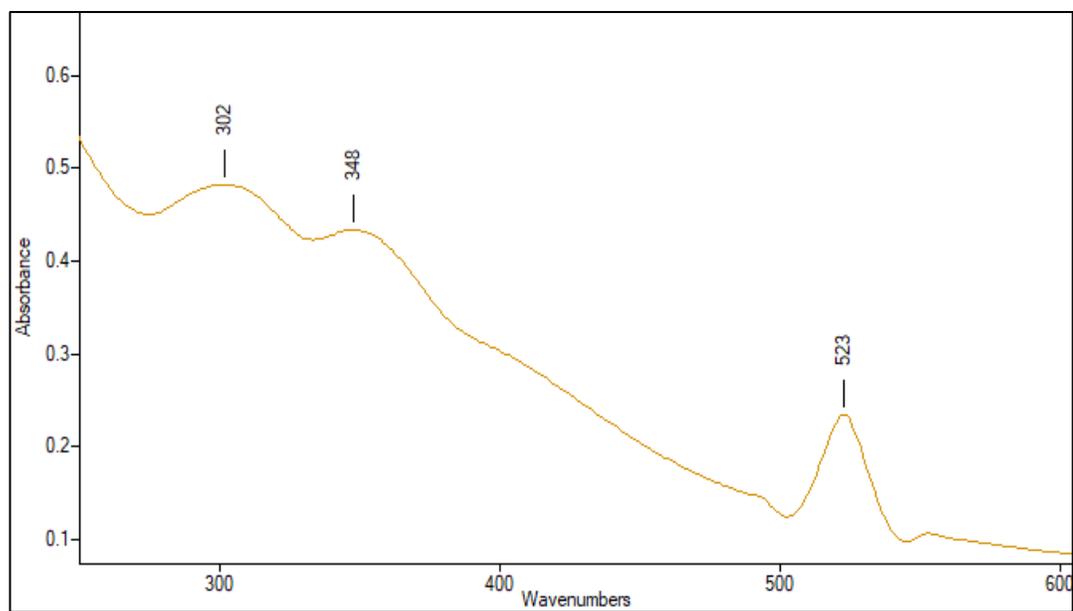


Figura 64. Espectro UV-Vis Cu/Ore15-Ext

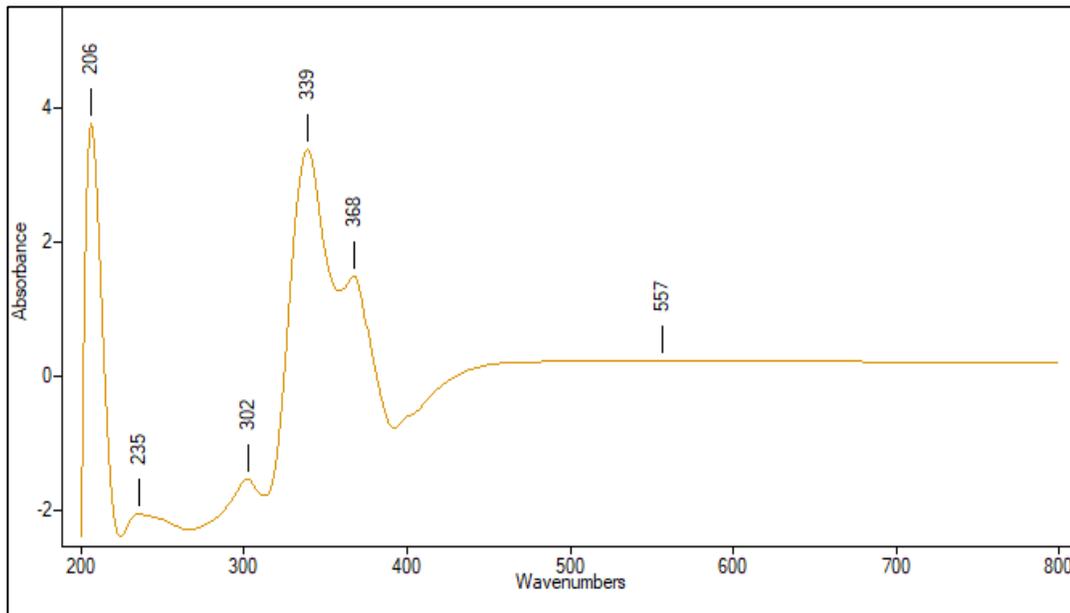


Figura 65. Espectro UV-Vis Cu/Ore15-Inf

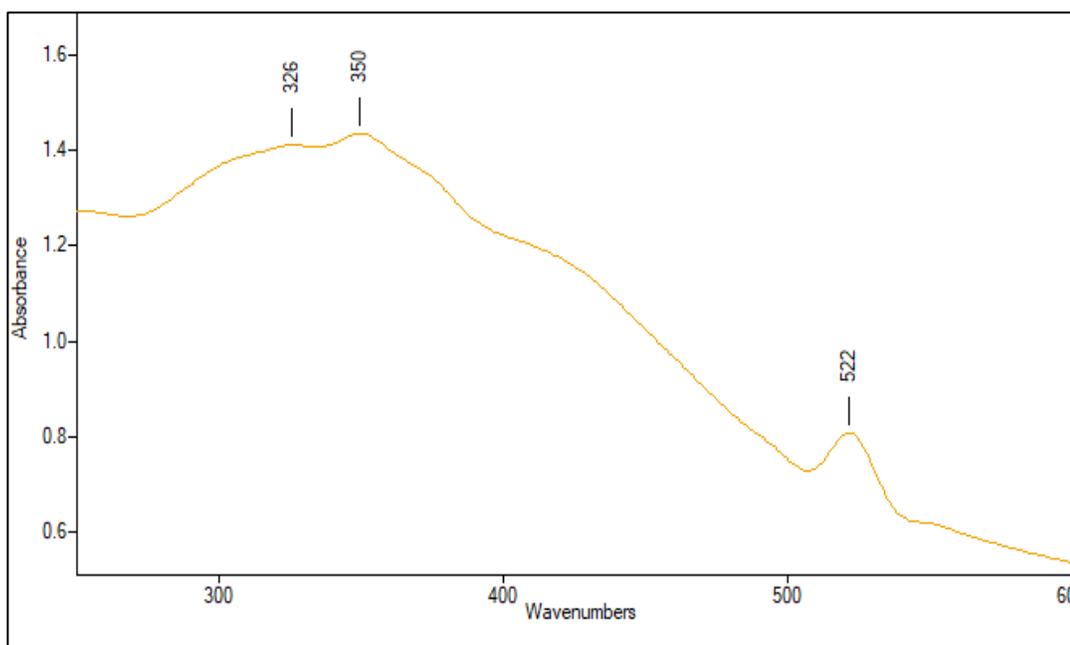


Figura 66. Espectro UV-Vis Cu/Ore39-Ext

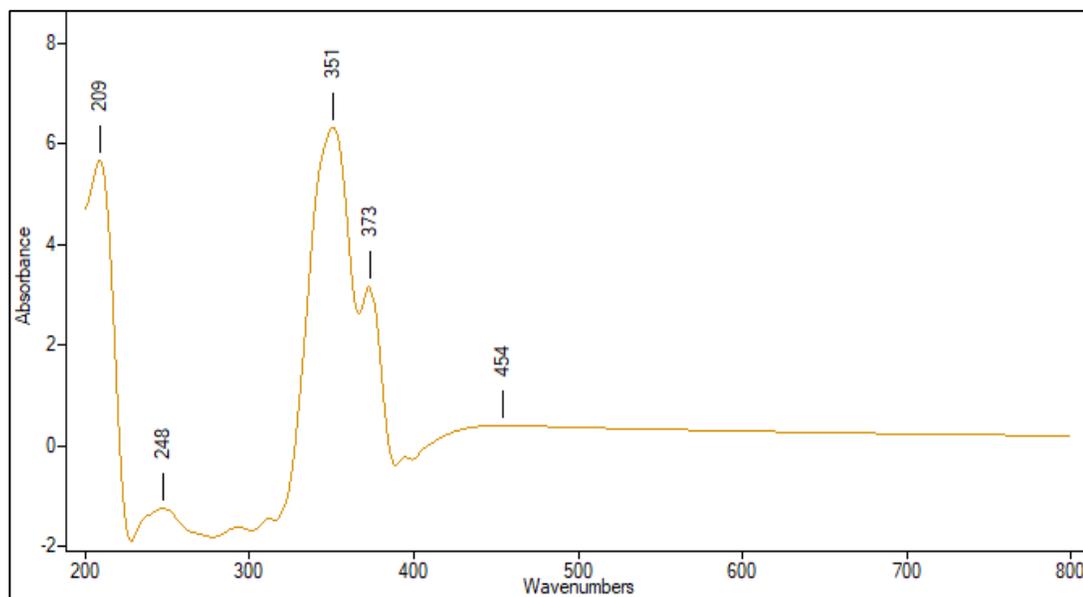


Figura 67. Espectro UV-Vis Cu/Ore39-Inf

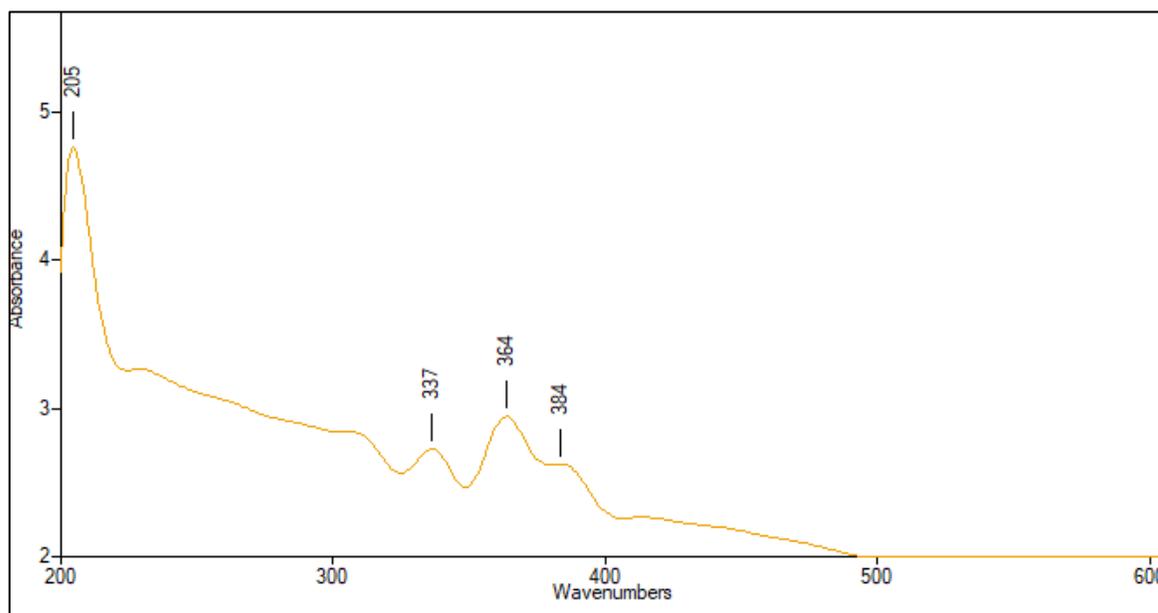


Figura 68. Espectro UV-Vis Cu/Ore41-Ext

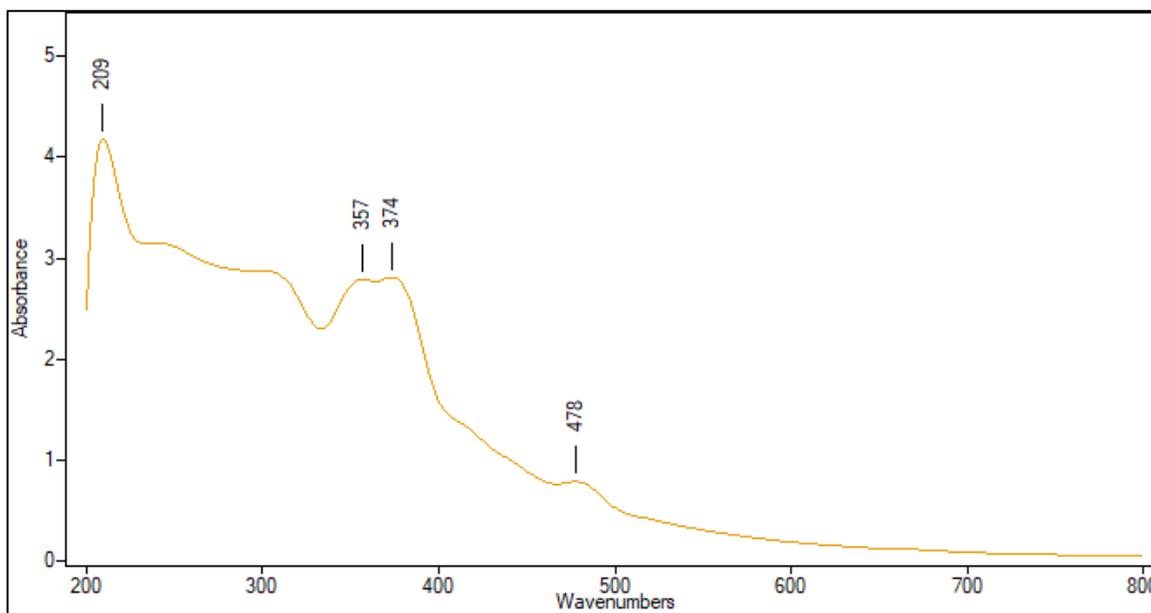


Figura 69. Espectro UV-Vis Cu/Ore41-Inf

Se puede observar tanto en las nanopartículas estabilizadas con el extracto como las nanopartículas estabilizadas en infusión la presencia de las bandas perteneciente a los extractos e infusiones ubicadas entre 300 y 400 nm esto se deben a los fitoquímicos presentes en el extracto e infusión los cuales no solo redujeron los iones de cobre metálico, sino que también estabilizan las nanopartículas metálicas.

En el caso de las nanopartículas estabilizadas con extracto de orégano **Cu/Ore13-Ext; Cu/Ore15 Ext, Cu/Ore39-Ext**, se observa una banda estrecha en 523 nm la cual es asociada a la resonancia plasmón en el espectro visible del cobre metálico [69]. En el caso de **Cu/Ore41-Ext**, la banda correspondiente a cobre metálico no aparece en 523 nm si no que aparece una banda intensa en la región del UV en 202 nm [70], correspondiente a la resonancia plasmón del cobre en estado de oxidación cero cuando la concentración de cobre en suspensión es baja. Debido al aumento en el tamaño de las nanopartículas de Cu/Ore41-Ext, estas tienden a precipitar disminuyendo la concentración de nanopartículas de cobre suspendidas.

Las nanopartículas estabilizadas con infusión de orégano mostraron una mezcla de nanopartículas de cobre y sus óxidos. Por ejemplo, **Cu/Ore13-Inf**

presentó una banda en 456 asignable a nanopartículas de Cu_2O [71], el sistema **Cu/Ore15-Inf** presentó bandas a 206 y 557 nm asignables a Cu^0 [69] [70] y una banda a 235 nm asignable a CuO [72]. Similarmente, **Cu/Ore39-Inf** mostró las siguientes bandas: 209 nm (Cu^0), 248nm (CuO) y 454 nm (Cu_2O). y **Cu/Ore41-Inf**, 209 nm (Cu^0) y 478 nm (Cu_2O).

La formación de nanopartículas de óxidos de cobre mediante la infusión podría estar relacionada con el aumento en la concentración de fenoles y flavonoides en solución

3.5.4. Caracterización por Difracción de Rayos X

Como las nanopartículas estabilizadas con extracto, presentaron una banda en 523 nm correspondiente a cobre metálico, independientemente de la concentración de extracto y sulfato de cobre utilizada para su síntesis, se decidió realizar un estudio de Difracción de rayos X al sistema **Cu/Ore39-Ext**, que se muestra a continuación en la Figura 70,

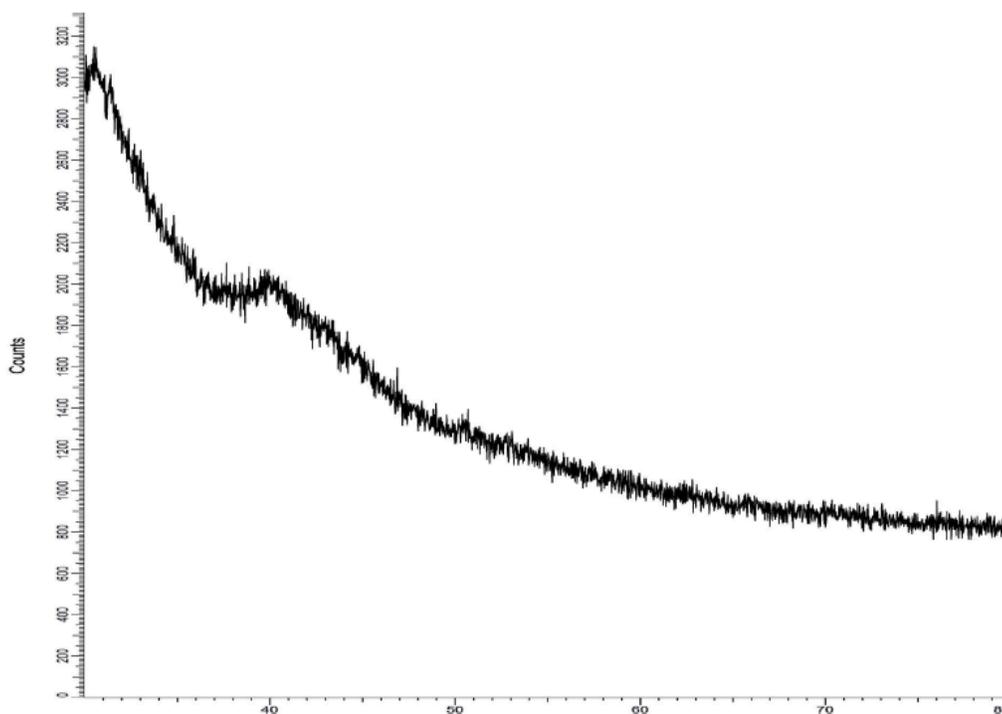


Figura 70. Difracción de rayos X del sistema Cu/Ore39-Ext

Se puede observar que el difractograma no presenta señales definidas de cobre o sus óxidos en los sistemas de nanopartículas, lo cual es esperado por el pequeño tamaño que presentaron las nanopartículas de cobre. De manera que esta caracterización no arrojó resultados concluyentes referentes al estado de oxidación de las nanopartículas obtenidas.

3.5.5. Caracterización por Espectroscopía de infrarrojo del extracto e infusión de orégano y el de sus respectivas nanopartículas Cu/Ore13; Cu/Ore15; Cu/Ore39 y Cu/Ore41:

Para examinar más a fondo los fitoquímicos del extracto e infusión de orégano y sus posibles grupos funcionales responsables de la reducción y estabilización del Cu-Np, se realizó análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (IRFT) del extracto e infusión de hojas y tallos de orégano. Este análisis tiene como objetivo identificar los grupos funcionales químicos que podrían estar implicados en la reducción y estabilización de las nanopartículas de cobre (Np Cu).

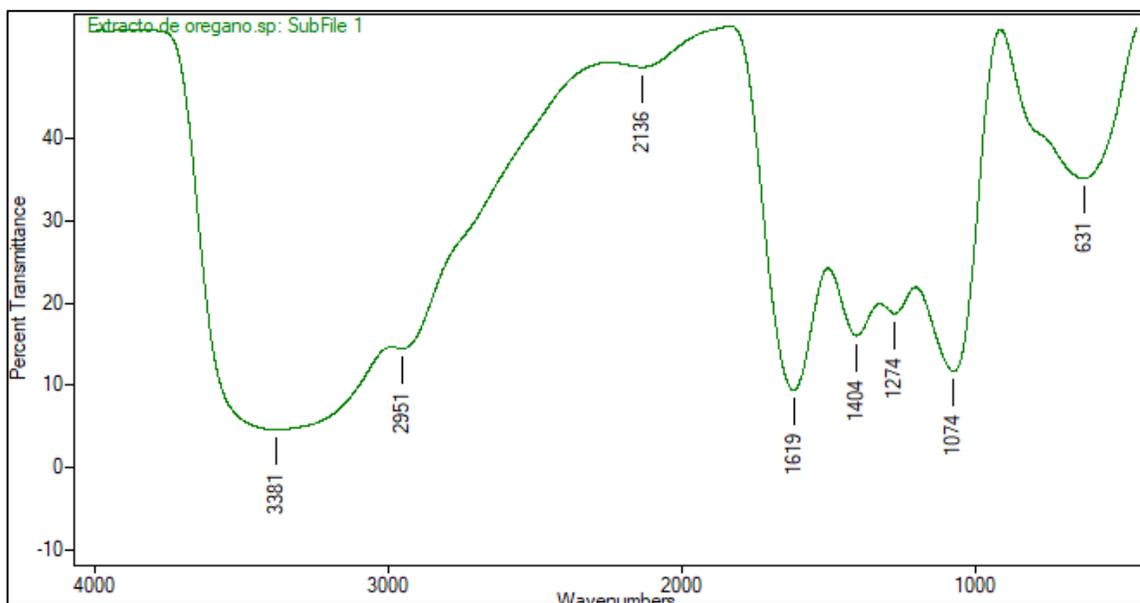


Figura 71. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier de Extracto Orégano

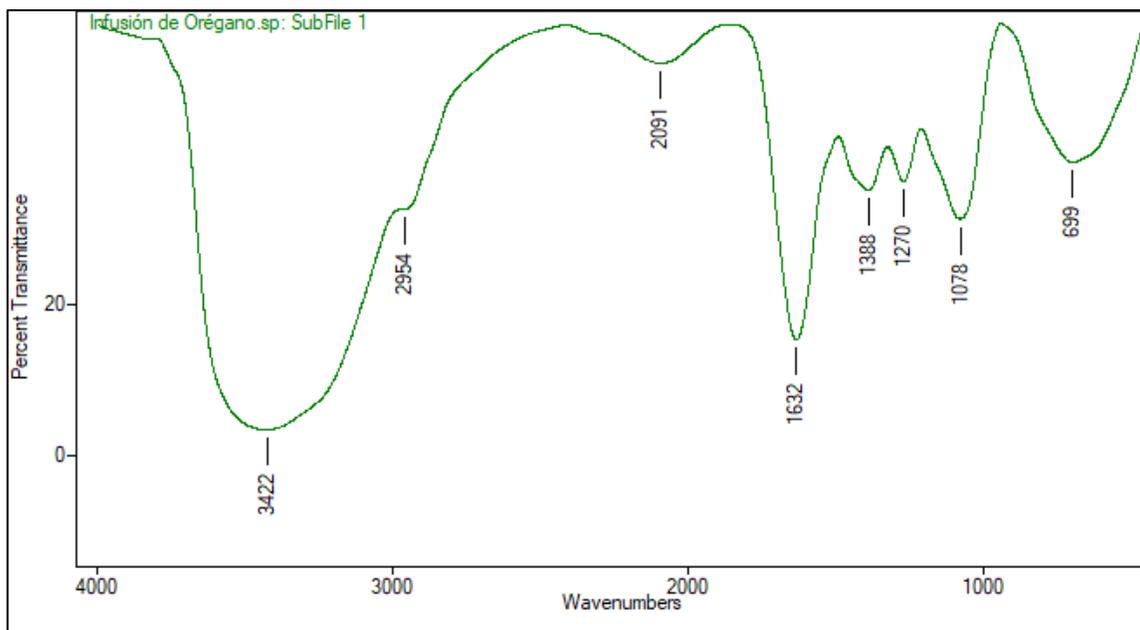


Figura 72. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier de infusión Orégano

Las Fig. 71 y 72 muestra los espectros RIFT para el extracto e infusión de orégano y evidencian las siguientes señales importantes: **3381 y 3422 cm⁻¹** en el extracto e infusión respectivamente, se asignan a la vibración de estiramiento de

los grupos alcohólicos (-OH), presentes en las estructuras químicas de fenoles, flavonoides saponinas, taninos, triterpenos, cumarinas y algunos alcaloides. **2951 y 2954 cm^{-1}** , corresponde a los estiramientos de enlaces C-H en grupos metileno (CH_2) o metilo (CH_3), típicos de cadenas alifáticas, presentes en las saponinas, taninos, triterpenos, alcaloides, igualmente en los flavonoides, algunas cumarinas y las quinonas. **2136 y 2091 cm^{-1}** que puede ser evidencia la presencia de un triple enlace $\text{C}\equiv\text{C}$. **1606 cm^{-1} y 1632 cm^{-1}** , bandas asociada a enlaces dobles $\text{C}=\text{C}$ de grupos aromáticos o $\text{C}=\text{O}$ de cetonas. **1404 cm^{-1} y 1388 cm^{-1}** : Deformación angular de C-H en grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) y metilo ($-\text{CH}_3$). **1274 cm^{-1} y 1074 cm^{-1} (extracto) y 1270 cm^{-1} y 1080 cm^{-1} (inf)** bandas típicas de los enlaces C-O en alcoholes. En este caso, refuerzan la presencia de fenoles en el extracto. **631 cm^{-1} y 699 cm^{-1}** : bandas asignables a anillos aromáticos sustituidos

También se realizó el espectro del sulfato de cobre anhidro con el cual se realizaron las síntesis de las nanopartículas; con la finalidad de identificar si en el espectro de las nanopartículas se observaban señales correspondientes al sulfato de cobre.

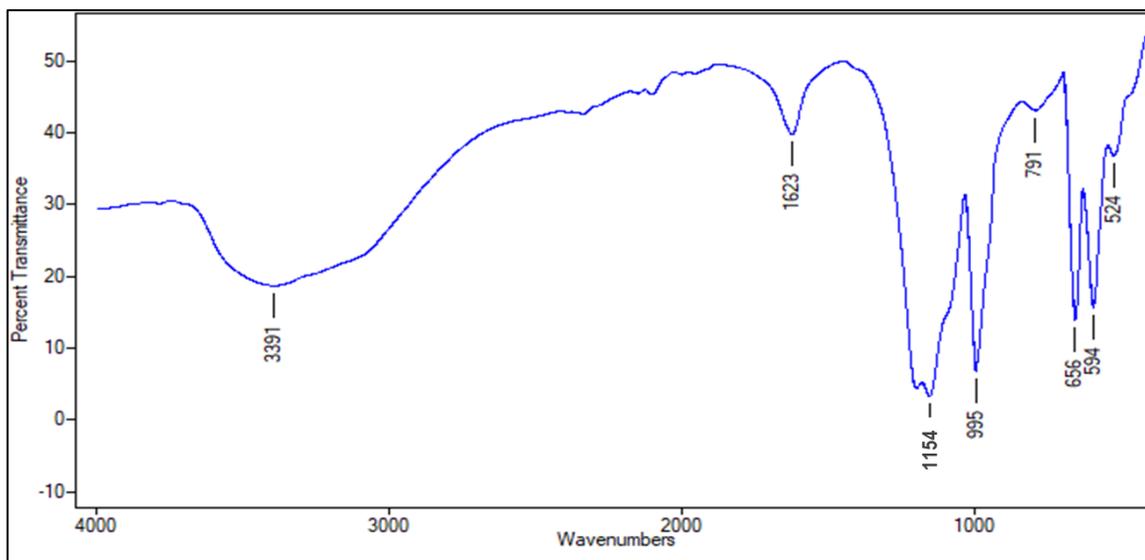


Figura 73. Espectroscopia IRFT de Sulfato de cobre anhidro

La banda en 3391 cm^{-1} es la frecuencia de estiramiento del enlace (O-H) en moléculas de agua de hidratación. La banda en 1623 cm^{-1} corresponde con deformaciones angulares en el enlace H-O-H. El pico en 1154 cm^{-1} corresponde frecuencia de estiramiento asimétrico del enlace S-O. El pico en 995 cm^{-1} , se asocia a la frecuencia de estiramiento simétrico del enlace S-O. La señal en 791 cm^{-1} corresponde a la deformación fuera del plano del enlace S-O. Las señales 656 cm^{-1} y 554 cm^{-1} , corresponden con deformaciones simétricas y asimétricas en el plano.

A continuación se presentan los espectros comparativos de las nanopartículas de cobre con el extracto o infusión y sulfato de cobre.

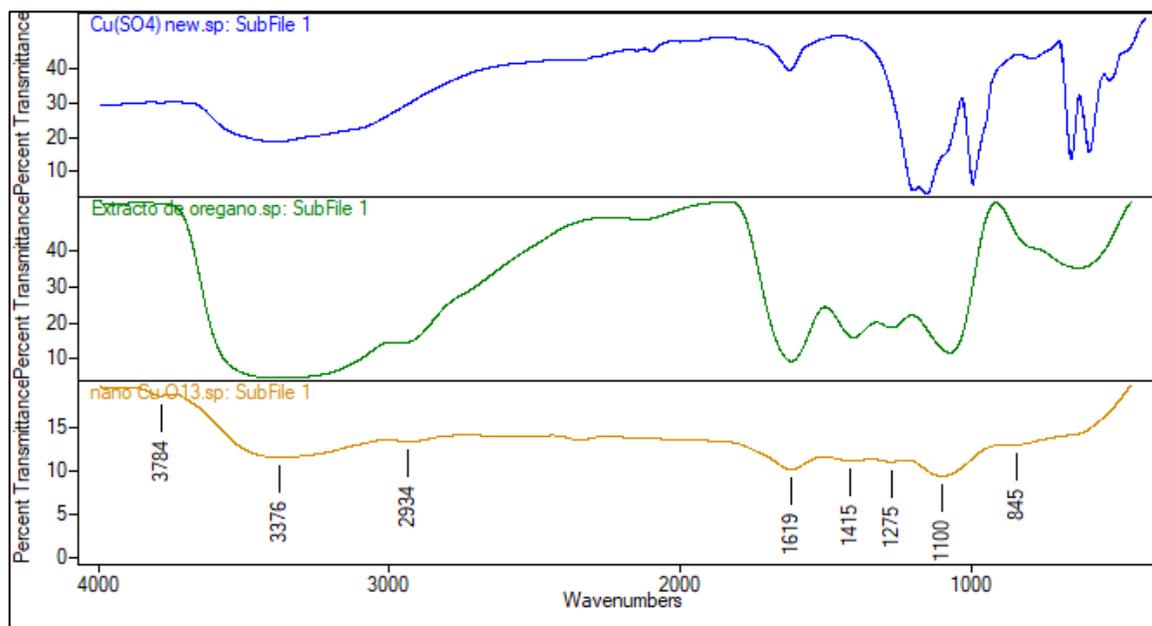


Figura 74. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore13–Ext, sulfato de cobre y extracto de orégano.

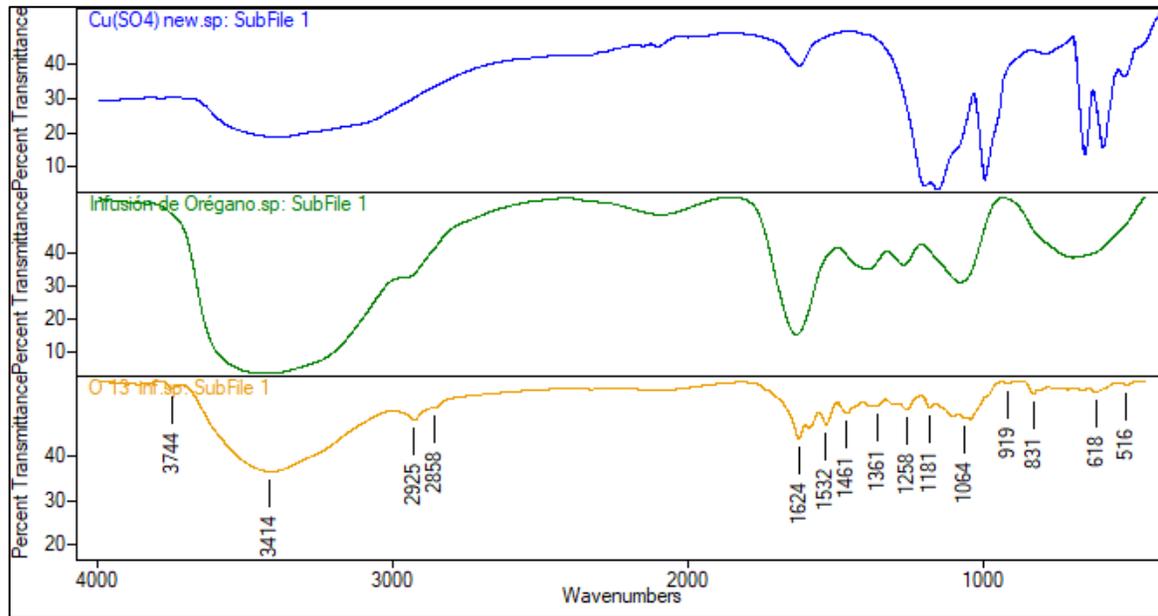


Figura 75. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore13–Inf, sulfato de cobre e infusión de Orégano

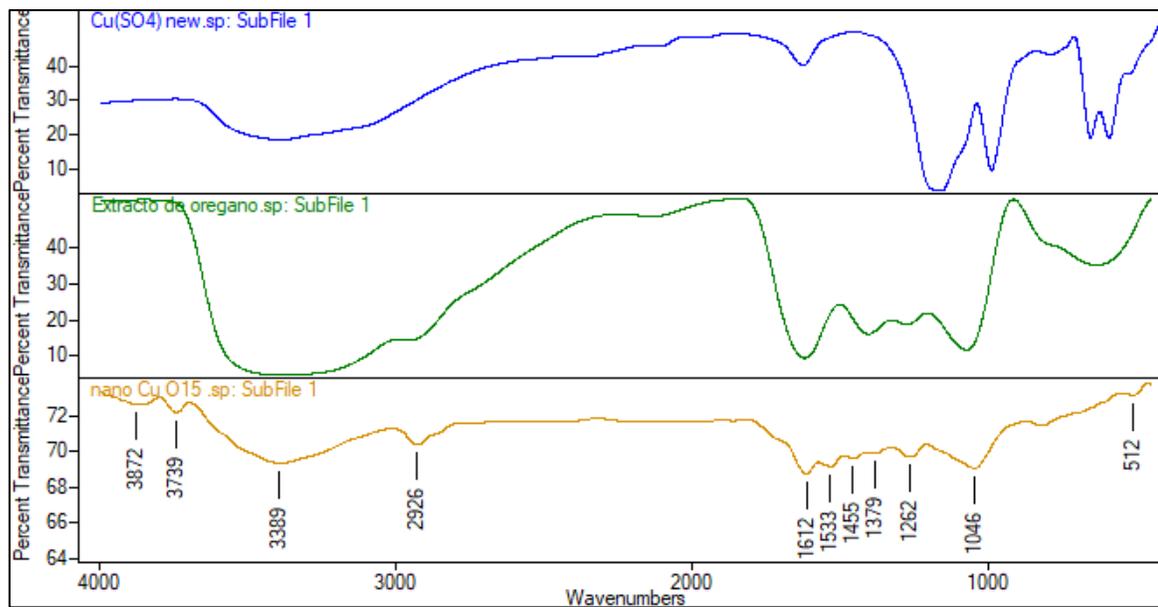


Figura 76. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore15–Ext, sulfato de cobre y extracto de Orégano

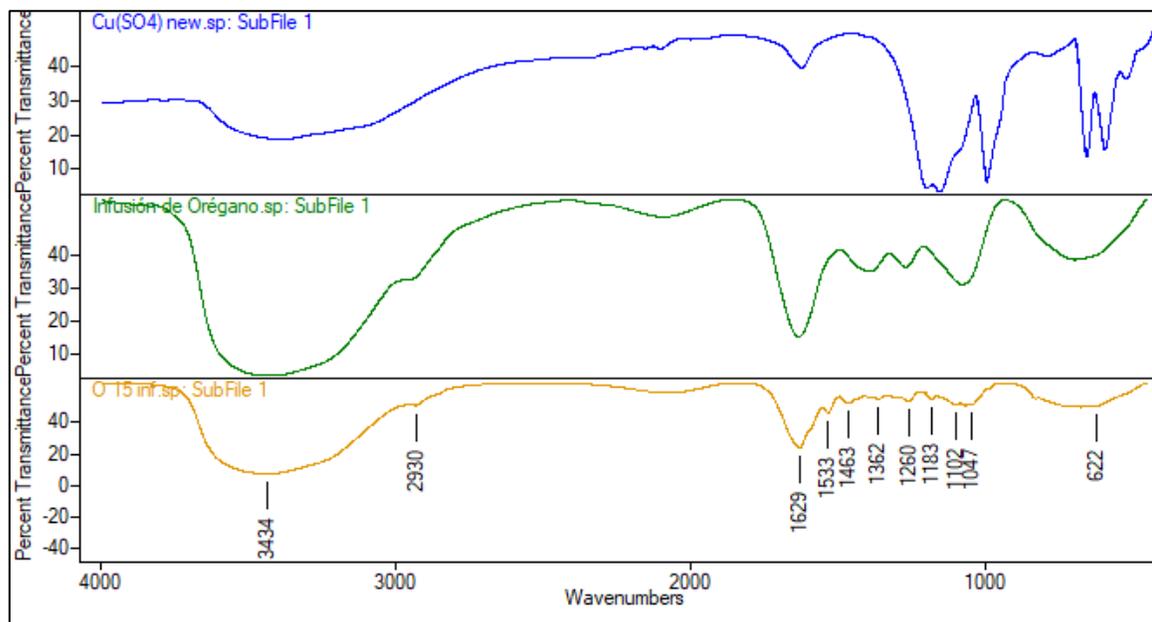


Figura 77. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore15–Inf, sulfato de cobre e infusión de Orégano

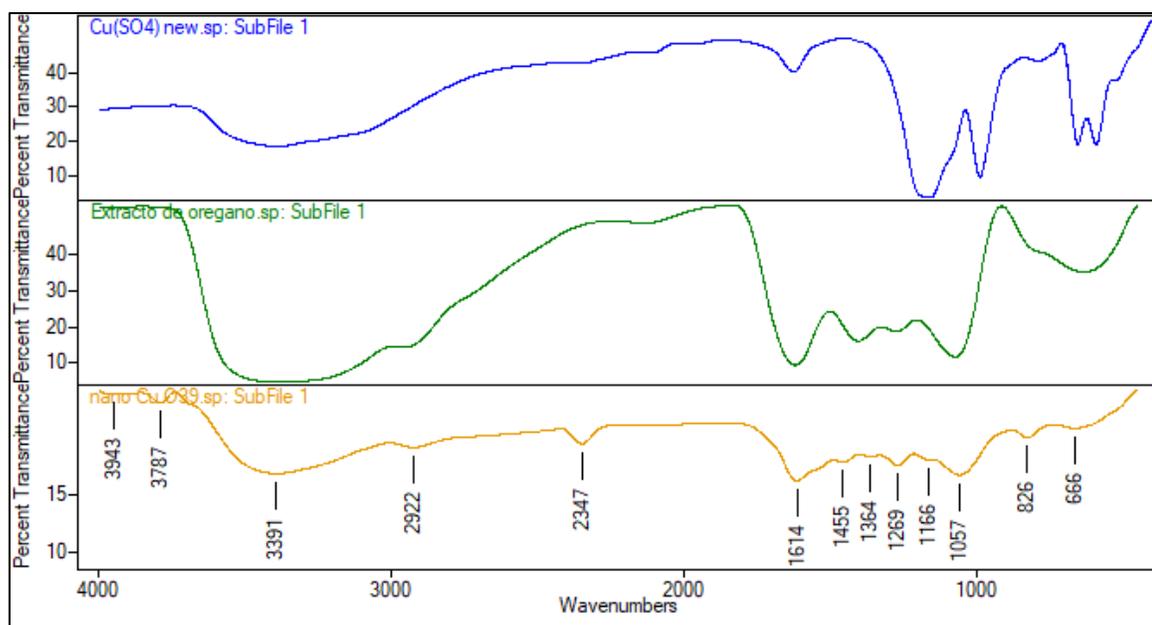


Figura 78. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore39–Ext, sulfato de cobre y extracto de Orégano

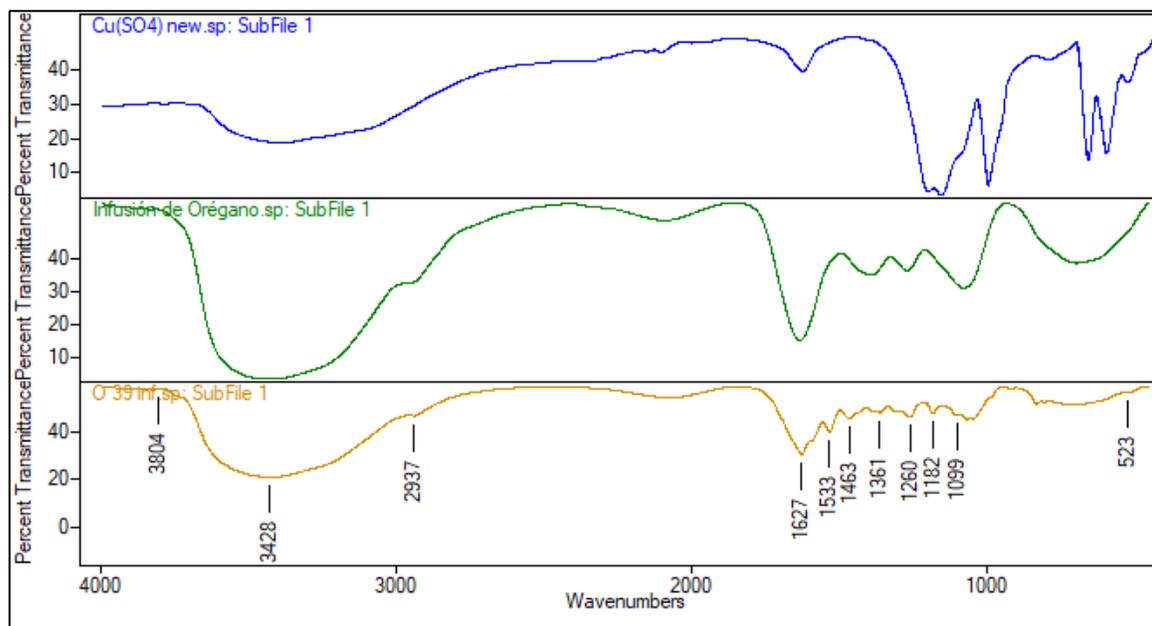


Figura 79. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore39-Inf, sulfato de cobre e infusión de Orégano,

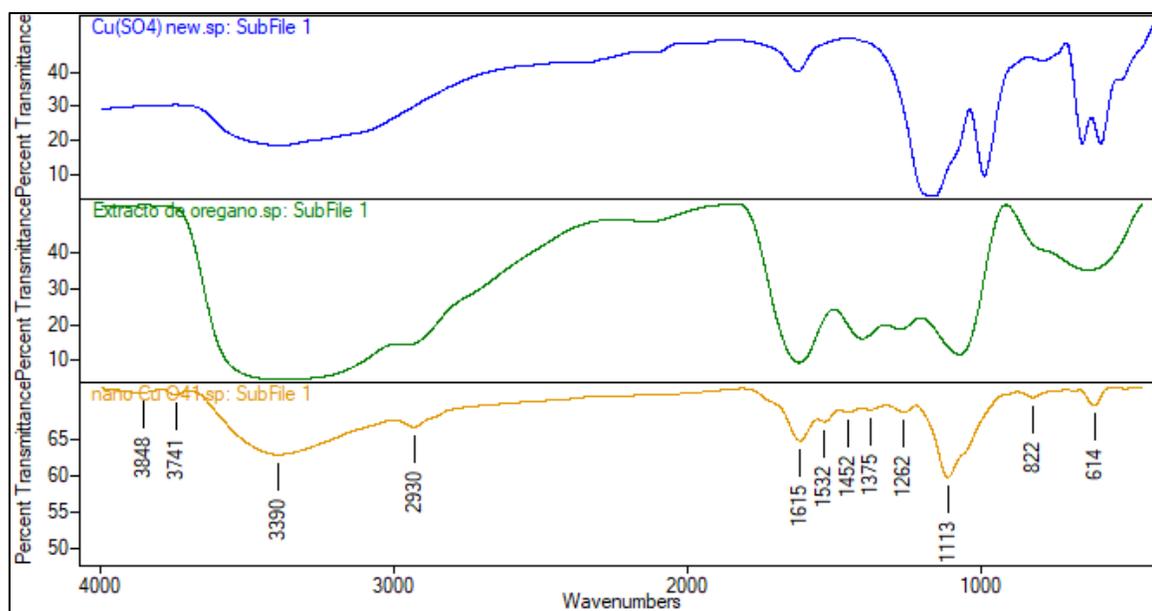


Figura 80. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore41-Ext, sulfato de cobre y extracto de Orégano.

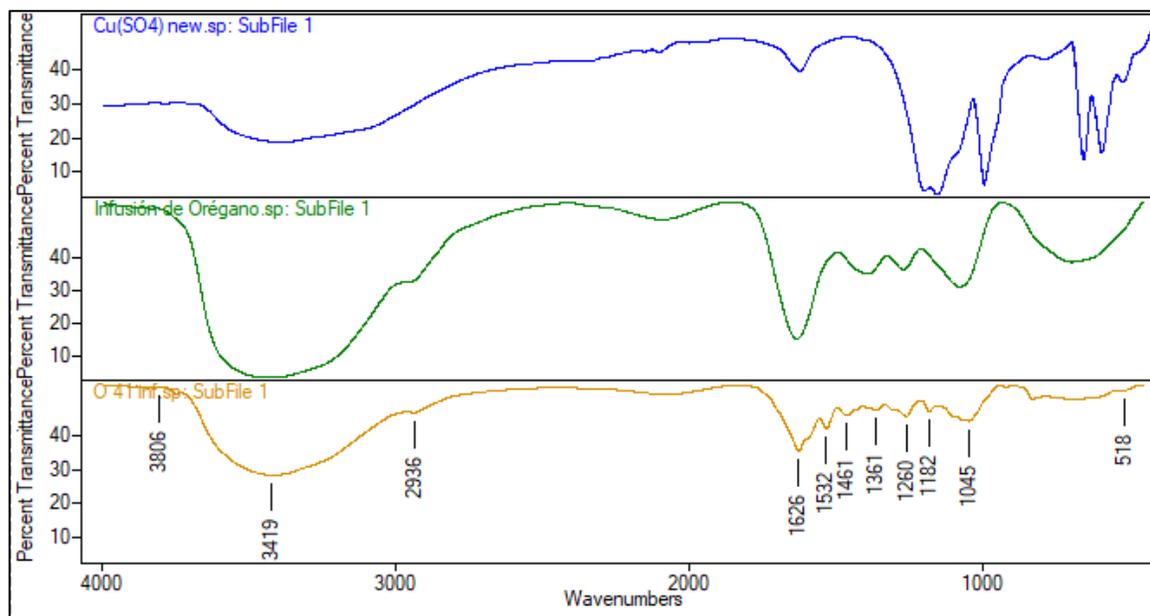


Figura 81. Espectros comparativos de IRFT de Cu/Ore41–Inf, sulfato de cobre e Infusión de Orégano.

Como se puede observar en los espectros mostrados en las Figuras 74 a 81, los espectros de infrarrojo de las nanopartículas sintetizadas con extracto e infusión de orégano evidencian claramente la presencia de fitomoléculas del extracto o infusión en la superficie de las Cu NPs. La mayoría de las bandas de absorción del extracto e infusión de orégano también están presentes en el espectro FT-IR de las Cu NPs, ya sea en posiciones idénticas o con ligeros desplazamientos. Esto sugiere que tanto los extractos como las infusiones no solo actúan como agentes biorreductores, sino también como moléculas protectoras o estabilizantes en la superficie de las nanopartículas de cobre.

Los picos alrededor de 615 cm^{-1} en los espectros IRFT de **Cu/Ore13-Inf**, **Cu/Ore15-Inf** y **Cu/Ore41-Ext** podrían atribuirse a las vibraciones del enlace cobre-oxígeno en el óxido cuproso (Cu_2O), mientras que los picos observados entre 512 y 523 cm^{-1} en los espectros de **Cu/Ore13-Inf**, **Cu/Ore15-ext**, **Cu/Ore39-inf** y **Cu/Ore41-Inf** son atribuibles a las vibraciones del enlace cobre-oxígeno en el óxido cúprico (CuO) [73]. Además, en todos los espectros se detectan picos adicionales, no presentes en los extractos o infusiones originales, lo cual podría deberse a las diferentes interacciones de los grupos funcionales

con la superficie de las nanopartículas de cobre, óxido de cobre (I) o óxido de cobre (II).

Cabe destacar que la mayoría de las nanopartículas estabilizadas con extractos carecen de bandas características de óxidos, mientras que todas las nanopartículas estabilizadas con infusiones presentan dichas bandas. Estos resultados son coherentes con los obtenidos por UV-Vis, y podrían explicarse por la mayor concentración de fitoquímicos disueltos en las infusiones, lo que favorece la oxidación del cobre. Estudios previos han demostrado que tanto los extractos como las infusiones son una fuente rica en compuestos fenólicos y sus glucósidos. Aunque el mecanismo exacto solo puede postularse mediante procedimientos espectroscópicos in situ, se cree que estos compuestos juegan un papel clave en las reacciones redox que ocurren durante la reducción de las nanopartículas de Cu(II) a Cu(I) y finalmente a Cu(0).

3.5.6. Caracterización por espectroscopía de absorción atómica de nanopartículas (Cu/Ore13-Ext; Cu/Ore15-Ext; Cu/Ore39-Ext y Cu/Ore41-Ext:

En la tabla 14 se muestra el resultado de los análisis por absorción atómica, estos revelan las siguientes concentraciones de cobre en los sistemas de nanopartículas de cobre sintetizados:

Tabla 14. Concentración de cobre en las nanopartículas de cobre estabilizadas con orégano

Sistema	[Cu] $\pm\Delta$ [Cu] (ppm)
Cu/Ore13-Ext	6,47 \pm 0,12
Cu/Ore13- Inf	43,33 \pm 3,54
Cu/Ore15-Ext	9,67 \pm 0,21
Cu/Ore15- Inf	58,67 \pm 4,77
Cu/Ore39-Ext	29,33 \pm 2,44

Cu/OreO41-Ext	29,67± 2,43
---------------	-------------

Como puede observarse en la tabla 14, al utilizar la infusión la concentración de nanopartículas aumenta considerablemente, lo que es esperado, ya que las infusiones presentaron una mayor actividad antioxidante que los extractos, por lo que la cantidad de cobre reducido por las infusiones es superior al obtenido con los extractos.

3.6. Ensayos in vitro de la actividad antifúngica de las nanopartículas Cu/Ore frente al hongo *Fusarium oxysporum.f. sp cubense*.

3.6.1. Caracterización del hongo *fusarium oxysporum cubense* utilizado.

El Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) suministró las características del hongo utilizado para realizar los ensayos invitro llevado a cabo en este proyecto, en ese sentido nos informa que el análisis en el BLAST de NCBI de los resultados de la secuenciación, indica que *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* isolate Foc_AB13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. Sequence ID: OP090652.1 Length: 540 Number of Matches: 1 presenta una cobertura de 96% y un porcentaje de identidad de 92.86%, por lo que se concluye que es altamente probable que la secuencia encontrada sea un homólogo de las de la base de datos, por lo que es altamente probable que se esté trabajando con *F. oxysporum sp. Cubense*. La información recibida es considerada confiable y proviene de una fuente con amplia experiencia y reconocimiento en el área como lo es la Gerencia de Agricultura y Soberanía Alimentaria.

3.6.2. Conteo de colonias con el hongo diluido en 1/20.

Haciendo los cálculos, el número de colonias es de $7,8 \times 10^5 \pm 0,8$ UFC/mL y con esta concentración, finalmente se realizaron nuevos ensayos que se muestran a continuación:

La actividad antifúngica fue determinada utilizando el método de envenenamiento del medio, tanto para la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelar con la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

5.8.3. Método de envenenamiento del medio

Este estudio evaluó la actividad antifúngica de extractos e infusiones de orégano a diversas concentraciones, así como de sistemas de nanopartículas estabilizadas con diferentes concentraciones de estos compuestos y diferentes concentraciones de cobre, frente al crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (*Foc*).

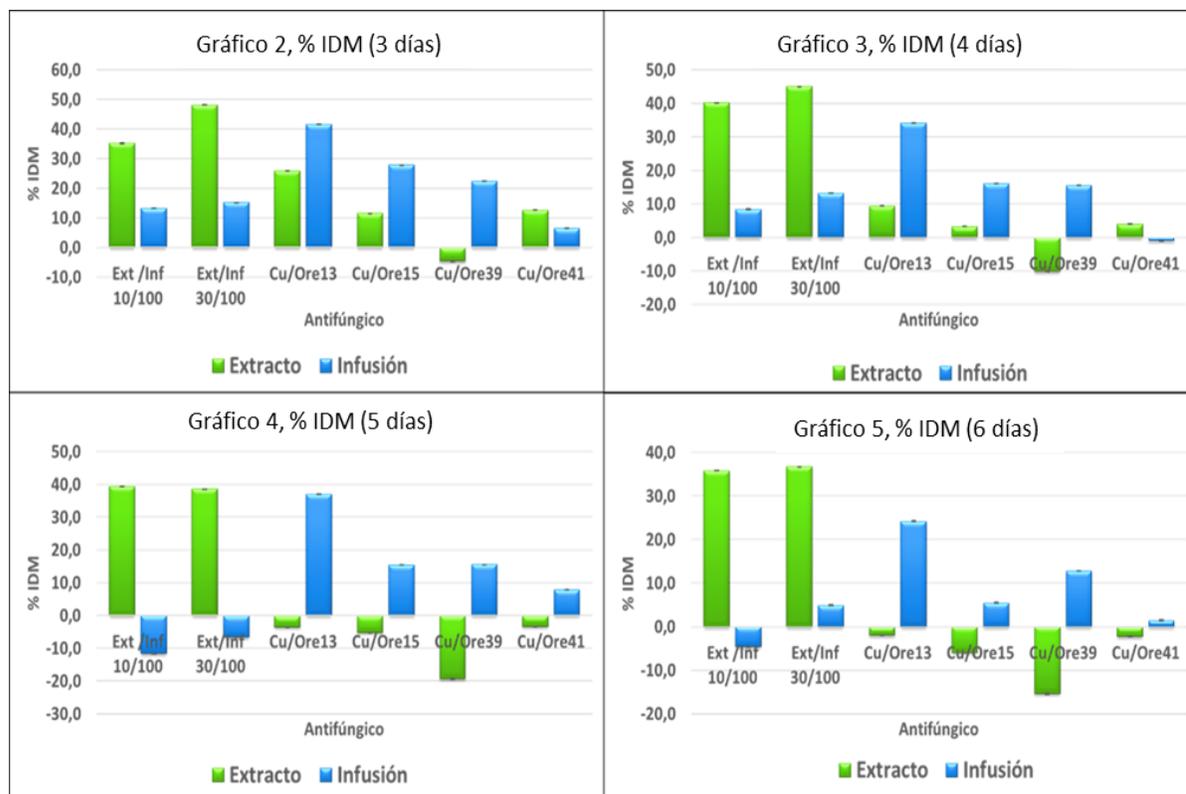
Los resultados de cada sistema se presentan a continuación.

Tabla 15. Porcentaje de Inhibición del Diámetro Micelar (%IDM) inducido por los antifúngicos bajo estudio

Día N°	Muestra	% IDM \pm Δ %ICM Extracto	% IDM \pm Δ %ICM Infusión
3	Extracto /Infusión 10/100	35,19 \pm 0,16	13,23 \pm 0,13
	Extracto/ Infusión 30/100	48,15 \pm 0,05	15,17 \pm 0,04
	Cu/Ore13	25,90 \pm 0,05	41,63 \pm 0,02
	Cu/Ore15	11,47 \pm 0,08	27,84 \pm 0,03
	Cu/Ore39	-4,63 \pm 0,24	22,39 \pm 0,07
	Cu/Ore41	12,67 \pm 0,05	6,57 \pm 0,03
4	Extracto/ Infusión 10/100	40,16 \pm 0,05	8,37 \pm 0,12
	Extracto /Infusión 30/100	45,04 \pm 0,05	13,17 \pm 0,007
	Cu/Ore13	9,43 \pm 0,08	34,15 \pm 0,07
	Cu/Ore15	3,17 \pm 0,09	16,02 \pm 0,09

	Cu/Ore39	$-10,16 \pm 0,27$	$15,44 \pm 0,11$
	Cu/Ore41	$3,90 \pm 0,07$	$-0,98 \pm 0,07$
5	Extracto/ Infusión 10/100	$39,41 \pm 0,11$	$-11,56 \pm 0,05$
	Extracto /Infusión 30/100	$38,57 \pm 0,03$	$-6,55 \pm 0,03$
	Cu/Ore13	$-3,51 \pm 0,08$	$37,04 \pm 0,06$
	Cu/Ore15	$-5,18 \pm 0,1$	$15,40 \pm 0,05$
	Cu/Ore39	$-19,36 \pm 0,26$	$15,55 \pm 0,02$
	Cu/Ore41	$3,35 \pm 0,01$	$7,85 \pm 0,10$
6	Extracto/ Infusión 10/100	$35,81 \pm 0,04$	$-4,63 \pm 0,12$
	Extracto /Infusión 30/100	$36,73 \pm 0,05$	$4,89 \pm 0,15$
	Cu/Ore13	$1,96 \pm 0,08$	$24,20 \pm 0,18$
	Cu/Ore15	$-5,94 \pm 0,06$	$5,48 \pm 0,12$
	Cu/Ore39	$-15,39 \pm 0,08$	$12,72 \pm 0,16$
	Cu/Ore41	$-2,22 \pm 0,05$	$1,44 \pm 0,16$

Estos resultados se presentan graficamente en las siguientes imágenes a fin de poder comprara visualmente el poccentaje de inhibición



Los gráficos 2 a 5 muestran las actividades antifúngicas de las nanopartículas de cobre estabilizadas con extracto e infusión de orégano en diferentes tiempos de incubación (3 a 6 días). Se observa en cada gráfico que, tanto en nanopartículas estabilizadas con extracto como con infusión, la inhibición disminuye a medida que aumenta la concentración de cobre (ver Tabla 15). Los resultados indican que las nanopartículas estabilizadas con infusión presentan mayor actividad antifúngica a lo largo del período de estudio, alcanzando la mayor actividad al tercer día (Gráfico 2). Por otro lado, los sistemas de nanopartículas estabilizados con extracto dejaron de inhibir completamente el crecimiento fúngico a partir del quinto día.

En particular, las nanopartículas estabilizadas con infusión muestran una leve disminución en su actividad antifúngica a partir del cuarto día, manteniéndose casi constantes entre los días cuatro y seis. La excepción es el sistema Cu/Ore15-Inf, que experimenta una disminución significativa al sexto día. El sistema Cu/Ore41-Inf muestra un comportamiento oscilante,

posiblemente debido a que las concentraciones elevadas de cobre debilitan al hongo, pero al mismo tiempo, concentraciones más altas de infusión podrían favorecer su crecimiento, causando fluctuaciones diarias en la actividad antifúngica.

En los gráficos 2, 3 y 4, el sistema Cu/Ore13-Inf destaca como el que presenta mayor inhibición del crecimiento micelial, alcanzando un valor de $41,63 \pm 0,05$ %, seguido por Cu/Ore15-Inf con $27,84 \pm 0,03$ %, y Cu/Ore13-Ext con $25,9 \pm 0,05$ %. Sin embargo, el extracto de orégano a una concentración de 30 g/100 mL demostró una actividad antifúngica superior a la de los sistemas de nanopartículas, con un valor de $48,15 \pm 0,05$ %. Esto sugiere que el extracto de orégano podría ser un antifúngico natural prometedor. No obstante, dada su alta solubilidad en agua podría limitar su eficacia en entornos expuestos a lluvias o sistemas de riego, ya que podría lixiviarse y perderse en el suelo. Este problema no se observaría con las nanopartículas metálicas, que podrían ser absorbidas y permanecer en el suelo incluso en presencia de corrientes de agua, proporcionando un efecto antifúngico más duradero.

Se realizó un registro fotográfico donde se evidencia la inhibición producida por el sistema Cu/Ore13-Inf. (Figura 82) y Cu/Ore13-Ext (Figura 83).

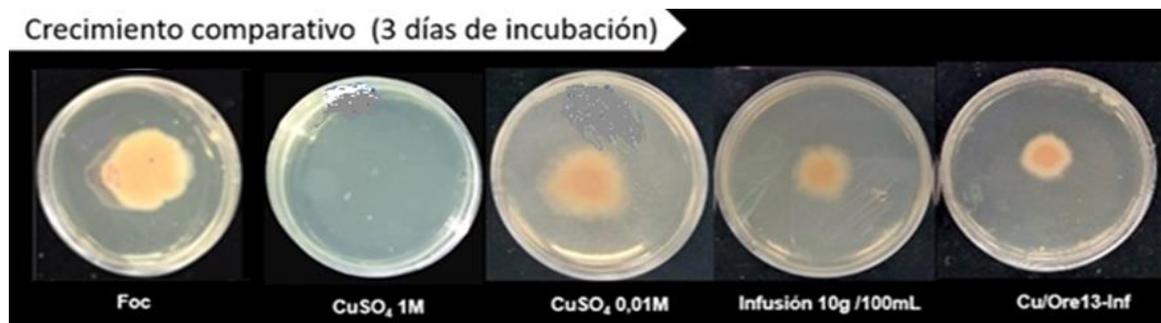


Figura 82. Inhibición del hongo producida por Cu/Ore13-Inf, Sulfato de cobre 1M y 0,01M e infusión 10g/100mL

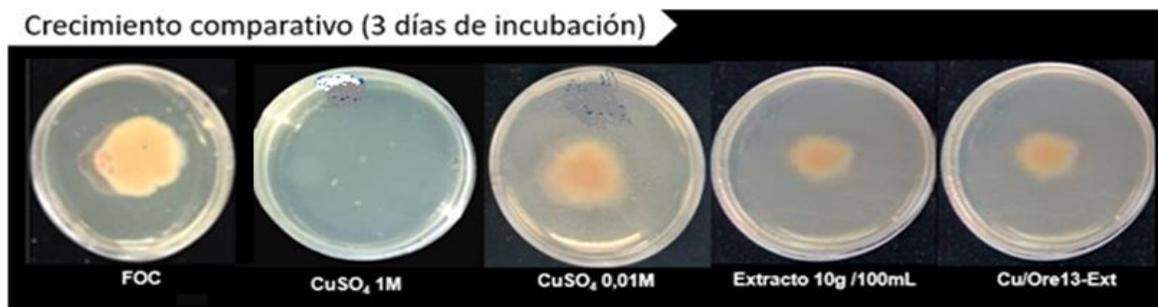


Figura 83. Inhibición producida por Cu/Ore13-Ext Sulfato de cobre 1M y 0,01M e extracto 10g/100mL.

Se observa que el sulfato de cobre 1M inhibe completamente el crecimiento del hongo, mientras que, a una concentración de 0,01M pierde la capacidad inhibitoria. **El extracto, la infusión** y sus respectivas nanopartículas **Cu/Ore13-Inf** y **Cu/Ore13-Ext** inhiben en mayor proporción el crecimiento del hongo que el sulfato de cobre 0,01M.

El efecto antifúngico de las nanopartículas de cobre podría deberse a diversos mecanismos que afectan la viabilidad de las células fúngicas. Estas nanopartículas tienden a aglomerarse alrededor de la membrana celular, generando especies reactivas de oxígeno que comprometen la integridad de la membrana y las enzimas responsables del intercambio de sustancias, lo que conduce a la deshidratación y pérdida de nutrientes. Además, estudios previos han señalado que un mecanismo clave es la liberación de iones de cobre, los cuales interactúan con elementos como el azufre y el fósforo, presentes en el ácido ribonucleico de las células. Esta interacción provoca disfunciones celulares que culminan en la apoptosis Figura 84.[74]. Esto es coherente con los resultados obtenidos en los análisis invitro, pues las nanopartículas más activas resultaron ser las estabilizadas con infusión, las cuales en su caracterización por UV-Vis e IRFT mostraron la presencia de óxidos de cobre, los cuales parecen ser los responsables de la inhibición del crecimiento micelar.

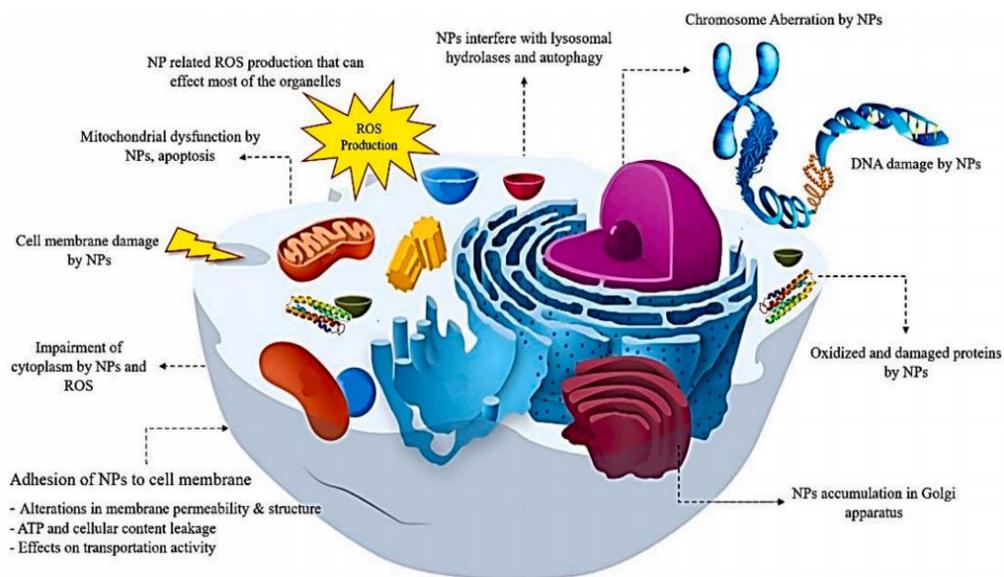


Figura 84. Representación gráfica del mecanismo propuesto para la actividad antifúngica en respuesta a nanopartículas de cobre (Cu NP)[73].

3.6.4. Método de concentración mínima inhibitoria (CMI)

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para el hongo *Fusarium oxysporum cubense* se determinaron siguiendo el método de envenenamiento del medio seleccionando la muestra donde se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición, es decir, Cu/Ore13-Inf. Se puede observar en la tabla 15 que el mayor porcentaje de inhibición se obtuvo el día tres con un %ICM de 17,95% con la muestra diluida a 1/4. También se observa que la muestra Cu/Ore13-Inf diluida a 1/8 de la concentración inicial generó un mayor porcentaje de inhibición que la muestra concentrada, provocando una mejor distribución de las nanopartículas en el medio de cultivo, posiblemente las altas concentraciones de nanopartículas podrían formar agregados o no distribuirse homogéneamente, disminuyendo su eficiencia al contacto con el hongo. Como otra opción sería que una mayor dilución podría favorecer la penetración del compuesto antifúngico a través de la pared celular del hongo. En concentraciones altas, el compuesto podría saturar la membrana celular y dificultar su entrada al interior. La influencia de otros factores como los componentes inhibidores la muestra concentrada podría

contener componentes que inhiban la actividad del compuesto antifúngico principal. La dilución podría reducir la concentración de estos componentes inhibidores permitiendo que el compuesto antifúngico actué con mayor eficacia. En resumen, es posible que la dilución favorezca una mejor difusión del compuesto y una mayor superficie de contacto con el hongo. En algunos casos una concentración muy alta del compuesto antifúngico podría tener un efecto estimulante sobre el crecimiento del hongo (efecto hormético, verbo proveniente de la palabra Hormesis, que proviene del griego, que significa excitar, estimular, es el fenómeno de respuesta a dosis, caracterizado por una estimulación por dosis baja y una inhibición para dosis altas).[75]

La dilución podría llevar la concentración al rango óptimo para la inhibición del crecimiento.

Tabla 16. Resumen de los resultados del % de inhibición obtenidos del método de concentración mínima inhibitoria.

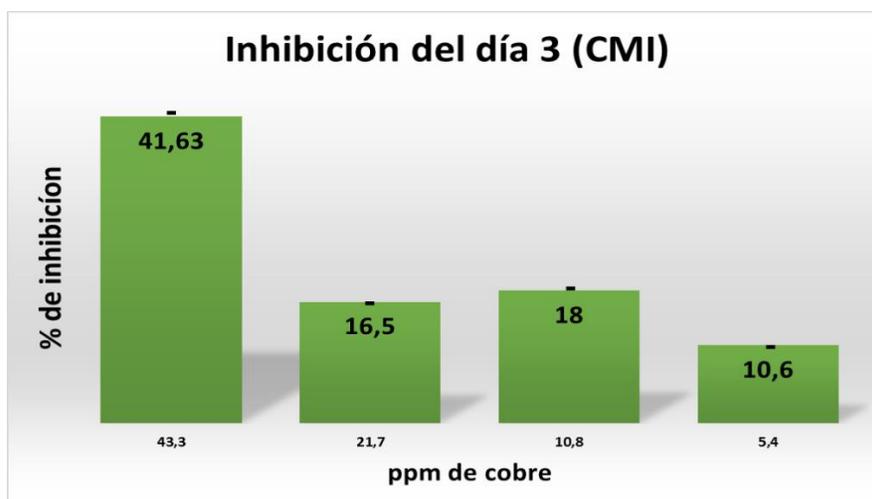
Día N°	Muestra	% Inhibición	± %Inhibición
DIA 3	Cu/Ore13-Inf (C)	6,29	0,15
	Cu/Ore13-Inf (1/2)	16,47	0,06
	Cu/Ore13-Inf(1/4)	17,95	0,03
	Cu/Ore13-Inf(1/8)	10,55	0,07
DIA 4	Cu/Ore13-Inf (C)	-2,86	0,12
	Cu/Ore13-Inf (1/2)	0,98	0,07
	Cu/Ore13-Inf(1/4)	2,94	0,06
	Cu/Ore13-Inf(1/8)	-1,51	0,04
DIA 5	Cu/Ore13-Inf (C)	-11,25	0,14
	Cu/Ore13-Inf (1/2)	-6,65	0,14
	Cu/Ore13-Inf(1/4)	-12,60	0,04
	Cu/Ore13-Inf(1/8)	-22,25	0,08

Se graficaron las concentraciones de cobre en ppm para la especie Cu/Ore13-Inf frente a los porcentajes de inhibición obtenidos con cada concentración de muestra Resultando en la siguiente



Figura 85. CMI de ore13 en infusión al tercer día de incubación

Gráfico 5. % de inhibición del sistema Cu/Ore13-inf frente al hongo



V.Conclusiones

- Se logró obtener el extracto y la infusión de *Lippia micromera* (orégano) a partir de sus hojas. El extracto acuoso se obtuvo por extracción ultrasónica y la infusión por extracción con calentamiento.
- La infusión de orégano mostró mayor actividad antioxidante y mayor concentración de fenoles y flavonoides en comparación con el extracto.

- Se sintetizaron con nanopartículas de cobre utilizando los extractos y las infusiones de orégano.
- Los análisis por dispersión de luz dinámica develaron tamaños de nanopartículas inferiores a 9 nm
- Los análisis por Microscopía de Fuerza Atómica revelaron que se obtuvieron nanopartículas esféricas con tamaños inferiores a 9 nm.
- Los análisis UV-Vis sugieren que las nanopartículas sintetizadas con extracto poseen un estado de oxidación cero, a diferencia de las obtenidas con infusión, las cuales consisten en una mezcla de cobre metálico y sus óxidos
- El análisis por Difracción de rayos X no fue concluyente en la determinación del estado de oxidación del cobre.
- Los análisis por espectroscopía de infrarrojo mostraron que los extractos y las infusiones fungen como estabilizante de las nanopartículas de cobre y la presencia de nanopartículas de óxido de cobre.
- Los análisis por absorción atómica a la llama arrojaron una concentración de cobre en las nanopartículas entre 6,47 ppm y 58,77 ppm.
- No se logró hacer Microscopia Electrónica de alta Resolución ni Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X por falta de equipos funcionales en el País.
- Las nanopartículas de cobre estabilizadas con infusión de orégano mostraron una actividad antifúngica frente al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, superior a las de sus homologas sintetizadas con extractos de orégano.

VI.Referencias

- [1] Aminuzzaman, M., Kei, L. M., & Liang, W. H. (2017). Green synthesis of copper oxide (CuO) nanoparticles using banana peel extract and their photocatalytic activities. *AIP Conference Proceedings*, 1828, 020016. <https://doi.org/10.1063/1.4979387>
- [2] Quintili, M. (2012). *Nanociencia y Nanotecnología, un mundo pequeño*. Centro de Estudios en Diseño y Comunicación, 125-155. ISSN 1668-5229
- [3] Alonzo, B. López, A. Rodríguez, C. Lázaro, D. (2015). *La nanotecnología a 40 años de su aparición: logros y tendencias*, academia Mexicana de ciencias XXV verano de la investigación científica. Vol. XVIII N.º 66.

- [4] Tolaymat, T., Badawy, A., Genaidy, M., Scheckel, K., Luxton, T., & Suidan, M. (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment*, 408(5), 999–1006.
- [5] Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Daskalakis, N., Jeuken, L., Povey, M., O'Neill, A., & York, D. (2010). Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. Coli*. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1625–1636.
- [6] Neal, A. L. (2008). What can be inferred from bacterium–nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology*, 17(5), 362–371. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0217-x>
- [7] Grass, G., Rensing, C., & Solioz, M. (2010). Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1541–1547. doi:10.1128/aem.02766-10
- [8] Kasana, R. C., Panwar, N. R., Kaul, R. K., & Kumar, P. (2016). *Copper Nanoparticles in Agriculture: Biological Synthesis and Antimicrobial Activity*. Springer International Publishing Switzerland, 129.
- [9] P. Kanhed, S. Birla, S. Gaikwad, A. Gade, A.B. Seabra, O. Rubilar, et al., In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi, *Mater. Lett.* 115 (2014) 13–17.
- [10] Hernández Díaz, M. P. (2013). Síntesis de nanopartículas de plata biológicamente asistida con *Opuntia Sp.* y su incorporación en membranas poliméricas nanofibrosas. Centro de Investigación en Química Aplicada.
- [11] Ronquillo Piloza, R. E., & PaucarBanchón, C. J. (2019). Obtención de nanopartículas de Ag a partir del aceite extraído de las semillas de zanahoria (*Daucus carota*) para potenciar la actividad fúngica bactericida.
- [12] Salguero Salas, M. A. (2016). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando como reductores extractos de menta (*Origanum vulgare*) y cilantro (*Coriandrum sativum*), y como funcionalizante el látex de sangre de drago (*Croton lechleri*). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Universidad de Guayaquil.
- [13] Godoy Pérez, L. M., Gómez Iriarte, Y. J. (2022). Evaluación de la actividad antifúngica y citotóxica de extractos, fracciones y aceite esencial obtenidos de las hojas de *Origanum vulgare*. *Revista de Terapéuticas Alternativas y Farmacología Vegetal*, 18.

- [14] National Academy of Sciences. 1980. Desarrollo y Control de las Enfermedades de las Plantas. Control de Plagas de Plantas y Animales. Vol 1. Editorial Limusa. México. pp. 223.
- [15] Cook, R.J. & Baker, K.F. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minn. 539
- [16] Massó Agro Department (02 de marzo 2023), Fusarium R4T amenaza las plantaciones de banano en Venezuela. <https://www.phytoma.com/noticias/noticias-de-actualidad/fusarium-r4t-amenaza-las-plantaciones-de-banano-en-venezuela>
- [17] Ploetz, R. C. (2015). Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. Crop Protection. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.007>
- [18] López, P. (1979). Verbenaceae. Flora de Venezuela. Universidad de los Andes.
- [19] Burbano David, D., Lagos Mora, L. E., Álvarez Ordoñez, S. (2021). Sensibilidad de phytophthora infestans a extractos acuosos de Lippia organoides y Origanum Vulgare. Artículo científico, 32(1), 149-162. <https://doi.org/10.15517/am.v32i1.40573>.
- [20] Stashenko, E., & Martínez, J. R. (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género Lippia (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. Revista Académica de Ciencias, 38(Supl.), 89-105.
- [21] Rao, C. N. R., Müller, A., & Cheetham, A. K. (2004). Nanomaterials – An Introduction. En C. N. R. Rao, A. Müller y A. K. Cheetham (Eds.), Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications (p. 1-29). Editorial Weinheim: Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/352760247X.ch1>
- [22] Giménez, X. (2023, octubre). ¿Que son puntos cuánticos? La revolución tecnológica que ha merecido el nobel de química. Muy Interesante. <https://www.muyinteresante.es/ciencia/61731.html>
- [23] Villatorio, F.R. (4 octubre, 2023). Front Mater Quantum dots electronic band structure. La Ciencia de la Mula Francis. <https://francis.naukas.com/2023/10/04/premio-nobel-de-quimica-2023-moungi-g-bawendi-louis-e-brus-y-alexei-i-ekimov-por-los-puntos-cuanticos-quantum-dots/d20231004-frontiersin-org-10-3389-fmats-2015-00013-front-mater-quantum-dots-electronic-band-structure/>.
- [24] Roucoux, A., Schulz, J., & Patin, H. (2002). Reduced transition metal colloids: a novel family of reusable catalysts. Chem. Rev., 102, 3757-3778.

- [25] Navlani-García, M., Salinas-Torres, D., Mori, K., Kuwahara, Y., & Yamashita, H. (2019). Tailoring the Size and Shape of Colloidal Noble Metal Nanocrystals as a Valuable Tool in Catalysis. *Catalysis Surveys from Asia*. <https://doi.org/10.1007/s10563-019-09271-7>
- [26] Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*, 5(1), 70-75.
- [27] Guajardo, J. (2013). Síntesis de nanopartículas de cobre mediante novedosa ruta química. Tesis Especial de Grado para optar al grado de doctor en ciencias de los materiales. Universidad Autónoma de San Luís Potosí.
- [28] Pachón, L. D., & Rothenberg, G. (2008). Transition-metal nanoparticles: synthesis, stability and the leaching issue. *Applied Organometallic Chemistry*, 22(6), 288–299. <https://doi.org/10.1002/aoc.1382>
- [29] Rai M, Yadav A and Gade A (2008) Current trends in phytosynthesis of metal nanoparticles. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28, 277–84
- [30] Morales-Díaz, A. B., Juárez-Maldonado, A., & Morelos-Moreno, Á. (2016). Biofabricación de nanopartículas de metales usando células vegetales o extractos de plantas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5).
- [31] Quaranta, D., Krans, T., Espirito Santo, C., Elowsky, C. G., Domaille, D. W., Chang, C. J., & Grass, G. (2011). Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 416-426.
- [32] Gordon, A. S., Howell, L. D., & Harwood, V. (1994). Responses of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(5), 408-411.
- [33] Rodríguez-Montelongo, L., De la Cruz-Rodríguez, L., Farías, R. N., & Mass, E. M. (1993). Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1144(1), 77-84.
- [34] Abd-Elsalam, K. A. (2022). Nanoestructuras de cobre: próxima generación de agroquímicos para agroecosistemas sostenibles. Elsevier.
- [35] Zapata Yurli, Tapias Gabriel, & Mori, K. (2012). Germinación y desarrollo de *Lippia micromera Schauer* en el sector cazadero minas de carbón de lobatera, Táchira- Venezuela. *Revista Chilena de Historia Natural*, 85(2), 121-126.
- [36] PlantNet. (s.f.). *Lippia micromera Schauer*. Recuperado de <https://identify.plantnet.org/k-world/flora/species/Lippia%20micromera%20Schauer/data>.

- [37] Star Environmental. (s.f.). Lippia micromera. Recuperado de <http://www.starrenvironmental.com/images/search/?q=Lippia+micromera>
- [38] Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. (s.f.). Classification: Lippia micromera Schauer. Recuperado de <https://plants.usda.gov/home/classification/47206>.
- [39] Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95–111. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.059.
- [40] Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- [41] Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- [42] Lamaison J, Carnet A. (1990). Teneurs en Principaux Flavonoids des Fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en Function de la Vegetation. *Pharmaceutica Acta Helvetia*, Vol. 65, 315-320.
- [43] Villano D, Fernandez-Pachon M, Moya M, Troncoso A, Garcia-Parrilla M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230-235.
- [44] Gulcin, I.; Alwasel, S.H. DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes* 2023, 11, 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
- [45] Peña S Rafael, Páez Jaime. (2018). Hongos Fitopatógenos. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Medina Guerra, E. (2019).
- [46] Análisis de riesgo *Fusarium Oxysporum* f. sp. cubense raza 4 tropical (Foc R4T) Plaga cuarentenaria. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, San Salvador.
- [47] Porteles, M., Rodríguez, D., Ulacio, D., & Rosas, G. (2015). Determinación de razas y grupos de compatibilidad vegetativa de *Fusarium Oxysporum* f. Sp. Cubense en musa, en los estados Carabobo, Cojedes, Guárico y Miranda. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”.
- [48] *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 tropical (syn. *Fusarium odoratissimum*). (abril, 2021). Marchitez por *Fusarium* en musáceas.
- [49] Kiran B L, Nayana K N, Raveesha K A. (2023). Evaluation of antifungal effect of medicinal plants against Panama wilt of Banana caused by *Fusarium*

oxysporum f. sp. cubense. J App Biol Biotech.;11(1):73-79. DOI: 10.7324/JABB.2023.110110.

- [50] Pérez., Édgar, Rivas, Alejandro, Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos, Departamento de Tecnología de los Alimentos Centro Universitat Politècnica de València.
- [51] Pariona, N., & Hermida-Montero, L. A. (2018). Síntesis de nanopartículas de cobre para el control de hongos fitopatógenos. Revista ECI Perú, 15(2). <https://doi.org/10.33017/RevECIPeru2018.0017>
- [52] Mali, S. C., Dhaka, A., & Githala, C. K. (2020). Green synthesis of copper nanoparticles using *Celastrus paniculatus* Willd. leaf extract and their photocatalytic and antifungal properties. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.003>.
- [53] Illiger, K. S., Sofi, T. A., Bhat, N. A., Ahanger, F. A., Sekhar, J. C., Elhendi, A. Z., Al-Huqail, A. A., Khan, F. (2020). Copper Nanoparticles: Green Synthesis and Management of Fruit Rot Disease of Chilli Caused by *Colletotrichum capsici*. Revista Saudita de Ciencias Biológicas. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.003>
- [54] Sánchez, L. (2021). Nanopartículas Cu y CuO/Cu₂O Mediadas por Extracto de *Larrea tridentata* y su Potencial en la Remediación de Agua y como Antimicrobiano. (Tesis para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/3813>
- [55] Bikdeloo, M., Irvani, M. A., Roosta, H. R., & Ghanbari, D. (2021). Green Synthesis of Copper Nanoparticles Using Rosemary Extract to Reduce Postharvest Decays Caused by *Botrytis cinerea* in Tomato. J Nanostruct, 11(4), 834-841. DOI: 10.22052/JNS.2021.04.020.
- [56] Ifeoluwa, I.A., Ifeoluwa, P.O. (2023). Green synthesis of Copper Nanoparticles and Investigation of its Antimicrobial Properties, Advanced Journal of Chemistry, Section B, 2023, 4(1), 39-52. DOI: 10.22034/ajcb.2022.323779.1106.
- [57] Manogar, P. Raja, V. Simon. D, Siva, S. Soundhar,A. (2023). Green synthesis, characterization, antibacterial, and antifungal activity of copper oxide nanoparticles derived from *Morinda citrifolia* leaf extract, Scientific Reports, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46002-5>.
- [58] Sozan E. El-Abeid, Mohamed A. Mosa Mohamed A. M. El-Tabakh Sozan (2023) Antifungal activity of copper oxide nanoparticles derived

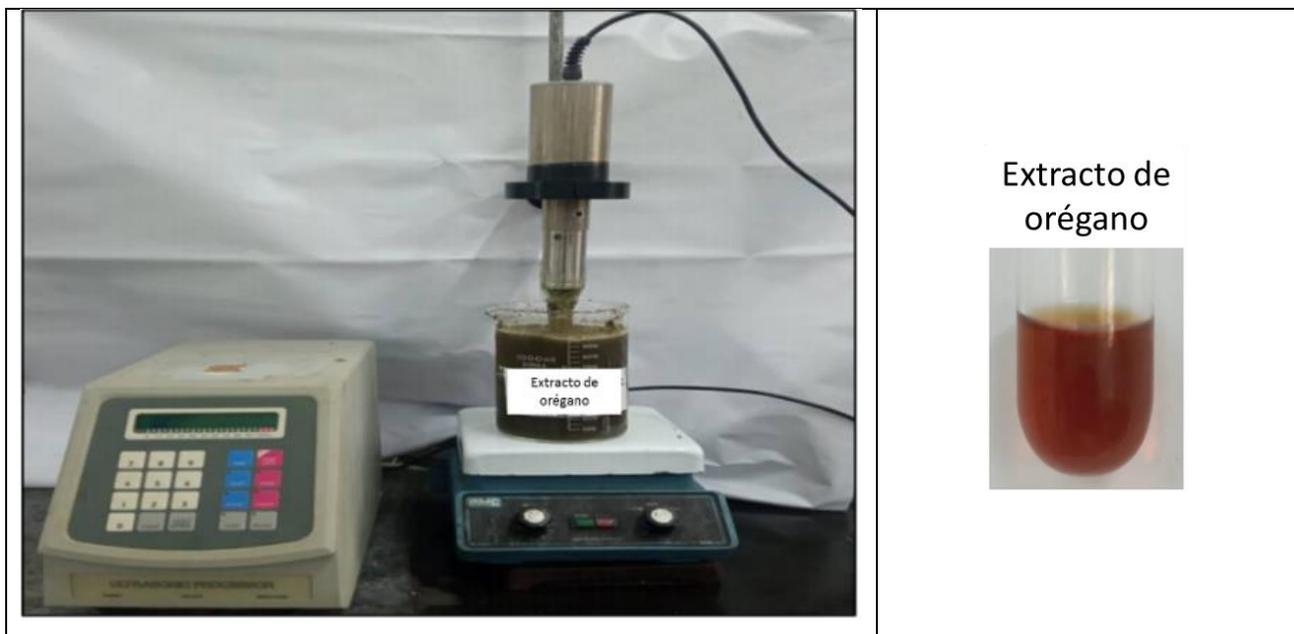
- from Zizyphus spina leaf extract against Fusarium root rot disease in tomato plants, El-Abeid et al. Journal of Nanobiotechnology 22:28 <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02281-8>.
- [59] Moreno-Vargas, J.M.; Echeverry-Cardona, L.M.; Moreno-Montoya, L.E.; Restrepo-Parra, E. Evaluation of Antifungal Activity of Ag Nanoparticles Synthesized by Green Chemistry against *Fusarium solani* and *Rhizopus stolonifera*. Nanomaterials 2023, 13, 548. <https://doi.org/10.3390/nano13030548>.
- [60] Figueroa, m. (2019). “síntesis de nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de hojas de *eucalyptus robusta sm*. Y evaluación de su actividad antimicrobiana”. (tesis especial de grado para optar al título de licenciado en química). Universidad central de venezuela, caracas-venezuela.
- [61] ISO 14502-1:2005 Determination of substances characteristic of green and black tea — Part 1: Content of total polyphenols in tea — Colorimetric method using Folin-Ciocalteu’s reagent.
- [62] Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A. W., Ghannoum, M. A., Pfaller, M. A., Rex, J. H. & Walsh, T. J. (2010). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline; M51-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). ISBN: 1-5623-725-1.
- [63] Kiran, B. L., Nayana, K. N., & Raveesha, K. A. (2023). Evaluation of antifungal effect of medicinal plants against Panama wilt of Banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 11(1), 73-79. DOI: 10.7324/JABB.2023.110110.
- [64] K.M. Rajesha, B. Ajithaa, Y. Ashok Kumar Reddyb, Y. Suneethac, P. Sreedhara Reddya, (2015) Synthesis of copper nanoparticles and role of pH on particle size control, Selection and Peer-review under responsibility of Conference Committee Members of Recent Advances In Nano Science and Technology.
- [65] N. Nagar, V. Devra, Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using *Azadirachta indica* leaves, Mater. Chem. Phys. 213 (2018) 44–51, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.04.007>.
- [66] Shahrzad A, Moghaddam J and Mohammad R. Synthesis, characterization and stability of Cu₂O nanoparticles produced via supersaturation method considering operational parameters effect. Journal of Industrial and Engineering Chemistry [online].2015, 22, 34–40. ISSN 1226086X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiec.2014.06.022
- [67] Letchumanan, D.; Sok, SPM; Ibrahim, S.; Nagoor, Nuevo Hampshire; Arshad, NM A base de plantas Biosíntesis de nanopartículas de cobre/ óxido de

cobre: una actualización sobre sus aplicaciones en biomedicina, mecanismos y toxicidad. *Biomoléculas* 2021,11, 564.

- [68] P. K. Jain, A.Soni, P. Jain and J. Bhawsar,(2016) Phytochemical analysis of *Mentha spicata* plant extract using UV-VIS, FTIR. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(2): 1-6.
- [69] Dang, M, Thi L, Fribourg-Blanc E and Dang M. (2011). Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*2, 015009 (6pp).
- [70] Henglein, A. (2000). Formation and Absorption Spectrum of Copper Nanoparticles from the Radiolytic Reduction of $\text{Cu}(\text{CN})_2^-$. *The Journal of Physical Chemistry B*.104(6),
- [71] Zhang, Z., Hongwei, C., Jiajian, G., Yingli, W., Xilin, S., Jin S., Poernomo G.,ZiyiZ.,Fabin S. (2012). Shape-controlled synthesis of Cu_2O microparticles and their catalytic performances in the Rochow reaction. *Catalysis Science&Technology* [online]. 2012, 2(6), 1207
- [72] Kanika D; Gözde K. A; Parveen Chauhan1 · P. K. Chauhan1 (2021). Biogenic Production and Characterization of CuO Nanoparticles by *Carica papaya* Leaves and Its Biocompatibility Applications. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*31:1846–1857<https://doi.org/10.1007/s10904-020-01837-7>.
- [73] Prakash I. Muralidharan P, Nallamuthu M, M. Venkateswarlu N. (2007). Preparation and characterization of nanocrystallite size cuprous oxide, *Materials Research Bulletin* 42 1619–1624 doi:10.1016/j.materresbull.2006.11.038.
- [74] Attarilar, Shokouh & Yang, Jinfan & Ebrahimi, Mahmoud & Wang, Qingge & Liu, Jia & Tang, Yujin & Yang, Junlin. (2020). The Toxicity Phenomenon and the Related Occurrence in Metal and Metal Oxide Nanoparticles: A Brief Review From the Biomedical Perspective. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8. 10.3389/fbioe.2020.00822.
- [75] Morales L, Fernández E, Moreno R, Elena, (2017). El Efecto Hormético en sustancias biocidas de Interés sanitario. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad De Granada, Facultad De Farmacia, Campus Universitario De Cartuja, 18071 Granada, España. *Higiene y Sanidad Ambiental*.

VII.Anexos

1. Obtención del extracto de orégano por ultrasonido



Figuras 68. Izquierda, obtención de extracto de orégano utilizando ultrasonido. Derecha extracto de orégano obtenido.

Certificado de identificación y registro de la planta de orégano utilizada en este trabajo de investigación.



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
Herbario "Víctor Manuel Ovalles"
MYF 23-14

Certificado de identificación y registro

Mediante la presente se hace constar que se ha recibido una muestra botánica colectada en la Urbanización Club de Campo, Altos Mirandinos, el día 12/10/2023 por Danisbeth Quiñones, para ser identificada y depositada en el Herbario "Víctor Manuel Ovalles" como muestra comprobante de análisis fitoquímico.

Identificación botánica:

Lippia micromera Schauer

Familia Verbenaceae

Nombre común reportado: "Orégano"^{**}

Número de registro:

MYF 29530

Constancia que se emite a los 02 días del mes de noviembre de 2023.

Prof. Giovannina Orsini
Curadora del Herbario
gorsini@gmail.com

^{**}Es conveniente destacar que hay muchas especies diferentes de plantas con ese mismo nombre común y podría haber la inquietud de identificarla como *Lippia origanoides*, la cual tiene claras diferencias en la morfología de la hoja y de la inflorescencia.

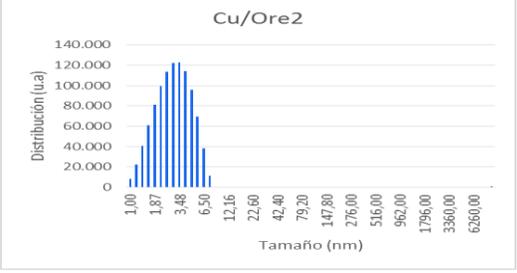
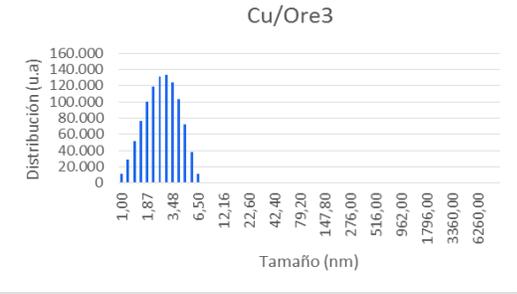
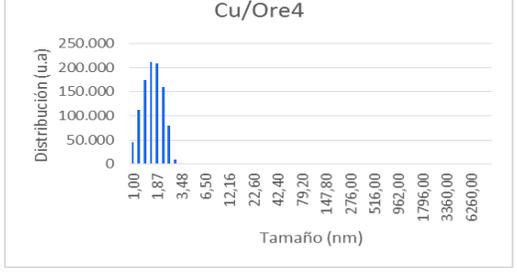
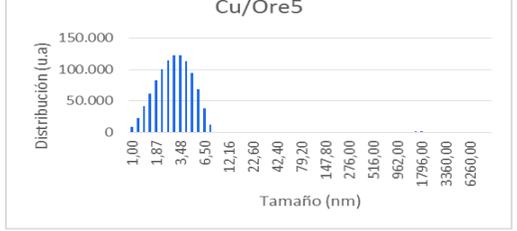
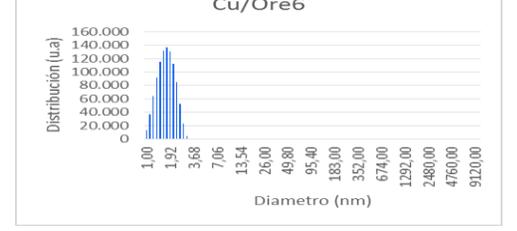
Herbario Ovalles, Apartado 40.109, Caracas 1041-A; Tlf: (58) 0212 605 -2715; FAX: 605 2707; myf@ucv.ve

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA



Tabla 18: Histogramas de los tamaños de las nanopartículas obtenidas por agitación magnética.

Nanopart	Tamaño	Histograma
----------	--------	------------

tícula	promedio (nm)	
Ore2	3,28	
Ore3	2,90	
Ore4	1,72	
Ore5	3,27	
Ore6	1,78	

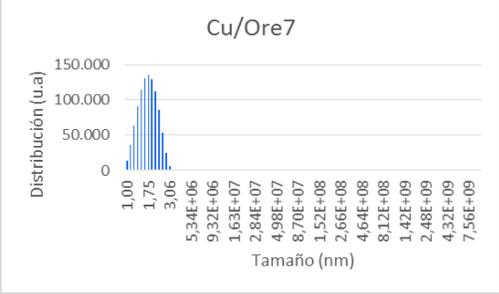
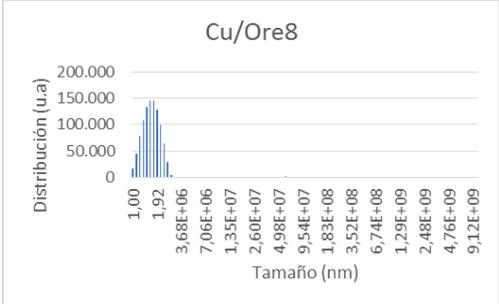
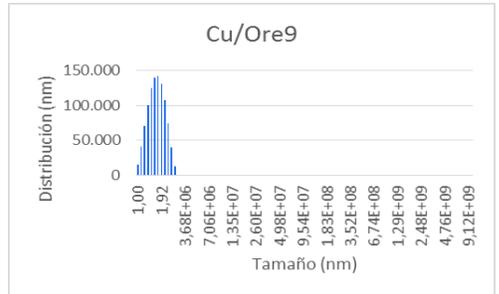
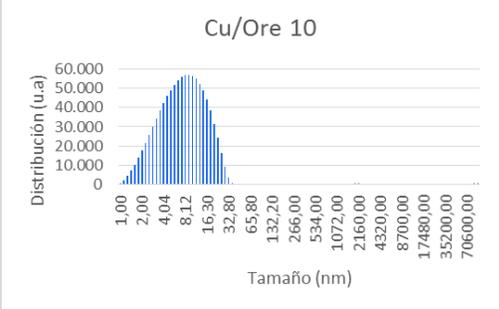
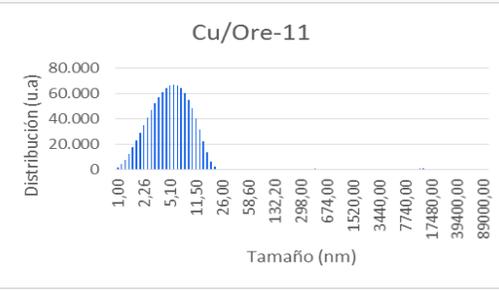
<p>Ore7</p>	<p>1,77</p>	
<p>Ore8</p>	<p>1,67</p>	
<p>Ore9</p>	<p>1,72</p>	
<p>Ore10</p>	<p>9,24</p>	
<p>Ore11</p>	<p>6,08</p>	

Tabla 19. Histogramas de los tamaños de las nanopartículas obtenidas con extracto (In Situ).

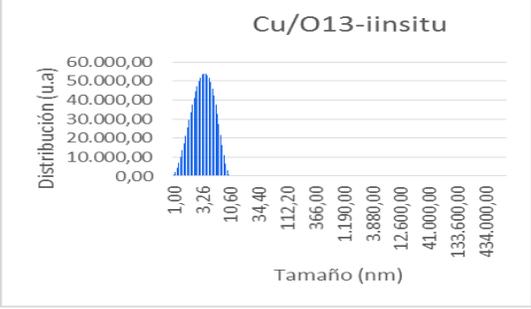
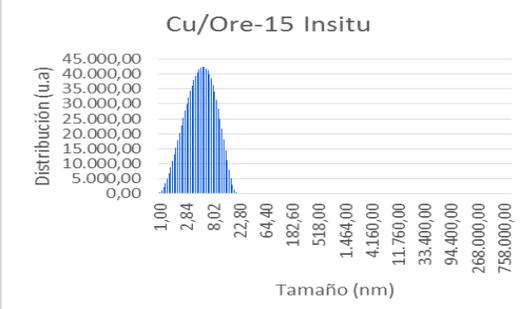
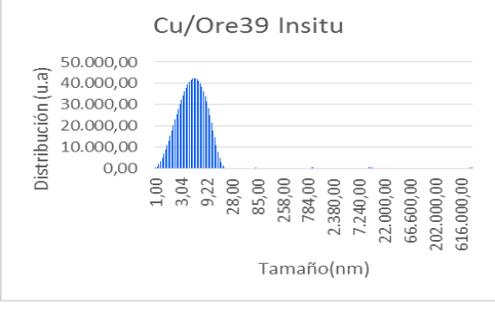
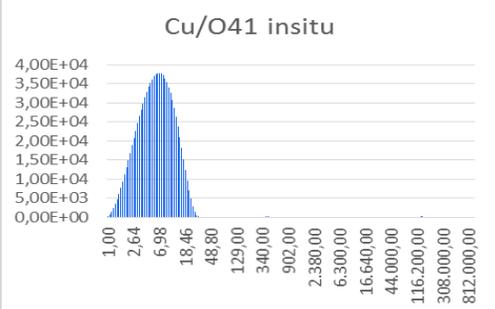
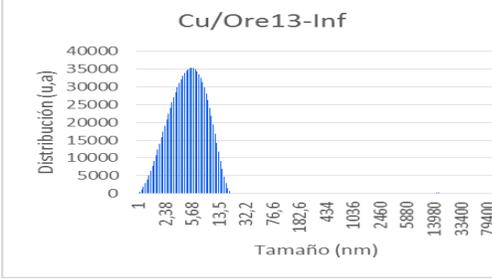
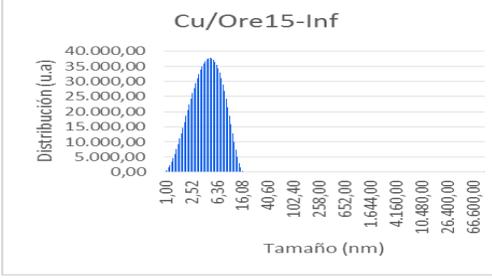
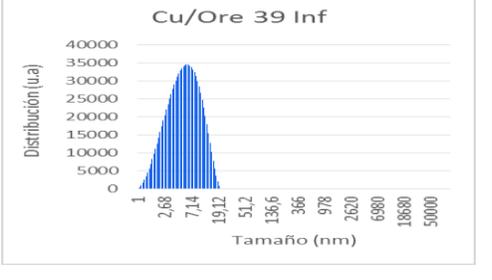
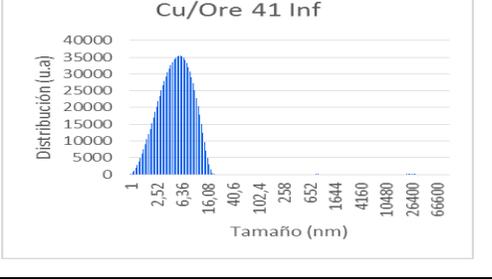
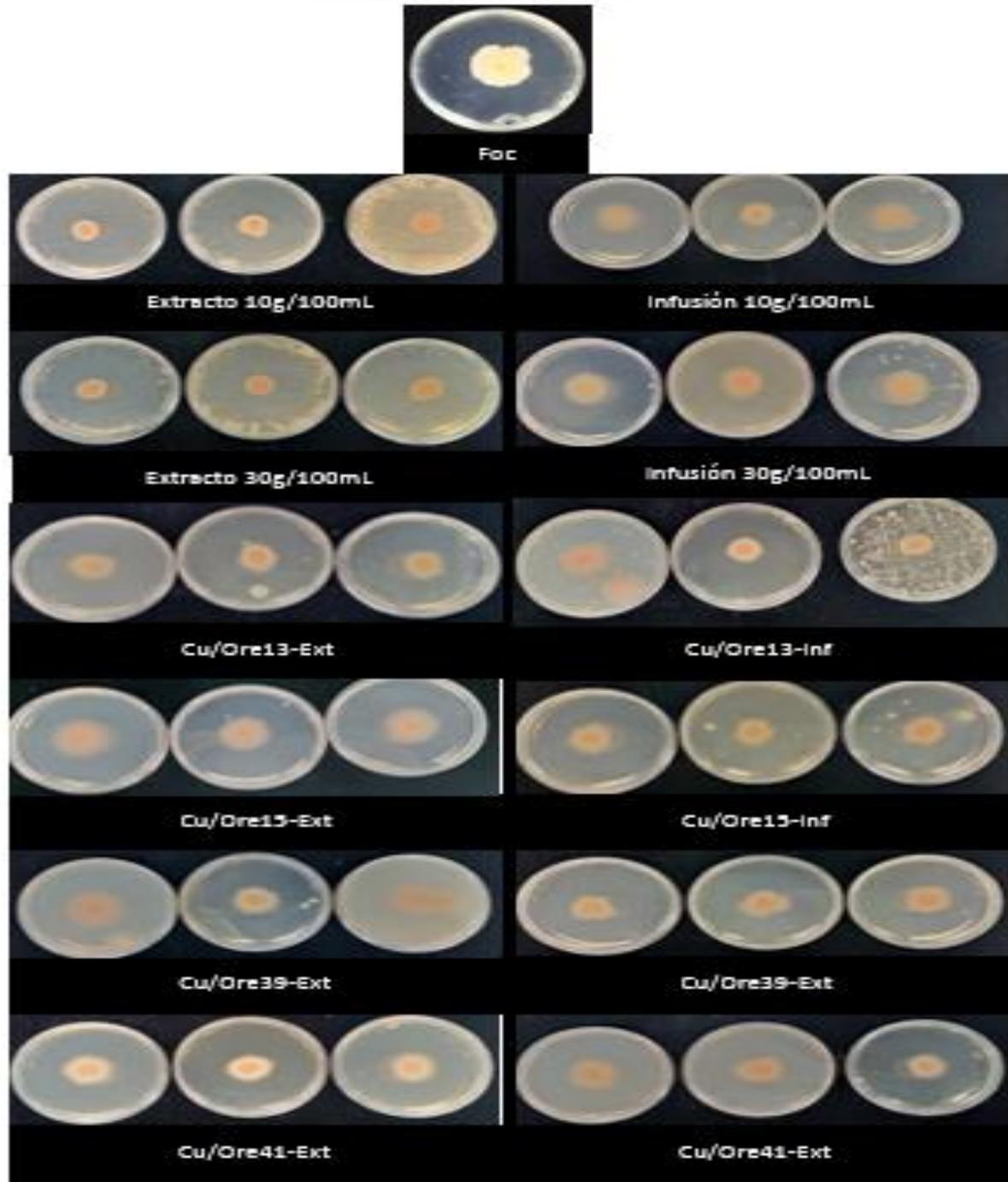
Nanopartículas	Tamaño promedio (nm)	Histograma
Ore13	3,72	
Ore15	5,74	
Ore39	5,73	
Ore41	7,40	

Tabla 20. Histogramas de los tamaños de las nanopartículas obtenidas con infusión (In Situ).

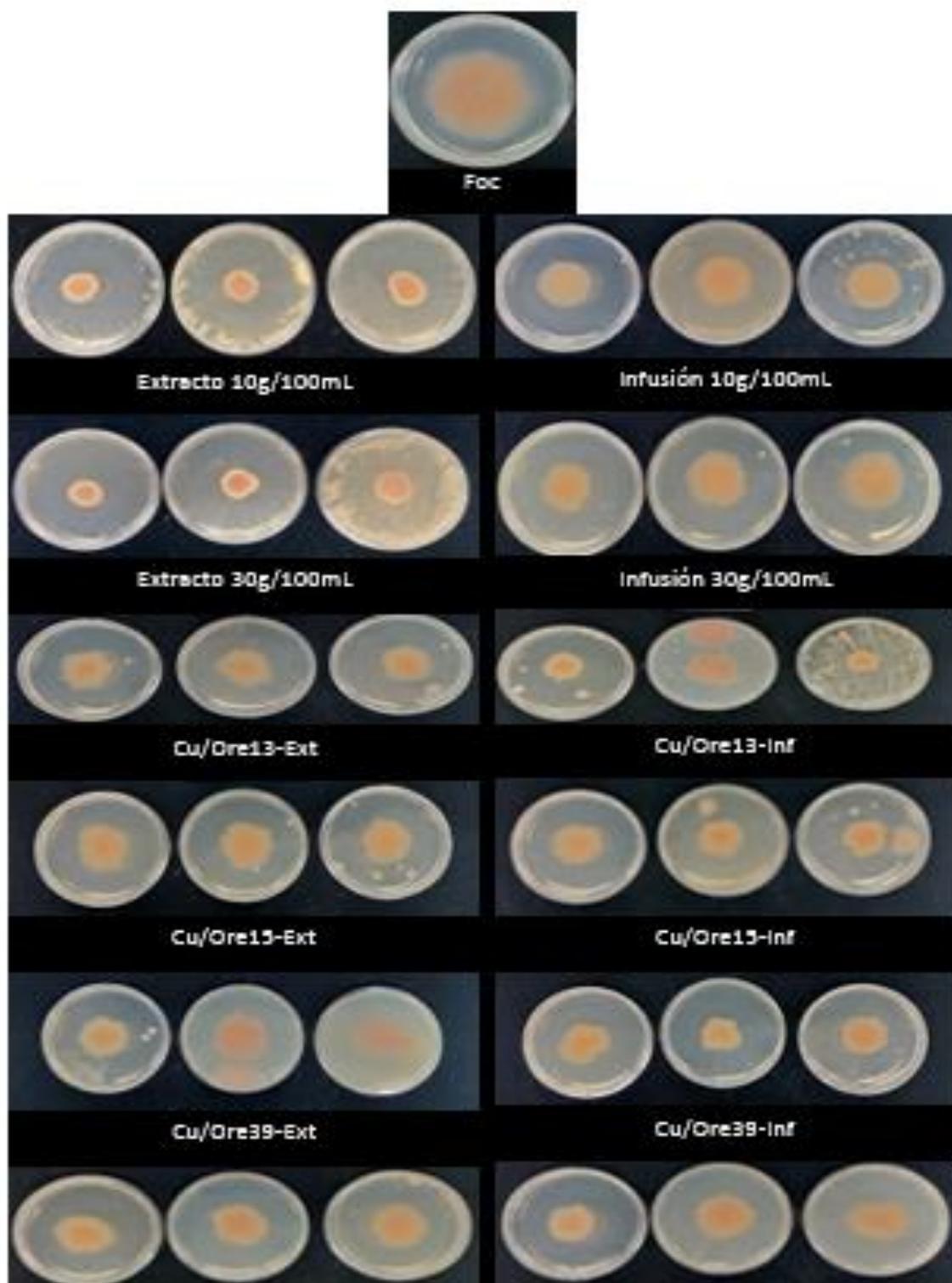
Nanopartículas	Tamaño promedio (nm)	Histograma
Ore13	5,89	
Ore15	5,20	
Ore39	6,31	
Ore41	5,96	

Registro fotográfico de los ensayos in vitro del método de envenenamiento del medio del día 3 al día 5.

Orégano (3 días)



Orégano (4 días)



Orégano (5 días)

