

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología celular y molecular**

**Biosíntesis de nanopartículas de cobre: caracterización,
evaluación de biocompatibilidad y propiedades
antimicrobianas**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Karla Maritza Flores Rábago

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Karla Maritza Flores Rábago

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria

Directora de tesis

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno

Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo

Dra. Mónica Hernández Rodríguez



Dra. Ana Denise Re Araujo

Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon

Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Karla Maritza Flores Rábago** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología celular y molecular.

Biosíntesis de nanopartículas de cobre: caracterización, evaluación de biocompatibilidad y propiedades antimicrobianas.

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Directora de tesis

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud pública global que continúa en aumento. En las últimas décadas la nanotecnología ha contribuido de manera importante en alternativas que pueden mejorar, suplir o potenciar el tratamiento antibiótico convencional. Las nanopartículas (NPs) metálicas, han demostrado inhibir el crecimiento de las bacterias, y en muchos casos ocasionan la muerte bacteriana. El objetivo del presente estudio fue sintetizar NPs de óxido de cobre (CuONPs) mediante un método eco-amigable y determinar sus propiedades antimicrobianas, utilizando el extracto acuoso y el sobrenadante del cultivo líquido del hongo *Ganoderma sessile* como agentes reductores. Mediante espectrometría Ultravioleta visible (UV-vis) se identificó una onda de absorbancia a λ de 300 nm. Se evaluó la estabilidad, carga y el radio hidrodinámico de las CuONPs obtenidas y mostraron heterogeneidad y estabilidad moderada. La morfología y tamaño de las NPs se determinaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se obtuvieron NPs de forma cuasi esférica, y con tamaño promedio de $4.5 \text{ nm} \pm 1.9$ utilizando el sobrenadante y $5.2 \text{ nm} \pm 2.1$ con el extracto acuoso. Las CuONPs mostraron actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. La concentración mínima inhibitoria (CMI) para *E. coli*, fue de 192.5 $\mu\text{g/mL}$ para las CuONPs-EA y 186 $\mu\text{g/mL}$ para las CuONPs-SN. Para *P. aeruginosa* y *S. aureus* se obtuvo una CMI de 165 $\mu\text{g/mL}$ con las CuONPs-EA, y 159.5 $\mu\text{g/mL}$ con las CuONPs-SN. Se demostró que concentraciones bajas ($< 15 \mu\text{g/mL}$) de CuONPs-EA no son tóxicas para células de riñón y ni para macrófagos. Mientras que las CuONPs-SN, mostraron citotoxicidad en concentraciones igual o mayor de 0.91 $\mu\text{g/mL}$ en líneas celulares de hígado y macrófagos. Sin embargo, los cultivos celulares de riñón toleraron una concentración de CuONPs-SN de 0.91 hasta 7.37 $\mu\text{g/mL}$ sin disminuir el porcentaje de viabilidad celular. Los resultados obtenidos sugieren que las CuONPs sintetizadas utilizando el extracto del hongo *G. sessile*, pudieran ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades infecciosas superficiales. Se requieren más evaluaciones de bioseguridad, para demostrar que éstas posean una baja absorción a la circulación sistémica, y una baja concentración durante la excreción renal.

Palabras clave: Nanopartículas cobre, síntesis verde, micosíntesis, antibiótico.

Abstract of the thesis presented by **Karla Maritza Flores Rábago** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in cellular and molecular microbiology.

Biosynthesis of copper nanoparticles: characterization, evaluation of biocompatibility and antimicrobial properties

Abstract approved by:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Thesis Director

Bacterial resistance and multi-resistance to antibiotics is a global public health problem that is continually growing. For decades, there has been a strenuous and extensive search for alternatives that improve, replace or enhance conventional antibiotic treatment. Some metallic nanoparticles (NPs), can inhibit the growth of bacteria, and in many cases can cause bacterial death. The objective of the present study was to synthesize copper oxide NPs (CuONPs) using an eco-friendly method and to determine its antimicrobial properties, by using the aqueous extract and the culture supernatant of *Ganoderma sessile* fungus. An absorbance peak of 300 nm was obtained using ultraviolet visible spectrometry (UV-vis). The CuONPs obtained showed heterogeneity and moderate stability. The morphology and size of the NPs were determined by transmission electron microscopy (TEM). NPs were obtained in a quasi-spherical shape, and with an average size of $4.5 \text{ nm} \pm 1.9$ and $5.2 \text{ nm} \pm 2.1$ for the supernatant and the aqueous extract, respectively. The CuONPs showed antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The minimum inhibitory concentration (MIC) for *E. coli* was 192.5 $\mu\text{g/mL}$ for the CuONPs-EA and 186 $\mu\text{g/mL}$ for the CuONPs-SN. For *P. aeruginosa* and *S. aureus*, a MIC of 165 $\mu\text{g/mL}$ was obtained with the CuONPs-EA and 159.5 $\mu\text{g/mL}$ with the CuONPs-SN. Finally, the compatibility of both CuONPs was determined in kidney, liver and macrophage cell lines. Low concentrations ($<15 \text{ } \mu\text{g/mL}$) of CuONPs-EA were shown to be non-toxic to kidney cells and macrophages. While the CuONPs-SN, showed cytotoxicity in concentrations equal to or greater than 0.91 $\mu\text{g/mL}$ in liver and macrophage cell lines, observing a decrease in cell viability dependent on the concentration of CuONPs-SN. However, kidney cell cultures tolerated a CuONPs-SN concentration of 0.91 to 7.37 $\mu\text{g/mL}$ without decreasing the percentage of cell viability. The results obtained suggest that the CuONPs synthesized using the extract of the *G. sessile* fungus could be used for the treatment of superficial infectious diseases. For further biosafety evaluations, it should be demonstrated that they have a low absorption into the systemic circulation, and consequently a low concentration during renal excretion.

Keywords: Copper nanoparticles, green synthesis, mycosynthesis, antibiotic.

Dedicatoria

Para todos lo que perdieron un ser querido durante la pandemia por SARS-CoV2. Que la esperanza de un mejor mañana se mantenga presente.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por facilitarme acceso a las instalaciones, y proporcionarme los medios para desarrollar el proyecto de investigación. Al personal docente y administrativo de CICESE, por haber aportado en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo mediante el programa de becas.

A la Dra. Ernestina Castro por la oportunidad que me dio para emprender, empaparme y desenvolverme en el área de investigación. Por la tolerancia y la paciencia que me tuvo, durante mis entregas y revisiones. Por toda la enseñanza, los consejos y la asesoría que me brindo durante el posgrado.

A mis asesores que admiro; al Dr. Edgardo Sepúlveda por la accesibilidad, los consejos, por la disposición de su equipo de trabajo y la excelente asesoría. A la Dra. Mónica Hernández por su tiempo, comentarios y observaciones.

Un agradecimiento especial, a la Dra. Karla Oyuky Juárez por siempre estar disponible para apoyar mi proyecto. Gracias por apoyar con los experimentos y los reactivos en tiempo de pandemia, en el cual no nos permitían acceder a su área de trabajo. Por tomarse el tiempo de explicarme a detalle el paso a paso de los experimentos y su análisis.

A mi hermana Ivonne, por guiarme desde lo más remoto del cómo utilizar cada herramienta, hasta procesos y cálculos experimentales. Por sus consejos y disposición para contar con ella en cualquier momento. Gracias a ella me enteré del posgrado y de la oportunidad de aplicar mis dudas de investigación en CICESE.

A mis compañeras de Microbiología; Ana, Mariana y Alejandra. Por el apoyo en clases, por los consejos y, por el hacer más amenos los momentos difíciles de estudio y de pandemia. A mis compañeros de laboratorio de microbiología por los consejos y las observaciones. En especial agradezco al Dr. Yael González por el tiempo, la dedicación y, por enseñarme técnicas y cálculos en el laboratorio.

A mi Mamá por aceptarme, por siempre brindarme su apoyo, consejo y seguridad en todo. Por permitirme desenvolverme en lo que me gusta y apasiona, a pesar de que mis decisiones me puedan llevar a crisis financieras.

Un enorme agradecimiento a mi esposa por acompañarme y apoyarme, en esta etapa difícil de transición, muchos cambios y crecimiento profesional.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Nanopartículas metálicas.....	3
1.1.1.1 Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas metálicas.....	5
1.1.1.2 Micosíntesis de nanopartículas metálicas.....	6
1.1.2 Nanopartículas de cobre	7
1.1.2.1 Biosíntesis de nanopartículas de cobre.....	8
1.1.2.2 Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de cobre	9
1.1.2.2.1 Aplicaciones de las nanopartículas de cobre como antibiótico	10
1.1.2.2.2 Aplicaciones de las nanopartículas de cobre en la terapia oncológica.....	12
1.1.2.2.3 Aplicaciones de las nanopartículas de cobre en la ingeniería de tejidos....	13
1.2 Justificación	14
1.3 Hipótesis	14
1.4 Objetivos	15
1.4.1 Objetivo general	15
1.4.2 Objetivos específicos.....	15
Capítulo 2. Metodología.....	16
2.1 Síntesis de nanopartículas de cobre	16
2.1.1 Cultivos fúngicos y obtención de biomasa	16
2.1.2 Obtención de extracto acuoso y sobrenadante	16
2.1.3 Síntesis de nanopartículas	17
2.2 Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de cobre.....	18
2.2.1 Espectrofotometría de UV-visible	18
2.2.2 Dispersión de luz dinámica (DLS)	18

2.2.3	Análisis de potencial zeta (PZ)	18
2.2.4	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	18
2.3	Ensayos <i>in vitro</i>	19
2.3.1	Ensayo de inhibición	19
2.3.2	Concentración mínima inhibitoria	20
2.3.3	Cultivos celulares y ensayo de viabilidad celular	21
2.3.3.1	Cultivos celulares	21
2.3.3.1.1	Subcultivos celulares y tratamiento con tripsina	22
2.3.3.2	Ensayo de viabilidad celular	22
2.3.3.2.1	Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT	23
2.4	Análisis estadístico	23
Capítulo 3.	Resultados	24
3.1	Síntesis de nanopartículas de cobre	24
3.1.1	Obtención de biomasa, extracto acuoso y sobrenadante	24
3.1.2	Síntesis de nanopartículas de cobre	25
3.2	Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de cobre	27
3.2.1	Espectrofotometría de UV-vis	27
3.2.2	Dispersión de luz dinámica (DLS)	30
3.2.3	Análisis del potencial zeta (ZP)	31
3.2.4	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	31
3.3	Ensayos <i>in vitro</i>	33
3.3.1	Ensayo de inhibición y concentración mínima inhibitoria (CMI)	33
3.3.2	Ensayo de viabilidad celular	36
Capítulo 4.	Discusión	43
Capítulo 5.	Conclusión	46
	Literatura citada	47

Lista de figuras

Figura	Página
1. Esquema general de la síntesis de nanopartículas metálicas por métodos verdes.....	4
2. Biodistribución conceptual de nanopartículas en diferentes tejidos dependiente de tamaño, la forma y la carga superficial	5
3. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas metálicas.....	5
4. Aplicaciones de las nanopartículas de cobre	8
5. Línea de tiempo de desarrollo de antibióticos y aparición de resistencia bacteriana.....	10
6. Número de antibióticos aprobados por la FDA.....	11
7. Andamio con nanopartículas de cobre con aplicaciones en ingeniería de tejidos	12
8. Cultivos fúngicos, obtención de extracto acuoso y sobrenadante	17
9. Características de la biomasa y extracto de <i>G. sessile</i>	24
10. Características del sobrenadante y extracto acuoso	25
11. Viraje de color de las nanopartículas de cobre sintetizadas con sobrenadante a diferentes relaciones de síntesis	26
12. Viraje de color dependiente de temperatura	27
13. Espectro de absorción por UV-vis de las CuONPs sintetizadas con extracto acuoso (EA).....	28
14. Espectro de absorción por UV-vis de las CuONPs-EA, incubadas a 60°C a las 0 y 48 h	28
15. Análisis de espectro de absorción por espectroscopia UV-vis de las CuONPs-EA 30 días después de su síntesis	29
16. Espectro de absorción por UV-vis de las CuONPs pH10 EA y SN incubadas a 60°C 30 días después de síntesis	29
17. Análisis del espectro de absorción por UV-vis CuONPs-EA y CuONPs-SN	29
18. Distribución del radio hidrodinámico calculado mediante dispersión de luz dinámica de las CuONPs sintetizadas.....	30
19. Distribución del potencial zeta de las CuONPs	31
20. Caracterización por microscopia electrónica de transmisión de la morfología y tamaño de las CuONPs sintetizadas con extracto acuoso	32

21. Caracterización por microscopia electrónica de transmisión de la morfología y tamaño de las CuONPs sintetizadas con sobrenadante	32
22. Crecimiento de cepas bacterianas para ensayos de inhibición	34
23. Ensayo de método de difusión en pozo y difusión en disco con <i>S. epidermidis</i>	35
24. Crecimiento de <i>S. epidermidis</i> expuesta a CuONPs	36
25. Porcentaje de crecimiento bacteriano en cepas bacterianas expuestas a CuONPs	36
26. Viabilidad de células tratadas con CuONPs-EA	37
27. Viabilidad de células tratadas con CuONPs-SN	38
28. Viabilidad de células hepáticas tratadas con CuONPs	39
29. Viabilidad celular de macrófagos tratados con CuONPs.....	39
30. Viabilidad de células MDCK tratadas con CuONPs.....	40
31. Viabilidad celular de hepatocitos tratados con CuONPs, EA y SN	40
32. Viabilidad celular de macrófagos tratados con CuONPs, SN y EA.....	41
33. Viabilidad de células de riñón tratadas con CuONPs, SN y EA	41

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Morfología y tamaño de nanopartículas de plata sintetizadas por el método verde utilizando hongos	7
2 Hongos reportados para síntesis de nanopartículas de cobre.....	9
3 Bacterias Gram negativas resistentes a antibióticos prevalentes en México.....	11
4 Tamaño de distintos tipos de nanopartículas de cobre multifuncionales, investigadas en terapias guiadas por imagen	13
5 Factores de muestras evaluadas para la síntesis de CuONPs	26
6 Resultados de análisis DLS y Potencial Zeta	31
7 Concentración de cobre de las CuONPs sintetizadas.....	33
8 Concentración mínima inhibitoria de CuONPs.....	36
9 Resultados de viabilidad en cultivos celulares tratados con CuONPs, EA y SN.....	37
10 Características fisicoquímicas, toxicidad y efecto antimicrobiano de CuONPs sintetizadas con <i>G. sessile</i>	42

Capítulo 1. Introducción

En las últimas décadas, las aportaciones científicas de la nanotecnología han contribuido con posibles soluciones a problemas globales en el ámbito de la salud. Todo esto en búsqueda de alternativas para el manejo de la resistencia bacteriana a antibióticos, y nuevos métodos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades crónicas-degenerativas con alta prevalencia y mortalidad, como la diabetes y el cáncer (Blecher et al., 2011; Farokhzad y Langer, 2009; Kaweeteerawat et al., 2017; Pelgrift y Friedman, 2013; Zhang et al., 2007).

El interés en la investigación de nanopartículas metálicas en biomedicina nace al identificar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes que poseen, las cuales son prometedoras para múltiples aplicaciones en las diferentes áreas de la medicina (Alizadeh et al., 2014; Elgorban et al., 2016; Escárcega-González et al., 2018; Lu et al., 2018; Norambuena et al., 2017; Pelgrift y Friedman, 2013; Ren et al., 2019). Se sabe que las nanopartículas metálicas pueden poseer efectos antifúngicos (Elgorban et al., 2016), antivirales (Haggag et al., 2019; Morris et al., 2019), antiparasitarios (Nafari et al., 2020) y antibacterianos (Noor et al., 2020; Rajeshkumar et al., 2019). El efecto antibacteriano, demostrado en múltiples ensayos *in vitro*, ha sido prometedor para combatir la resistencia bacteriana a antibióticos. Sin embargo, las aplicaciones para combatir bacterias resistentes se han visto limitadas por el efecto citotóxico a células animales (Henson et al., 2019; Midander et al., 2009; Tang et al., 2018). Debido a este efecto citotóxico, es necesario realizar más ensayos e investigaciones donde se determinen las concentraciones seguras para las células del huésped, manteniendo el efecto antibacteriano, pero sin que de paso a la resistencia (Ning et al., 2015).

Las propiedades de las nanopartículas metálicas dependerán del metal precursor, el proceso de síntesis, el tamaño, la forma y su carga superficial (Azizi et al., 2014; Blanco et al., 2015; Fröhlich, 2012; Honary et al., 2012; Liang et al., 2019; Mohanta et al., 2016; Sharma et al., 2009). Durante muchos años los principales metales estudiados en aplicaciones biomédicas fueron el oro y la plata. Sin embargo, en la última década se ha ampliado la búsqueda a otros metales como el cobre, el zinc y el hierro (Ashraf et al., 2019; Dadfar et al., 2019; Jamdagni et al., 2018; Varghese et al., 2020). Esto con el fin de buscar alternativas de nanocompuestos con mayor biocompatibilidad, menor citotoxicidad e inmunogenicidad (Ramesh et al., 2015; Vijayakumar et al., 2019). Debido al constante uso y aplicación en el área de investigación biomédica, es importante implementar protocolos para la síntesis que sean amigables con el ambiente, como los métodos biológicos, también llamados métodos verdes (Dhillon et al., 2012;

Gurunathan et al., 2013; Honary et al., 2012; Kharissova et al., 2013; Parthiban et al., 2019; Patil y Kim, 2017).

Los métodos verdes utilizan fuentes biológicas para la obtención de nanopartículas metálicas, como plantas, bacterias, hongos y levaduras. Uno de los desafíos de los métodos de síntesis verde es el control del tamaño, la forma y el grado de agregación de las nanopartículas metálicas (Abdel-Wareth, 2017), lo que puede ser ajustado por modificación de las condiciones del proceso de bio-reducción (Castro-Longoria et al., 2011), o en el caso del método de síntesis que utiliza hongos (también llamado micosíntesis); modificando la especie de hongo y/o el tipo de extracto utilizado (Vetchinkina et al., 2018).

El uso del cobre para la producción de nanopartículas ha cobrado interés, ya que en estudios recientes se ha demostrado ser útil para aplicaciones biomédicas, debido a sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas, antidiabéticas (Erci et al., 2020; Noor et al., 2020; Rajeshkumar et al., 2019). Además, la utilización de nanopartículas de cobre en andamios de alginato con quitosano ha demostrado favorecer la formación de hueso en estudios in vivo (Lu et al., 2018). Es por esto que es importante establecer protocolos amigables con el ambiente, que aseguren la síntesis de nanopartículas de cobre homogéneas con respecto a su tamaño, estables y de bajo grado de agregación, que sean biocompatibles para aplicaciones en humanos, y mantengan sus propiedades biomédicas. Por lo tanto, en este trabajo se utilizará como fuente biológica para el proceso de biosíntesis de nanopartículas al hongo *Ganoderma sessile*, el cual es no patógeno para el humano, fácil de manipular y de bajo costo de producción. Este hongo basidiomiceto es comestible y considerado medicinal con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales (Purva Sharma y Tulsawani, 2020; Vetchinkina et al., 2016) y se espera que las nanopartículas metálicas sintetizadas utilizando el extracto de *G. sessile* como agente reductor posean propiedades antimicrobianas y bajo grado de citotoxicidad para líneas celulares de mamíferos.

1.1 Antecedentes

La nanotecnología se encarga de la investigación de partículas y materiales a escala nanométrica, y según la guía estándar para investigación, estudio y ensayos para nanotecnología (ISA-TAB-Nano), la nanopartícula es aquella partícula cuyo tamaño se encuentre en el rango de 1 a 100 nm. La nanotecnología actualmente es empleada en diferentes áreas desde la industria textil, agroalimentaria, hasta en el campo de la medicina (deMello y Woolley, 2010). En las últimas décadas, la nanotecnología se ha convertido en una de las piezas importantes de los avances científicos en medicina, debido a esto ha emergido la

nanomedicina (Farokhzad y Langer, 2009; Zhang et al., 2007). Wagner y colaboradores (2006), definen la nanomedicina como el uso de materiales a nanoescala en las diferentes áreas de la medicina, que conforme su estructura posee un efecto médico único. Las líneas de investigación generadas en nanomedicina han aportado una gama de nuevos prospectos diagnósticos y terapéuticos a muchas enfermedades.

1.1.1 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas de metales, son nanoestructuras obtenidas a partir de la interacción de un compuesto, orgánico o inorgánico, con un agente metálico como el oro, plata, cobre, hierro, zinc, titanio entre otros metales. La síntesis de las nanopartículas metálicas puede ser a partir de moléculas muy pequeñas a moléculas de mayor tamaño, denominada síntesis bottom-up o de abajo hacia arriba. Otro tipo de síntesis es a partir de compuestos de mayor tamaño a compuestos nanométricos, llamada top-down o de arriba hacia abajo. Para la producción de nanopartículas metálicas se pueden utilizar métodos físicos, químicos y biológicos. Los primeros dos métodos requieren de la utilización de múltiples químicos tóxicos para la reducción y estabilización de las nanopartículas. Además, requieren de la utilización de altas temperaturas y procesos de alta energía que pueden producir un daño mayor al ambiente, si lo comparamos con el método biológico (Abdel-Wareth, 2017). La síntesis de nanopartículas metálicas por métodos verdes utiliza plantas y sus productos, bacterias, algas, hongos y levaduras para reducir una sal metálica como se muestra en la Figura 1, a este proceso también se le conoce como bio-reducción (Castro-Longoria et al., 2011; Honary et al., 2012; Noor et al., 2020; Patil y Kim, 2017; Rafique et al., 2017; Ramesh et al., 2015; Shende et al., 2015; Siddiqi y Husen, 2020; Zangeneh et al., 2019).

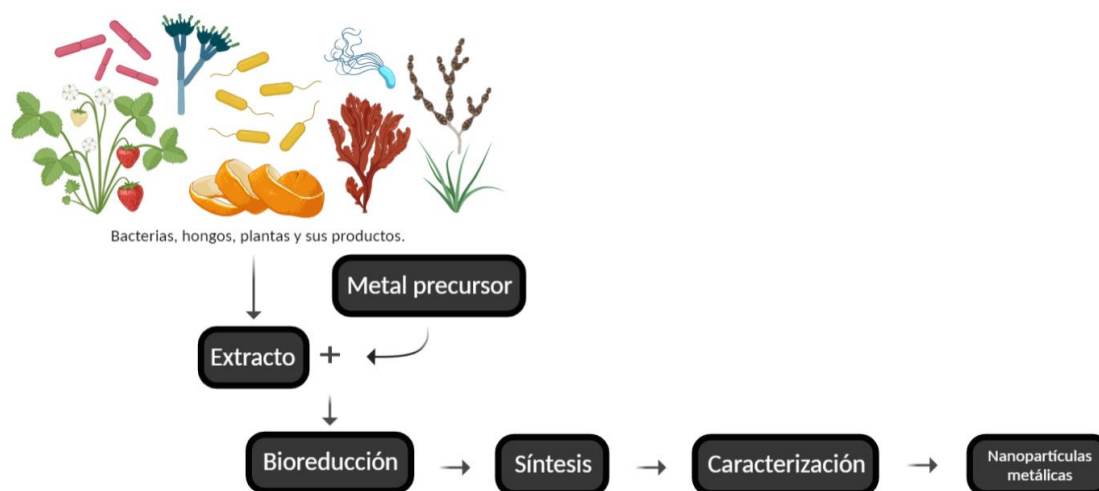


Figura 1. Esquema general de la síntesis de nanopartículas metálicas por métodos verdes (Modificado de Siddiqi y Husen, 2020).

El método biológico, también es denominado método verde debido a que utiliza compuestos biológicos, pero también, porque su uso puede generar menor daño al ambiente, en comparación con los métodos químicos y físicos (Gour y Jain, 2019; Hussain et al., 2016).

Las nanopartículas metálicas poseen propiedades catalíticas, antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, garrapaticidas y, antidiabéticas (Benelli et al., 2017; Burlacu et al., 2019; Chinnasamy et al., 2019; Durán et al., 2017; Escárcega-González et al., 2018; Patra et al., 2019; Rajeshkumar et al., 2019; Sharma et al., 2009). Las propiedades fisicoquímicas y la distribución de las nanopartículas metálicas dependerán del metal, el tamaño y la carga superficial (Blanco et al., 2015; Fröhlich, 2012). Como se muestra en la Figura 2, Blanco y colaboradores (2015) describen de manera conceptual los cambios en la distribución de nanopartículas en pulmones, hígado, bazo y riñones de ratón, dependientes de tamaño, forma y carga superficial (Black et al., 2014; Longmire et al., 2008; Xiao et al., 2011).

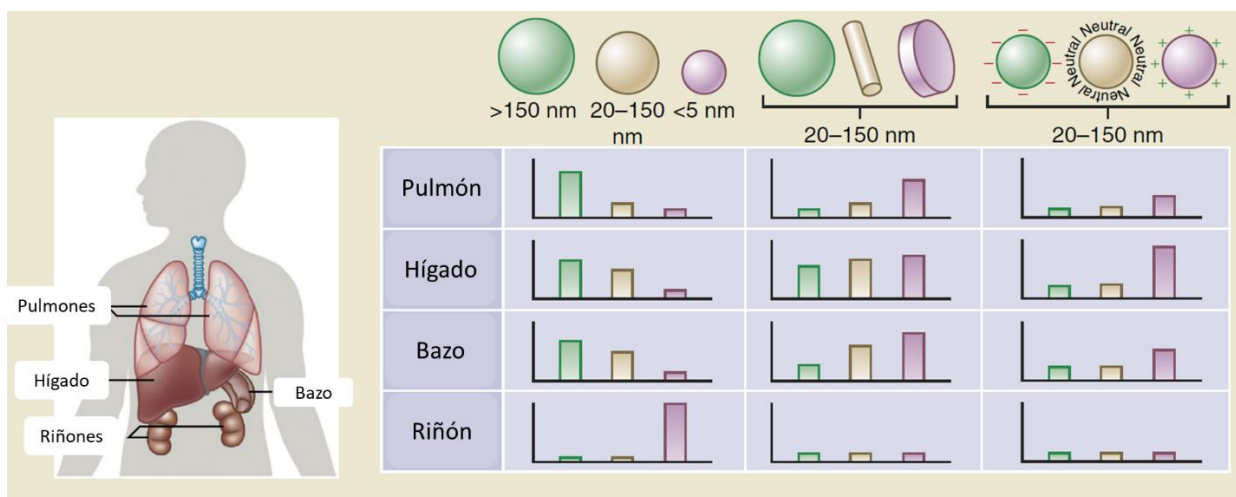


Figura 2. Biodistribución conceptual de nanopartículas en diferentes tejidos dependiente de tamaño, la forma y la carga superficial (Modificado de Blanco *et al.*, 2015).

Gracias al descubrimiento de las múltiples actividades biológicas de las nanopartículas metálicas, se ha realizado investigación sobre aplicaciones en el tratamiento de enfermedades de difícil erradicación y control (Hu et al., 2018; Malzahn et al., 2014; Vazquez-Muñoz et al., 2019; Zhang et al., 2007), métodos diagnósticos (Liu et al., 2019), y apósitos para cicatrización de heridas (Alizadeh et al., 2019; Qian et al., 2019; Vijayakumar et al., 2019; Yusof et al., 2019), entre otros (Figura 3). Todo esto con el objetivo de mejorar la calidad de vida de pacientes con enfermedades crónico degenerativas, y ofrecer nuevas

opciones terapéuticas en enfermedades infecciosas y no infecciosas de difícil control (Alizadeh et al., 2014; Benelli et al., 2017; Palanisamy et al., 2014; Vazquez-Muñoz et al., 2019).

1.1.1.1 Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas metálicas

La aplicación de las nanopartículas metálicas para la cicatrización de heridas en el área de la dermatología se debe a las propiedades antibacterianas y antioxidantes que poseen, y que se han demostrado en múltiples estudios (Alizadeh et al., 2014; Chabala et al., 2017; Hernández-Rangel et al., 2019; Vijayakumar et al., 2019; Yusof et al., 2019). Esto no solo es aplicable en la dermatología, ya que algunas investigaciones han dirigido este efecto de pro-cicatrización en enfermedades con problemas en la cicatrización de heridas como la diabetes (Vijayakumar et al., 2019).

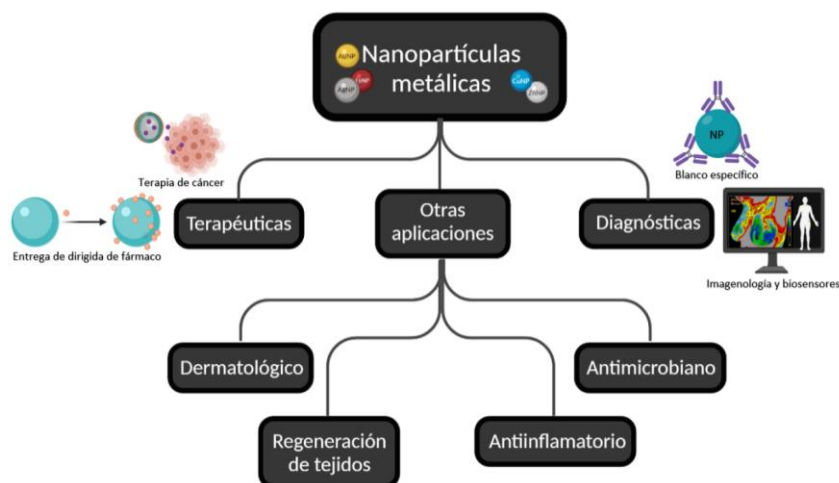


Figura 3. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas metálicas (Modificado de Dayem *et al.*, 2017 y Lahiri *et al.*, 2012).

En otros estudios se ha investigado la aplicación de las nanopartículas metálicas en materiales poliméricos, como los andamios, para la ingeniería de tejidos (Lu et al., 2018; Toledano et al., 2020).

Las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas metálicas son extensas, ya que son aplicables en la agricultura, la industria alimentaria, en la industria textil, así como en el área médica (Hans et al., 2016; Humphreys, 2014; Li et al., 2020; Mohanta et al., 2018; Narayan et al., 2018; Norambuena et al., 2017; Pelaz et al., 2017). Un ejemplo es el trabajo de Usha y colaboradores (2010) quienes, mediante síntesis

verde, sintetizaron nanopartículas de óxido de cobre para el desarrollo de textiles antimicrobianos, que pueden ser útiles en hospitales para prevenir o minimizar infecciones.

La producción de especies reactivas de oxígeno, (ROS, por sus siglas en inglés) es uno de los mecanismos reportados de las nanopartículas metálicas, el cual es vinculado al efecto citotóxico que estas poseen. Esta propiedad de toxicidad celular de las nanopartículas metálicas ha sido empleada para la investigación de nuevas terapias contra el cáncer. Además la citotoxicidad, es dependiente del tipo de metal, el método de síntesis, el tamaño; y la forma de las nanopartículas (Yu et al., 2020).

La síntesis y uso de nanopartículas metálicas continúa en investigación y desarrollo (Nath et al., 2018), siendo la plata y el oro los más investigados. Debido a reportes de bacterias resistentes a nanopartículas metálicas, como *Escherichia coli* resistente a nanopartículas de plata (Panáček et al., 2018), se ha dirigido la búsqueda a otras alternativas de nanopartículas metálicas como las de cobre para aplicaciones contra bacterias multirresistentes.

1.1.1.2 Micosíntesis de nanopartículas metálicas

La síntesis de nanopartículas metálicas a partir de hongos o micosíntesis, ha sido estudiada y reportada por más de dos décadas (Abdel-Wareth, 2017; Dhillon et al., 2012). El uso de hongos para sintetizar nanopartículas metálicas mantiene interés particular, debido a que los hongos secretan grandes cantidades de enzimas y son más fáciles de manipular en el laboratorio (Honary et al., 2012). Se pueden utilizar los compuestos intracelulares del hongo, así como los compuestos excretados al medio por el hongo (compuestos extracelulares). Uno de los beneficios de la utilización de hongos para la síntesis de nanopartículas metálicas es que no requieren de agentes químicos reductores, agentes protectores y/o agentes estabilizantes, los cuales pueden ser tóxicos (Patil y Kim, 2017). Además, se ha reportado la producción rápida y fácil de nanopartículas de oro/plata mono y bimetálicas al usar hongos filamentosos como agentes reductores (Castro-Longoria et al., 2011). Debido a las propiedades antimicrobianas de la plata, varias cepas de hongos han sido utilizadas para la síntesis de nanopartículas de plata como se muestra en la Tabla 1. En diferentes estudios se ha reportado la síntesis de nanopartículas de plata, utilizando como precursor el nitrato de plata (AgNO_3) combinado con el líquido extracelular del cultivo fúngico. También se ha reportado la producción de nanopartículas con una variedad de formas, y tamaños con rangos de 1 nm hasta 93 nm (Tabla 1)(Rafique et al., 2017).

Tabla 1. Morfología y tamaño de nanopartículas de plata sintetizadas por el método verde utilizando hongos.

Hongo	Precursor	Intracelular/Extracelular	Tamaño (nm)	Morfología
<i>Humicola</i> sp. *	AgNO ₃	Extracelular	5-25	Esférica
<i>Penicillium</i> sp. *	AgNO ₃	Extracelular	25-30	Esférica
<i>Schizophyllum commune</i> *	AgNO ₃	Intracelular y extracelular	51-93	Esférica
<i>Trichoderma reesei</i>	AgNO ₃	Extracelular	5-50	Aleatoria
<i>Fusarium semitectum</i> *	AgNO ₃	Extracelular	1-50	Elipsoidal y esférica polidispersas
<i>Fusarium acuminatum</i> *	AgNO ₃	Extracelular	13	Esférica
<i>Aspergillus clavatus</i> *	AgNO ₃	Extracelular	10-25	Hexagonal y esférica polidispersas
<i>Alternaria alternata</i> *	AgNO ₃	Extracelular	32.5	Esférica y polidispersas
<i>Phoma glomerata</i> *	AgNO ₃	Extracelular	60-80	Esférica
<i>Trichoderma viride</i>	AgNO ₃	Extracelular	5-40	Esférica

(Modificado de Rafique *et al.*, 2017). *hongos patógenos

Cabe resaltar que algunos de los hongos que han sido utilizados en la síntesis de nanopartículas metálicas, son patógenos de plantas, insectos y humanos (Tabla 1). Así mismo hay estudios que reportan el uso de hongos no patógenos como el basidiomiceto *Ganoderma lucidum* para la síntesis de nanopartículas metálicas de plata y oro (Vetchinkina *et al.*, 2016). Esta especie es útil y fácil de manipular ya que son hongos no patógenos para animales, plantas y humanos. Adicionalmente, se ha reportado el uso de extractos de *G. lucidum* con aplicaciones anti-tumoral. Los principales constituyentes detectados de *G. lucidum* son los triterpenoides y los polisacáridos (Zhao *et al.*, 2018). En el 2018, Vetchinkina reportó que las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de *G. lucidum* son no tóxicas para líneas celulares de mamíferos si se utiliza a una concentración entre 1 y 10 µg/mL.

1.1.2 Nanopartículas de cobre

El cobre es un elemento traza indispensable para múltiples reacciones enzimáticas en los organismos vivos, un ejemplo de estas reacciones enzimáticas es catalizada por la enzima citocromo C oxidasa involucrada en la respiración celular (Scheiber *et al.*, 2014). El cobre es esencial para la vida, pero es altamente reactivo y puede ocasionar daño celular, por lo que las células poseen mecanismos para la homeostasis del cobre y así poder mantener niveles seguros de este elemento (Hans *et al.*, 2016; Solioz, 2018).

El cobre ya ha sido utilizado para la producción de nanopartículas, las diferentes áreas de aplicación de nanopartículas de cobre se resumen en la Figura 4 (Siddiqi y Husen, 2020). Las nanopartículas de cobre poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, antidiabéticas y favorecen la cicatrización de heridas, por lo que pueden ser utilizadas ampliamente en el campo de la medicina. Al igual que otras nanopartículas metálicas, las nanopartículas de cobre tienen efectos citotóxicos (Henson et al., 2019), los cuales han sido dirigidos y aplicados en nuevos tratamientos contra el cáncer (Hu et al., 2018).

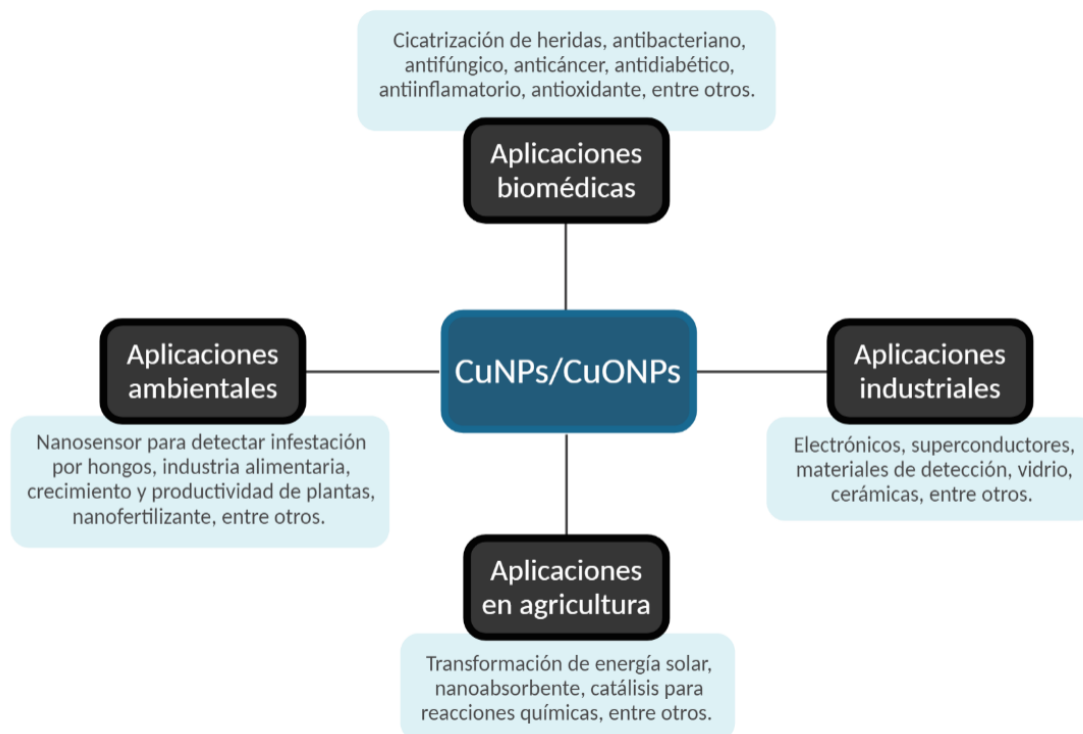


Figura 4. Aplicaciones de las nanopartículas de cobre (Modificado de Siddiqi y Husen, 2020).

1.1.2.1 Biosíntesis de nanopartículas de cobre

La síntesis de nanopartículas de cobre por métodos biológicos, es un proceso más económico y con menor repercusión al ambiente. La síntesis verde permite utilizar fuentes como extractos de plantas (Erci et al., 2020; Siddiqi y Husen, 2020), extractos de frutos (Qamar et al., 2020), y extractos fúngicos intracelulares o extracelulares (Vetchinkina et al., 2018). El uso de extractos de hongos para la síntesis de nanopartículas tiene varias ventajas frente a otros microorganismos, como la fácil manipulación en el laboratorio, no requieren muchos nutrientes para su crecimiento, poseen alta capacidad de unión a la pared celular y una alta capacidad de absorción intracelular de metales (Abdel-Wareth, 2017). Se ha reportado la micosíntesis

de nanopartículas de cobre con efectos antibacterianos utilizando especies de *Penicillium* sp. (Honary et al., 2012). En otro estudio se produjeron nanopartículas de cobre utilizando aislados del hongo *Aspergillus niger* de frutas y verduras podridas (Noor et al., 2020), tales nanopartículas presentaron un potencial anticancerígeno al inhibir el crecimiento de líneas celulares cancerígenas de humanos (células Huh-7). Además, Noor y colaboradores (2020) reportaron que las nanopartículas de cobre causaron un efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*, de las cuales las primeras tres son consideradas importantes patógenos para humanos. Hongos como *Hypocrea lixii*, *Stereum hirsutum* y *A. niger* y especies de *Penicillium* sp., han sido las reportadas (Cuevas et al., 2015; El-Batal et al., 2020; Naqvi et al., 2017; Salvadori et al., 2013), como hongos prospectos para la micosíntesis de nanopartículas de cobre con potencial aplicación en biomedicina (Tabla 2).

Tabla 2. Hongos reportados para la síntesis de nanopartículas de cobre.

Hongo	Precursor	Tamaño de CuNPs	Morfología	Referencia
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	CuSO ₄	9-950 nm	Esférica	Honary et al., 2012
<i>Penicillium citrinum</i>	CuSO ₄	9-950 nm	Esférica	Honary et al., 2012
<i>Penicillium waksmanii</i>	CuSO ₄	9-950 nm	Esférica	Honary et al., 2012
<i>Hypocrea lixii</i>	CuCl ₂ ·2H ₂ O	24.5 nm	Esférica	Salvadori et al., 2013
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	CuCl ₂ ·2H ₂ O	87.5 nm	Esférica	Salvadori et al., 2014
<i>Stereum hirsutum</i>	CuCl ₂	5-20 nm	Esférica	Cuevas et al., 2015
<i>Aspergillus niger</i>	Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	500 nm	Esférica	Naqvi et al., 2017
<i>Trichoderma asperellum</i>	Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	10-190 nm	Esférica	Saravanakumar et al., 2019
<i>Penicillium chrysogenum</i>	CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.7 nm	Esférica	El-Batal et al., 2020
<i>Trichoderma atroviride</i>	CuSO ₄	5-25 nm	Esférica irregular	Natesan et al., 2020
<i>Aspergillus niger</i>	CuSO ₄	5-100 nm	Esférica	Noor et al., 2020
<i>Trichoderma harzianum</i>	CuSO ₄ ·5H ₂ O	38-77 nm ancho y 135-320 nm largo	Fibra elongada	Consolo et al., 2020

CuNPs: Nanopartículas de cobre, (Modificado de Noor et al., 2020 y Castro-Longoria, 2022).

1.1.2.2 Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de cobre

En la actualidad, la investigación del cobre en nanomedicina es amplia, existen áreas de la medicina donde destacan sus aplicaciones como oncología, infectología y endocrinología. Entre estas áreas se encuentran dos de las primeras causas de muerte por enfermedad reportadas en México, tumores malignos y diabetes (INEGI, 2018). Además, el combate constante contra bacterias resistentes es un problema global, en la que pocos años después de la liberación de un nuevo antibiótico, se descubre la resistencia por alguna bacteria

hacia ese nuevo antibiótico (Figura 5). Las bacterias resistentes a antibióticos implican una menor respuesta al tratamiento convencional de las enfermedades infecciosas, estas pueden ocasionar complicaciones que comprometan la función adecuada de órganos y llegar a convertirse letal para el individuo. Se considera a una bacteria multirresistente cuando adquiere resistencia ante tres a cuatro grupos de antibióticos. A las bacterias que son resistentes a casi todos los grupos de antibióticos se les ha clasificado como bacteria con resistencia múltiple extrema o extensa. Las bacterias que son resistentes a todos los antibióticos disponibles aprobados son conocidas como panresistentes (Magiorakos et al., 2012; Roca et al., 2015; Rossolini, 2016). Es por ello que continúan los esfuerzos de diseñar nanomateriales biocompatibles y degradables, para combatir bacterias resistentes, células tumorales y que sean capaces de contrarrestar complicaciones comunes de enfermedades crónicas degenerativas (Baym et al., 2016; Bharadwaj et al., 2021; Evans y Kavanagh, 2021; Mba y Nweze, 2021; Rehman et al., 2021; Tan et al., 2020).

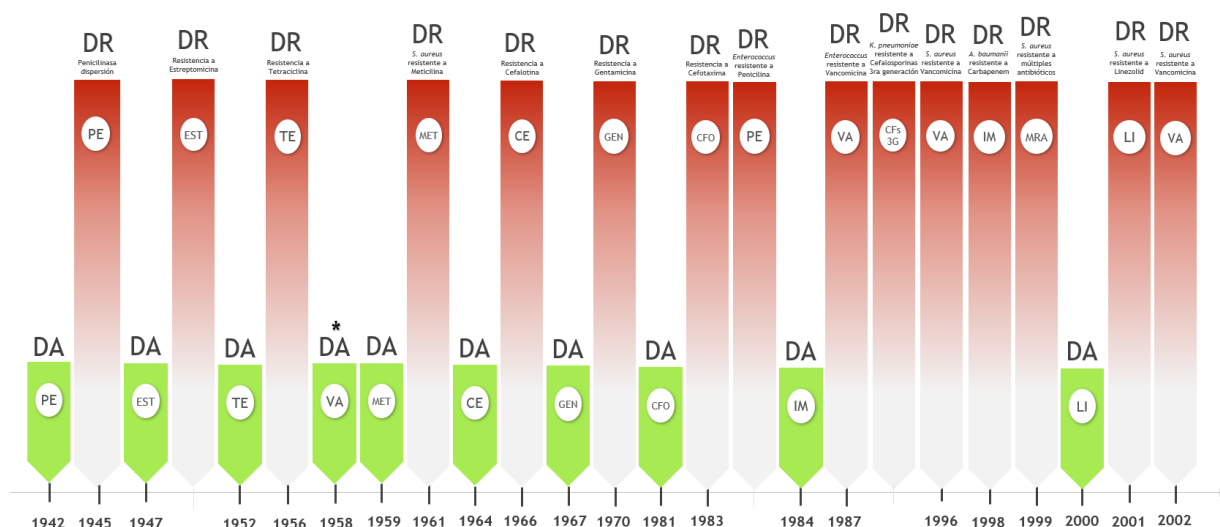


Figura 5. Línea de tiempo de desarrollo de antibióticos y aparición de resistencia bacteriana (Modificado de Huh et al., 2011). DA: Desarrollo de Antibiótico, DR: Desarrollo de Resistencia, PE: Penicilina, EST: Estreptomicina, TE: Tetraciclina, VA: Vancomicina, MET: Meticilina, CE: Cefalotina, GEN: Gentamicina, CFO: Cefotaxima, CFs 3G: Cefalosporinas de 3ra generación, IM: Imipenem, MRA: Resistencia a múltiples antibióticos LI: Linezolid. *Raramente usada hasta 1980.

1.1.2.2.1 Aplicaciones de las nanopartículas de cobre como antibiótico

La organización mundial de la salud (OMS) define como antibiótico a aquellos medicamentos capaces de prevenir y tratar infecciones por bacterias. Prevalece la búsqueda de nuevos compuestos o sustancias químicas con propiedades antibióticas, que ayuden en la contención de la crisis global de la resistencia

bacteriana a múltiples antibióticos. En algunos casos, la resistencia bacteriana puede ser mayor para algunas bacterias hasta el punto de ser extrema, como se muestra en la Tabla 3 (Garza-González et al., 2019). Un factor limitante que complica el adecuado manejo de infecciones ocasionadas por bacterias resistencia extrema a antibióticos, que es preocupante para quienes se encuentran en el primer nivel de atención de salud, es la escasa aprobación de antibióticos por la administración de alimentos y fármacos, (FDA, por sus siglas en inglés). Como se muestra en la Figura 6, cada vez son menos los antibióticos que anualmente son aprobados por la FDA (Andrei et al., 2019; Livermore, 2012; Taubes, 2008).

Tabla 3. Bacterias Gram negativas resistentes a antibióticos prevalentes en México.

Microorganismo (n)	MDR (%)	Posible XDR (%)	Verdadero XDR (%)	Posible PDR (%)
<i>Acinetobacter</i> sp. (861)	53	43.2	8.8	38.8
<i>Klebsiella</i> sp. (3334)	22.6	ND	ND	ND
<i>E. coli</i> (11676)	19.4	8.1	0	0.04
<i>Enterobacter</i> sp. (1334)	11.9	ND	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> (1995)	8.8	8.3	0.2	4.4

MDR: Múltiple resistencia a antibióticos, XDR: Resistencia extrema a antibióticos, PDR: Panresistencia a antibióticos y ND: No datos (Modificado de Garza-González et al., 2019).

Algunos mecanismos del efecto antibacteriano de las nanopartículas de cobre descritos, son mediante la alteración de la membrana celular bacteriana, el daño secundario por incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la inhibición enzimática y/o degradación del ADN (Solioz, 2018).

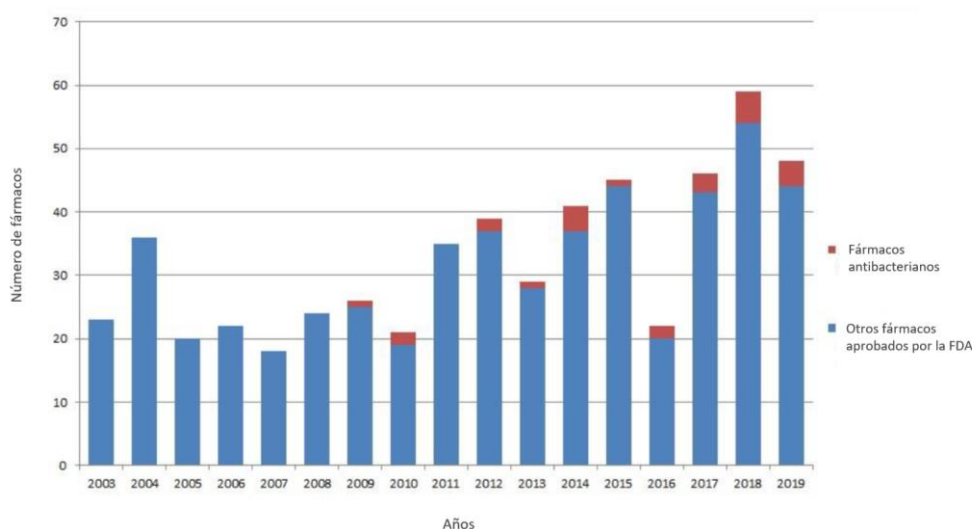


Figura 6. Número de antibióticos aprobados por la FDA (Tomado y modificado de Andrei et al., 2019).

En el 2010, Usha y colaboradores reportaron la síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre para el desarrollo de textiles antimicrobianos, los cuales pueden ser útiles en hospitales para prevenir o minimizar infecciones. En otro estudio Ning (2015), demostró que las mejores concentraciones de iones Cu^{2+} para mantener una alta eficacia antibacteriana pero baja toxicidad en células de mamíferos es 10^{-5} a 10^{-4} mol/L. Posteriormente en otro estudio reportado por Lu y colaboradores, donde realizaron andamios de carboximetil quitosano (CMC), alginato y cobre, encontraron que en los andamios hechos con 1 mmol/L de nanopartículas de cobre había una reducción de la población bacteriana del 99 %, obteniendo así andamios con altas propiedades antibacterianas y baja citotoxicidad como se muestra en la Figura 7 (Lu et al., 2018).

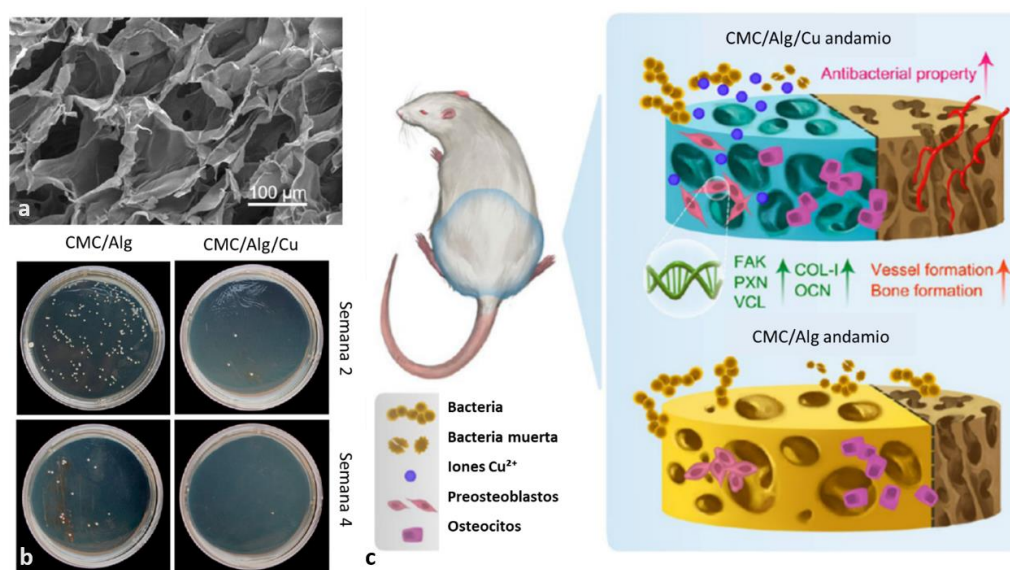


Figura 7. Andamio con nanopartículas de cobre con aplicaciones para ingeniería de tejidos (Modificado de Lu *et al.*, 2018). Andamios de carboximetil quitosano (CMC), alginato y nanopartículas de cobre, con potencial para la reparación de hueso infectado. a) Imagen por microscopía electrónica de barrido donde se observa el tamaño y distribución de los poros obtenidos del andamio de CMC/alginato/cobre (barra de escala de 100 μm). b) Colonias de *S. aureus* en medio LB cultivadas a 37°C por 24 h, muestras obtenidas de bacterias recolectadas de andamios implantados a las 2 y 4 semanas. c) Representación gráfica comparativa de los resultados *in vivo*; donde se obtuvo andamio de CMC/alginato/nanopartículas de cobre con propiedades antibacterianas, neoformación vascular, adhesión celular resultante de la regulación al alza de expresión de los genes relacionados con la adhesión; cinasa de adhesión focal (FAK), paxilina (PXN) y vinculina (VCL), y capacidad osteogénica con aumento significativo a las dos semanas de la expresión de genes relacionados con la osteogénesis; colágeno tipo I (COL-I) y osteocalcina (OCN).

1.1.2.2.2 Aplicaciones de las nanopartículas de cobre en la terapia oncológica

Diversas investigaciones han dirigido el efecto citotóxico de las nanopartículas metálicas a innovadoras terapias oncológicas (Hu et al., 2018; Liu et al., 2019; Noor et al., 2020); como las terapias contra el cáncer

guiadas por imagen (Liu et al., 2019). En la Tabla 4 se muestra un resumen de los reportes en los que se utilizaron diferentes tamaños de nanopartículas de cobre funcionalizadas para dirigirse a un blanco específico, con la finalidad de atenuar el daño a tejido sano. En estas investigaciones el tamaño reportado de las nanopartículas de cobre está por debajo de los 10 nm. El tamaño pequeño de las nanopartículas de cobre favorece su propiedad citotóxica (Blanco et al., 2015; Liu et al., 2019).

Tabla 4. Tamaño de distintos tipos de nanopartículas de cobre multifuncionales, investigadas para terapias guiadas por imagen.

Nanomaterial	Modalidad de imagen	Terapia	Tamaño NP (nm)	Referencia
CSNTs	/	RT/PTA	/	Xiao <i>et al.</i> , 2013
u-Cu _{2-x} S NDs	PA	PTT	2	Mou <i>et al.</i> , 2015a
PFP@u-Cu _{2-x} S NDs@ liposoma	US/PA	PTT	2	Mou <i>et al.</i> , 2015b
⁶⁴ CuS NDs	PAI/PET	PTT	4.3	Zhou <i>et al.</i> , 2015
CuS-PEG NPs	/	PTT/PDT	5	Li <i>et al.</i> , 2017
GSH-CuS NDs	PA/MRI	PTT	4.8 +/- 0.6	Liang <i>et al.</i> , 2017
DOX-CuS@PMOs	/	Quimo-PTT	2.67	Lu <i>et al.</i> , 2017
Cus-UCNPs	/	PTT	3	Lu <i>et al.</i> , 2017
CZTS@BSA	PA/MRI	PTT	4.8 +/- 1.9	Tan <i>et al.</i> , 2018
MDNs	PET/PAI	Quimio-PTT	5.8	Wei <i>et al.</i> , 2018

DOX: Doxorubicina, MRI: Resonancia magnética, PA: Fotoacústica, PET: Tomografía por emisión de positrones, PTA: Agente de conversión fototérmica, PTT: Terapia fototérmica, RT: Radioterapia, ND: Nanodendrimeros y US: Ultrasonido (Modificado de Liu *et al.*, 2019).

1.1.2.2.3 Aplicaciones de las nanopartículas de cobre en la ingeniería de tejidos

Las aplicaciones de las nanopartículas de cobre como compuestos de andamios celulares, ha sido una de las nuevas líneas de aplicación en el área de la nanomedicina y la ingeniería de tejidos. En el 2018, Lu y colaboradores consiguieron favorecer la formación de hueso en estudios *in vivo*, mediante la combinación de andamios de alginato, CMC y cobre. Al mismo tiempo identificaron, las propiedades antimicrobianas contra *S. aureus*, este andamio es muy prometedor para aplicaciones en múltiples procedimientos quirúrgicos del área de traumatología, sobre todo en fracturas expuestas que tiene riesgo de contaminación alto.

Un año después, Alizadeh y colaboradores (2019) emplearon las nanopartículas de cobre de diversos tamaños y en diferentes concentraciones, para identificar su efecto en la cicatrización de heridas cutáneas. En este estudio, se observó que las nanopartículas de cobre de 20 nm, utilizadas en concentraciones de 1 mM y 10 mM, tuvieron efectos tóxicos en líneas celulares de queratinocitos y fibroblastos. Por otro lado,

demonstraron que las nanopartículas de cobre de 40 nm en una concentración de 10 μM incrementaron la migración de células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos. Además, señalaron que las nanopartículas de cobre utilizadas a concentraciones de 1 μM con tamaño de 80 nm, mostraron mayor producción de colágeno tipo 1A1 en fibroblastos, lo cual se evidenció en la velocidad del cierre de herida, y aumento en la angiogénesis del tejido en los modelos de ratón que utilizaron.

1.2 Justificación

Las propiedades que poseen las nanopartículas metálicas son un motivo por el cual siguen siendo utilizadas en múltiples estudios de investigación para aplicaciones en medicina como potencial terapéutico para enfermedades crónicas-degenerativas. Las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) tienen un alto potencial para ser utilizadas en materiales para el manejo y cuidado de heridas.

Por otro lado, es importante hacer énfasis en la síntesis de nanopartículas metálicas a partir de recursos biológicos fáciles de obtener, de cultivar, de manipular, y por lo tanto que mantengan un bajo costo para su producción y para el ambiente. De los materiales biológicos utilizados para la biosíntesis de nanopartículas, los hongos han sido considerados como excelentes candidatos para la síntesis de nanomateriales, ya que poseen altas tasas de crecimiento y son fáciles de cultivar. Sin embargo, hay muy pocos trabajos que exploren la biosíntesis de CuONPs utilizando hongos como agentes reductores.

Por lo tanto, en este estudio se utilizó al hongo *Ganoderma sessile* para la producción de CuONPs y se evaluó su uso potencial como agentes antimicrobianos y así ofrecer una alternativa contra microorganismos patógenos de humanos.

1.3 Hipótesis

Las nanopartículas de cobre sintetizadas a partir de compuestos intracelulares y metabolitos extracelulares del hongo *Ganoderma sessile* presentarán actividad antimicrobiana y baja citotoxicidad en células animales.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Obtener mediante el uso del extracto y sobrenadante del hongo *Ganoderma sessile*, nanopartículas de óxido de cobre y caracterizar sus propiedades fisicoquímicas.

1.4.2 Objetivos específicos

- Obtener un protocolo eco-amigable y reproducible para la síntesis de nanopartículas de cobre a partir de compuestos intracelulares y metabolitos extracelulares del hongo *G. sessile*.
- Obtener la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de cobre sintetizadas a partir de compuestos intracelulares y metabolitos extracelulares del hongo *G. sessile*.
- Determinar las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de cobre contra bacterias Gram positivo y Gram negativo.
- Determinar la toxicidad de las nanopartículas de cobre en líneas celulares de mamíferos.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis de nanopartículas de cobre

2.1.1 Cultivos fúngicos y obtención de biomasa

G. sessile se obtuvo de la colección de microorganismos en el departamento de Microbiología experimental aplicada del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). La cepa de *G. sessile* se inoculó en cajas Petri de 100 mm x 15 mm con 10 mL de medio agar papa dextrosa (PDA; PDB BD Difco™ más Agar Difco™ al 2%), por triplicado. Posteriormente, se incubó a 30 °C por 96 h (Mazón-Martínez, 2020). Una vez que el micelio llenó $\frac{3}{4}$ de la caja de cultivo, se tomaron 10 muestras del micelio en medio de cultivo de cada caja Petri, con un tamaño estándar de 10 mm de diámetro utilizando un tubo de borosilicato estéril. Las muestras del micelio se trasladaron a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio caldo papa dextrosa (PDB, BD Difco™) cada uno, y se colocaron en incubadora con agitación a 120 rpm por 7 días a 30 °C (Figura 8).

2.1.2 Obtención de extracto acuoso y sobrenadante

Una vez transcurridos los 7 días de incubación en agitación, se separó la biomasa del medio líquido, y se colocó en tubos cónicos de 50 mL con 20 mL de agua destilada, y se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm a 22 °C. Se desechó el agua destilada y se agregó 20 mL de agua desionizada, posteriormente fue centrifugada a 22 °C durante 10 min a 10,000 rpm. Se colocó la biomasa en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de agua desionizada y se incubó en agitación a 120 rpm por 24 h a 30 °C (Mazón Martínez, 2020). Trascorridas las 24h, la biomasa y el líquido obtenido se colocó en tubos cónicos de 50 mL, y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 22 °C (Figura 8). Se decantó el sobrenadante, se filtró en bomba de vacío con una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 μm (MF-Millipore). Posteriormente fue colocado en una jeringa de 20 mL y se filtró utilizando un portafiltros SWINNEX de 25 mm (Millipore) con una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22 μm (MF-Millipore). Posteriormente, el sobrenadante se almacenó en un frasco claro estéril a temperatura ambiente en oscuridad. La biomasa se pesó, y se maceró con agua desionizada (proporción 1:1), en mortero de ágata.

Una vez macerada, se centrifugó por 15 min a 10,000 rpm y 22 °C, y finalmente se decantó el extracto acuoso.

El extracto acuoso obtenido se filtró, a través de una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 μm , utilizando una bomba de vacío. Y posteriormente el extracto acuoso se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22 μm . Finalmente, el extracto acuoso fue colocado en viales de vidrio claro y almacenado en oscuridad envuelto en papel aluminio a temperatura ambiente.

2.1.3 Síntesis de nanopartículas

El precursor metálico utilizado para la síntesis de nanopartículas fue el sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), de Sigma-Aldrich (MKCK-1228). Se prepararon soluciones de sulfato de cobre a 1, 5, 10 y 15 mM, así mismo se preparó la solución de hidróxido de sodio (NaOH) a 10 mM y 100 mM. Se colocó el extracto acuoso (EA) con la solución de CuSO_4 a 1 mM y 5 mM en las siguientes proporciones; 1:1, 1:2 y 1:3 (EA: CuSO_4). Se incubaron por 96 h a temperatura ambiente (22-28 °C), 30, 37 y 60 °C, y se observó el viraje de color a las 24, 48, 72 y 96 h. Posterior a la incubación, se utilizó la solución de hidróxido de sodio (NaOH) a 10 mM y 100 mM, las preparaciones fueron ajustadas a pH 8, 10 y 12, e incubadas a 60 °C durante 96 h. El sobrenadante (SN) fue mezclado con sulfato de cobre a 5 mM en relación 1:1, 1:2 y 1:3 (SN: CuSO_4), e incubada a 60 °C durante 96 h. Finalmente, se prepararon dos viales de sobrenadante con sulfato de cobre a 5 mM con una relación 1:3, se incubaron a 25 °C y 60 °C, y se observó el viraje de color a las 24, 48, 72 y 96 h.

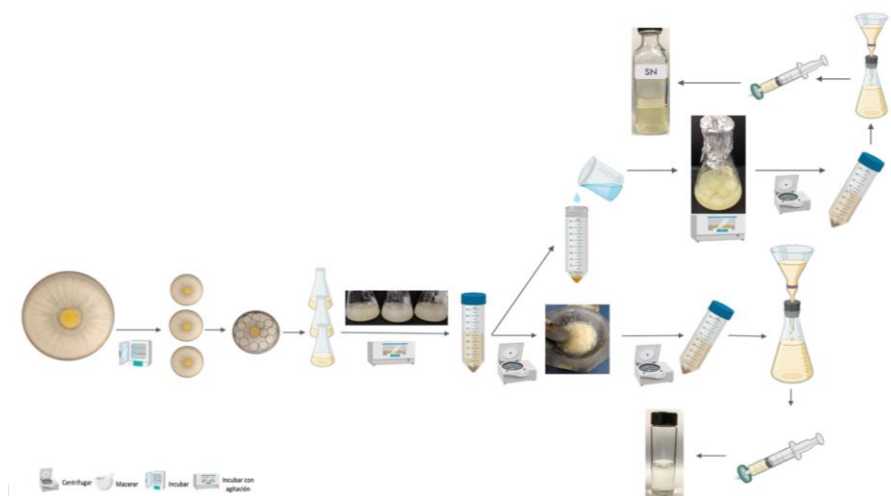


Figura 8. Cultivos fúngicos, obtención de extracto acuoso y sobrenadante.

2.2 Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de cobre

2.2.1 Espectrofotometría UV-Visible

Para confirmar la síntesis de las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), se midió la absorbancia de las soluciones preparadas con el EA y el SN, se utilizó el espectrofotómetro de UV-Visible (JENWAY 6505), en un rango de 200 a 800 nm (Erci et al., 2020). Se colocaron las soluciones en celdas de plástico para espectrofotómetro, y se midieron las diferentes concentraciones de las soluciones de CuSO_4 con EA y SN de *G. sessile* en proporciones 1:1 y 1:3. Se midió la absorbancia de la solución de CuSO_4 , el EA y SN de *G. sessile*. Para algunas muestras se corroboró la absorbancia utilizando el espectrofotómetro de UV-vis (Thermo Scientific Multiskan GO), en un rango de longitud de onda de 200 a 700 nm.

2.2.2 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Para analizar el radio hidrodinámico y la homogeneidad de las nanopartículas de cobre, se utilizó el equipo Zetasizer Ver. 7.13 (Malver). Se tomó 1 mL de las diferentes soluciones de CuONPs con SN y EA. Las muestras se colocaron en celdillas desechables para su análisis.

2.2.3 Análisis de potencial zeta (PZ)

El análisis de la carga superficial de las nanopartículas y por lo tanto, de la forma indirecta, de la estabilidad de las diferentes soluciones de CuONPs, se realizó midiendo el potencial Zeta utilizando el equipo Zetasizer Ver. 7.13 (Malver).

2.2.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se determinó la forma y el tamaño de las CuONPs con el uso de microscopía electrónica de transmisión (TEM), utilizando microscopio electrónico Hitachi 7500. Para ello se utilizaron rejillas de cobre para TEM, en las cuales se colocaron 10 μL de solución de nanopartículas de cobre sintetizadas con extracto acuoso y sobrenadante. Posteriormente, se dejaron secar a temperatura ambiente, y fueron analizadas a diferentes magnificaciones a 80 kV. Las estimaciones se obtuvieron con el análisis de 1000 partículas para

cada muestra. Los resultados fueron presentados como la media $\pm$ la desviación estándar, obtenidos con la utilización del software ImageJ.

2.3 Ensayos *in vitro*

Para medir las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de cobre se realizaron dos ensayos: la determinación de inhibición microbiana utilizando el método de difusión en disco y en pozo, y la determinación de la concentración mínima inhibitoria. Para la determinación del grado de toxicidad de las CuONPs se utilizaron cultivos de células de riñón (línea celular de riñón canino Madin-Darby), macrófagos de ratón (línea celular RAW 264.7) y células de hígado de ratón (línea celular de hepatocitos AML-12).

2.3.1 Ensayo de inhibición

Para este ensayo se utilizaron cepas bacterianas obtenidas de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC, por sus siglas en inglés American Type Culture Collection); *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 44476) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

Para determinar las propiedades antibacterianas se utilizaron los métodos de difusión en disco y difusión en pozo, en el cual se observó la presencia de una zona inhibitoria de crecimiento bacteriano en el medio cultivado. Para esto, primero se aislaron colonias utilizando las cepas criopreservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, posteriormente se inocularon con estría cruzada en caja Petri de 100 mm x 15 mm con medio solido del caldo de Lisogenia (LB por sus siglas en inglés, Lysogeny Broth MILLER Merck Millipore) con agar al 2% (Bacto™ Agar BD), y fueron incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Posteriormente se tomaron 3-5 colonias con morfología similar utilizando el asa de siembra, y fueron incubadas en medio LB en agitación, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Transcurridas las 24 h se tomó 10 μL de inóculo bacteriano, de cada cepa bacteriana incubada, y se colocaron en medio líquido Mueller Hinton (Difco™ Mueller Hinton Broth BD). Se midió por espectrofotometría UV-Visible, en longitud de onda de 625 nm, y se buscó una absorbancia de 0.08 a 0.13 (Wiegand et al., 2008). Se realizaron curvas de crecimiento de cada cepa bacteriana para determinar el tiempo en que cada cepa llega a la absorbancia de deseada (entre 0.08 a 0.13) para obtener una concentración cercana a 5×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml, utilizando la escala del 0.5 de McFarland, y conteo de UFC.

Una vez obtenida la absorbancia entre 0.08 y 0.13 del cultivo bacteriano, se diluyó en una relación 1:100 en medio Mueller Hinton (MH) líquido (0.1 mL del inóculo y 10 mL de medio MH).

Para el método de difusión en disco, se colocó 1ml de la dilución previa del cultivo bacteriano con 9 mL de medio MH agar (previo a molificación), en cajas Petri de 100 mm x 15 mm, y se mezcló con cuidado para obtener un crecimiento homogéneo. Posteriormente, se colocaron discos de 6 mm estériles (hechos de papel filtro VWR), impregnados previamente con 5 μ L de CuONPs, se volvieron a impregnar con 5 μ L posterior a su colocación (10 μ L totales). Como controles se colocaron, bajo el mismo procedimiento, un disco impregnado con agua destilada, uno impregnado con CuSO₄ a 5 mM, otro con el EA puro y otro SN. Finalmente se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Para el método de difusión en pozo, se utilizó sacabocado de 10 mm de diámetro. En cajas Petri de 150 mm x 15 mm, se colocó 1 mL de la dilución previa del cultivo bacteriano con 18 mL de medio MH agar (previo a molificación), y se mezcló con cuidado para obtener un crecimiento homogéneo. Una vez molificado el medio, se realizaron los pozos y se colocó un volumen de 50 μ L de CuONPs en el pozo, el mismo procedimiento se realizó con los controles previamente mencionados.

2.3.2 Concentración mínima inhibitoria

Para llevar a cabo este análisis, se utilizaron las concentraciones bacterianas estandarizadas previamente descritas, utilizando el 0.5 de la escala de McFarland (Wiegand et al., 2008). Lo siguiente se realizó utilizando los cultivos de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. epidermidis*. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), se utilizó el método de microdilución en placa, conforme el protocolo del instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés Clinical & Laboratory Standards Institute)(CLSI, 2012).

En el ensayo de microdilución, se inoculó y aisló cada cepa bacteriana en cajas Petri con medio LB agar a 37 °C por 24 h. Posteriormente se tomaron 4 colonias, las cuales fueron colocadas en medio MH líquido, fueron incubadas a 37 °C en agitación, hasta alcanzar una concentración aproximada de 5×10^5 UFC por mL (Wiegand et al., 2008). Se utilizaron microplacas de poliestireno con 96 pozos (Costar 3595). En cada pozo se colocó 50 μ L de MHB, y las diferentes concentraciones de CuONPs-EA y CuONPs-SN. Del inóculo bacteriano se colocaron 5 μ L, y como controles MHB sin inocular, y MHB con inóculo bacteriano sin CuONPs, como control de crecimiento. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Para el análisis, previo

a incubación y posterior a la incubación, se utilizó el lector de placas Multiskan Sky versión 1.00.55, con el software SkanIt 6.0.1. Trascurrido el tiempo de incubación, se tomaron 10 μ L de los pocillos donde no se observó turbidez, para ser colocados en cajas Petri con LB agar. Para determinar si había crecimiento bacteriano, las cajas fueron incubadas durante 24 a 48 h, en una temperatura de 37 °C, esto fue realizado para cada cepa bacteriana analizada.

2.3.3 Cultivos celulares y ensayo de viabilidad celular

Para determinar la toxicidad de las nanopartículas de cobre se utilizaron diferentes líneas celulares de mamíferos; células de riñón canino, macrófagos de ratón y células de hígado (hepatocitos) de ratón. Las líneas celulares fueron tratadas con diferentes volúmenes de CuONPs, y posteriormente se sometieron al ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT.

2.3.3.1 Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron: la línea celular de riñón canino Madin-Darby (línea celular MDCK, por sus siglas en inglés Madin-Darby Canine Kidney) NBL-2 (ATCC CCL-34), la línea celular de macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71), y la línea celular de hepatocitos AML-12 (ATCC CRL-2254).

Las líneas celulares se cultivaron en medio modificado de Eagle Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium), el cual fue suplementado con 1 % v/v de Estreptomicina/Penicilina (Antibióticos) (Sigma-Aldrich Cat. A5955), 2 g/L de bicarbonato de sodio y 1 % v/v L-glutamina (Sigma-Aldrich Cat. G6392). Además, al cultivo se le añadió 10 % v/v de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés Fetal Bovine Serum) (Bench-Mark Gemini, Bio Products, USA), y se esterilizó con un filtro de 0.22 μ m. En el caso de los hepatocitos, el medio que se utilizó fue el DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 10 μ g/mL de insulina, 5.5 μ g/mL de transferrina, 5 ng/mL de selenio, 40 ng/mL de dexametasona y 1 % de antimicótico/antibiótico (penicilina y estreptomicina). Las células se cultivaron en una caja de Petri para cultivo celular y se incubaron a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO₂, hasta alcanzar una confluencia del 70 % en la placa.

Además, se preparó una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés Phosphate Buffered Saline), para la cual se disolvieron 8 g NaCl [137 mM], 0.2 g de KCl [2.7 mM], 1.44 g de Na₂HPO₄ [10 mM] y 0.24 g de KH₂PO₄ [2 mM] en 800 mL de agua destilada. Se aforó a 1 L, se ajustó a pH 7.4, fue filtrada con filtros de 0.22 µm y esterilizada en autoclave. Una vez esterilizada, se almacenó a 4 °C para uso posterior.

2.3.3.1.1 Subcultivos celulares y tratamiento con tripsina

Los cultivos celulares fueron cambiados al llegar a una confluencia de 70-80 % en la caja de cultivo; para la obtención de subcultivos, el medio de cultivo fue retirado y se realizó un lavado con la solución PBS para facilitar la disociación de las células de la superficie de las cajas Petri, se adicionó 1 mL de tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich Cat. 59429) y se incubaron las células a 37 °C durante 5 min, y 5 % de CO₂. Posteriormente las células fueron removidas mecánicamente y colocadas en tubo, para posteriormente centrifugarse a 1200 rpm por 5 min a 21 °C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se realizó un lavado de pellet celular con 1 mL de PBS y se centrifugaron nuevamente. El pellet de células se suspendió en 1 mL de DMEM suplementado, las células se contaron y se colocaron 150,000 células en una caja Petri de 6 cm con 5 mL de medio de cultivo suplementado. Finalmente, las células se incubaron por 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂.

2.3.3.2 Ensayo de viabilidad celular

Para determinar la susceptibilidad de las diferentes líneas celulares a las CuONPs, se utilizó una microplaca de 96 pozos, cada pozo contenía 10,000 células en un volumen final de 100 µL. Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂, por 24 h. Posterior a la incubación se descartó el medio de cultivo y las células se expusieron a diferentes volúmenes de CuONPs (22.2, 11.1, 5.55, 2.775, 1.385 y 0.687 µL), obtenidas con el extracto acuoso y sobrenadante de *G. sessile*. Como control positivo se utilizó medio de cultivo DMEM sin CuONPs, y como control negativo se utilizó 1 % de Tritón X-100 en PBS. Se ajustó el volumen final de los pozos a 100 µL con medio DMEM suplementado, y se incubó la placa a 37 °C con CO₂ al 5 %. Una vez transcurridas 24 h en incubación con CuONPs, se descartó el medio de cultivo y se lavaron los cultivos tres veces con 200 µL de PBS.

Para determinar la viabilidad celular se utilizó el método colorimétrico por reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

2.3.3.2.1 Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT

El ensayo de la reducción de MTT, se considera un ensayo de alto rendimiento y sensibilidad para la evaluación de la citotoxicidad. El MTT es una sal de tetrazolio de coloración amarilla, el cual es reducido a (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano (formazan). El formazan es reducido por la actividad catalítica de enzimas mitocondriales, formando cristales de color púrpura no solubles en agua.

Después de exponer durante 24 h a las diferentes líneas celulares al tratamiento de CuONPs, los cultivos celulares se lavaron con 200 μ L de PBS. Posteriormente, a cada pozo se añadió 10 μ L de MTT (Sigma Aldrich M-8910) y 90 μ L de medio DMEM sin suplementar; y se incubó la microplaca por 4 h a 37 °C en oscuridad con CO₂ al 5 %. Al término del tiempo de incubación se agregó 100 μ L de isopropanol, para disolver los cristales de formazan, y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Todos los ensayos de reducción de MTT se realizaron de forma independiente por triplicado. Finalmente se leyó la absorbancia de la placa con un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Scientific Multiskan GO) a 570 nm y 690 nm. A los valores obtenidos a 570 nm se le restaron los valores obtenidos a 690 nm de cada medición, para obtener el valor real de absorbancia del tratamiento. Se restó la absorbancia promedio de las células tratadas con Tritón-X100 (células muertas) para normalizar los valores. Se tomó como 100 % de viabilidad celular la absorbancia del control positivo, y se calculó el porcentaje de viabilidad de cada volumen utilizado como tratamiento.

2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 9.3.0. Los datos graficados de los cultivos bacterianos se reportaron como media $\pm$ error estándar, se utilizó ANOVA de 1 vía y fueron normalizados.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Síntesis de nanopartículas de cobre

3.1.1 Obtención de biomasa, extracto acuoso y sobrenadante

Se obtuvo un promedio de 11.8 ± 2.5 g de la biomasa de *G. sessile* incubada por 7 días en las condiciones previamente descritas (Figura 9a). La biomasa se maceró con mortero de ágata (Figura 9b), y posterior a su filtrado se obtuvo un extracto acuoso ultrafiltrado con características transparentes con ligero color amarillo (Figura 10c).

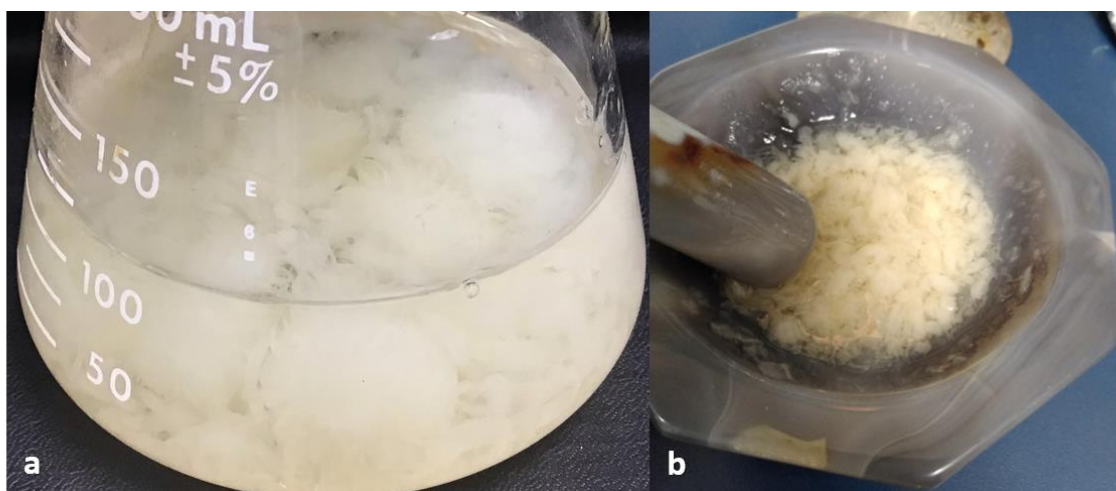


Figura 9. Características de la biomasa y extracto de *G. sessile*. a) Biomasa obtenida a los 7 días de incubación, b) Biomasa triturada con mortero de ágata.

En otro ensayo, se utilizó agua desionizada estéril que fue puesta en contacto por 24 h con la biomasa previamente lavada, después del periodo de incubación y ultrafiltración, se obtuvo el sobrenadante con metabolitos extracelulares cuya coloración fue amarillo claro como se muestra en la Figura 10c.

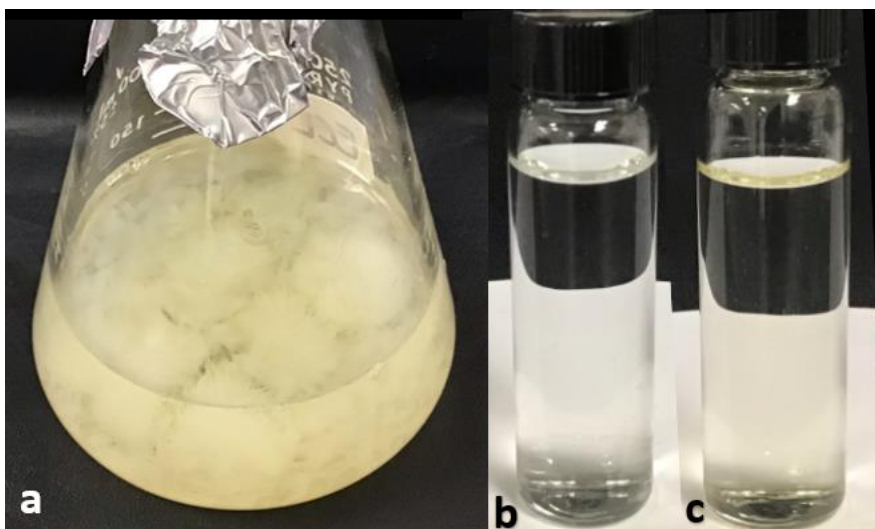


Figura 10. Características del sobrenadante y extracto acuoso. a) Biomasa de *G. sessile* suspendida en agua desionizada, con metabolitos excretados obtenido después de incubación, b) Sobrenadante con compuestos extracelulares, c) Extracto acuoso con componentes intracelulares.

3.1.2 Síntesis de nanopartículas de cobre

Las nanopartículas de cobre se sintetizaron utilizando la solución de CuSO_4 a 5 mM, en relación 1:3 (EA: CuSO_4). Así mismo, se obtuvieron nanopartículas de cobre utilizando el sobrenadante en una relación de 1:3 (SN: CuSO_4), y con la misma concentración de CuSO_4 . Ambas muestras se obtuvieron con un pH ajustado a 10 con la solución de NaOH a 10 mM, posterior a 96 h de incubación en oscuridad. La síntesis de nanopartículas de cobre se evidenció en las muestras posteriormente de ser incubadas a 60 °C por el viraje en el color, el cual dependía de la concentración de CuSO_4 , la relación utilizada (1:1, 1:2 o 1:3), la concentración de NaOH y de la temperatura a la que se incubaron. En las muestras con relación 1:1 y 1:2 no se observó viraje en el color (Tabla 5). En la muestra de CuONPs-EA ajustadas a un pH de 10 (utilizando NaOH a 10 mM) el color de la muestra cambió de transparente a azul claro, para el extracto acuoso. En ambas muestras de nanopartículas de cobre se visualizó un precipitado en los viales, de los respectivos colores mencionados. En la muestra de CuONPs-EA1260 ajustada a pH 12 (utilizando NaOH a 100 mM), e incubada a 60 °C el color viró de azul claro a amarillo a las 24 h de incubación.

En el caso de las preparaciones de sobrenadante con CuSO_4 a 5 mM, el ajuste de pH con NaOH (10 mM) ocasionó un viraje de color en las muestras con relación 1:2 y 1:3, de transparente a azul claro después de 24 h de incubación a 60 °C, como se muestra en la Figura 11a-11b. Posterior a 72 h de incubación, el color de la muestra con relación 1:3 viró a un azul más oscuro (Figura 11c), comparado con el viraje a las 24 h de incubación.

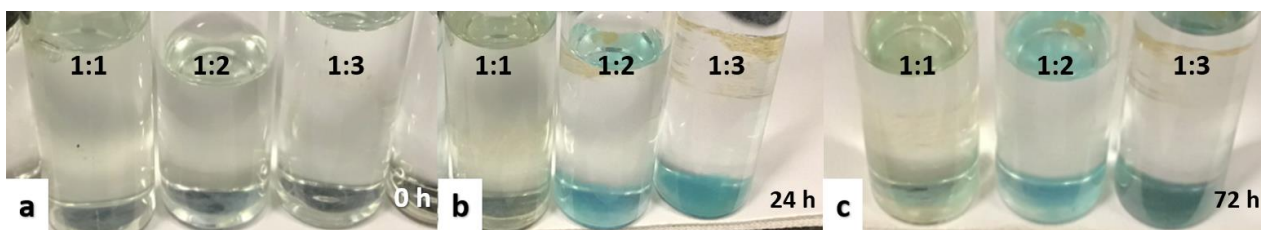


Figura 11. Viraje de color de las nanopartículas de cobre sintetizadas con sobrenadante a diferentes relaciones de síntesis a) Preparaciones de sobrenadante con sulfato de cobre a 5 mM en relación 1:1, 1:2 y 1:3 (de izquierda a derecha) a las 0 h sin ajustar pH, b) Preparaciones con pH ajustado a 10 a las 24 h de incubación, c) Preparaciones con pH ajustado a 10 a las 72 h de incubación.

Para corroborar el efecto de la temperatura en el viraje de color de las preparaciones de las nanopartículas, se realizaron dos preparaciones de extracto acuoso con CuSO_4 a 5 mM (relación 1:3). Al ajustar el pH a 10, ambas viraron de transparente a azul claro. Posteriormente, las preparaciones se colocaron en viales de vidrio, dejando uno a temperatura ambiente (22 °C), y otro se incubó a 60 °C. A las 24 h de incubación se observó el viraje de color del vial que fue expuesto a 60 °C, como se muestra en la Figura 12. Se realizó otro ensayo para determinar el efecto la temperatura en la síntesis de CuONPs, se utilizó sobrenadante con CuSO_4 a 5 mM (relación 1:3), ajustado a pH 12 con NaOH a 100 mM (Tabla 5).

Tabla 5. Factores de muestras evaluadas para la síntesis de CuONPs.

Muestra	EA/SN	[CuSO_4] mM	Relación (EA/SN: CuSO_4)	[NaOH] mM	pH	Incubación		Viraje	
						Tiempo (h)	Temp. (°C)	Sí/No	Color
M1	EA	1	1:1	-	3.52	96	60	No	-
M2	EA	1	1:2	-	3.45	96	60	No	-
M3	EA	1	1:3	-	3.37	96	60	No	-
M4	SN24	5	1:3	-	3.18	96	60	No	-
CuONPs-SN	SN24	5	1:3	10	10	96	60	Sí	Azul oscuro
CuONPs-SN48	SN48	5	1:3	10	10	96	60	Sí	Azul oscuro
CuONPs-SN72	SN72	5	1:3	10	10	96	60	Sí	Azul oscuro
CuONPs-SN12	SN24	5	1:3	100	12	96	60	Sí	Café oscuro
CuONPs-SN12TA	SN24	5	1:3	100	12	96	22	No	-
CuONPs-SN1230	SN24	5	1:3	100	12	96	30	Sí	Café claro
CuONPs-SN1237	SN24	5	1:3	100	12	96	37	Sí	Café
CuONPs-EA8	EA	5	1:3	100	8	96	60	Sí	Azul claro
CuONPs-EA	EA	5	1:3	10	10	96	60	Sí	Azul claro
CuONPs-EA12	EA	5	1:3	100	12	24	60	Sí	Amarillo
CuONPs-EA12TA	EA	5	1:3	100	12	24	22	Sí	Amarillo

EA: extracto acuoso, SN: sobrenadante, SN24: sobrenadante de 24 h, SN48: sobrenadante de 48h, SN72: sobrenadante de 72h.

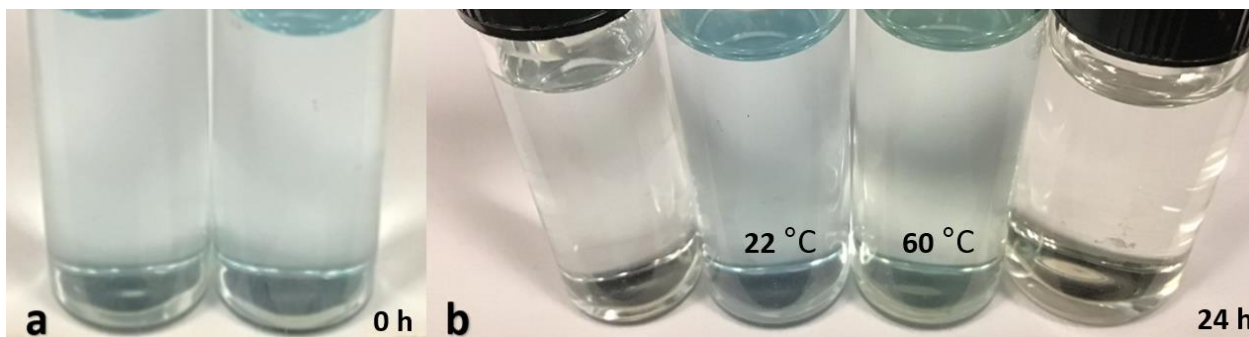


Figura 12. Viraje de color dependiente de temperatura. a) Preparaciones de extracto acuoso con sulfato de cobre a 5 mM con pH ajustado a 10 a las 0 h de incubación, b) Control de sulfato de cobre al 5 mM en el extremo izquierdo, en la parte central preparación conservada en temperatura ambiente (22 °C), a lado preparación incubada a 60 °C durante 24 h, y en el extremo derecho control de extracto acuoso de *G. sessile*.

Para determinar la concentración aproximada de cobre en las CuONPs sintetizadas, se calculó (la molaridad) el número de átomos de cobre en el volumen de CuSO_4 a 5 mM, colocado en cada vial. Así como, el volumen de NaOH añadido para el ajuste de pH.

3.2 Caracterización fisicoquímica de nanopátículas de cobre

3.2.1 Espectrofotometría de UV-vis

Se observó un pico de absorbancia en la longitud de onda de 300 nm (Figura 13), en la muestra de CuONPs sintetizadas con el extracto acuoso al momento de ajustar el pH con la solución de NaOH a 100 mM. La muestra de CuONPs sintetizada con el extracto acuoso, ajustada a un pH de 8 (CuONPs-EA8), a las 48 h de incubación en oscuridad a 60°C, mostró un pico de absorbancia a λ de 300 nm, como se observa en la Figura 14. La muestra de CuONPs sintetizada con el extracto acuoso, ajustada a un pH de 12 (CuONPs-EA12), mantuvo un pico de absorbancia entre las longitudes de onda de 290 y 310 nm 30 días después de la síntesis (Figura 15).

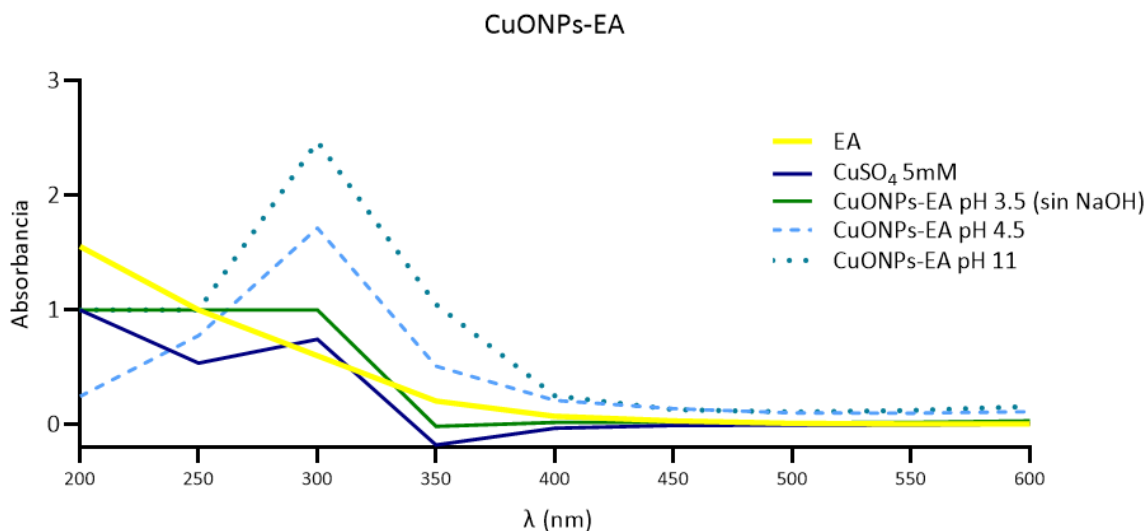


Figura 13. Espectro de absorción por UV-vis de las CuONPs sintetizadas con extracto acuoso (EA).

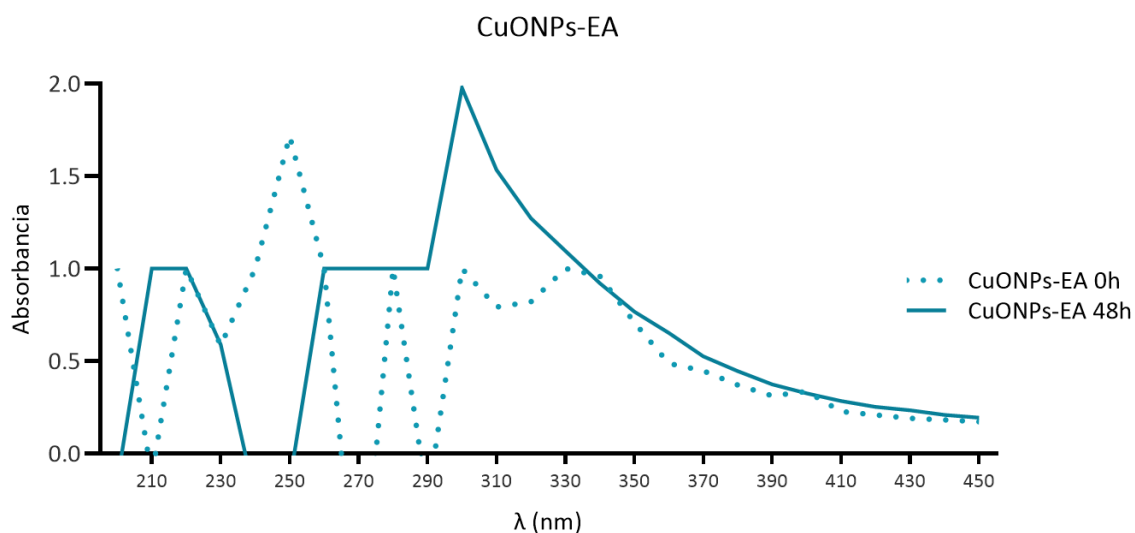


Figura 14. Espectro de absorción por UV-vis con de las CuONPs-EA, incubadas a 60°C a las 0 y 48 h.

La medición de la absorbancia de las CuONPs obtenidas con el sobrenadante, después de los 30 días de síntesis no mostraron la presencia de un pico en dicha longitud de onda, como se muestra en la Figura 16. En las muestras de CuONPs-SN ajustadas a un pH 10 utilizando NaOH a 10 mM, se observó un máximo de absorbancia en 290.73 nm, en el caso de las CuONPs-EA el pico máximo de absorbancia fue observado a 296.10 nm (Figura 17).

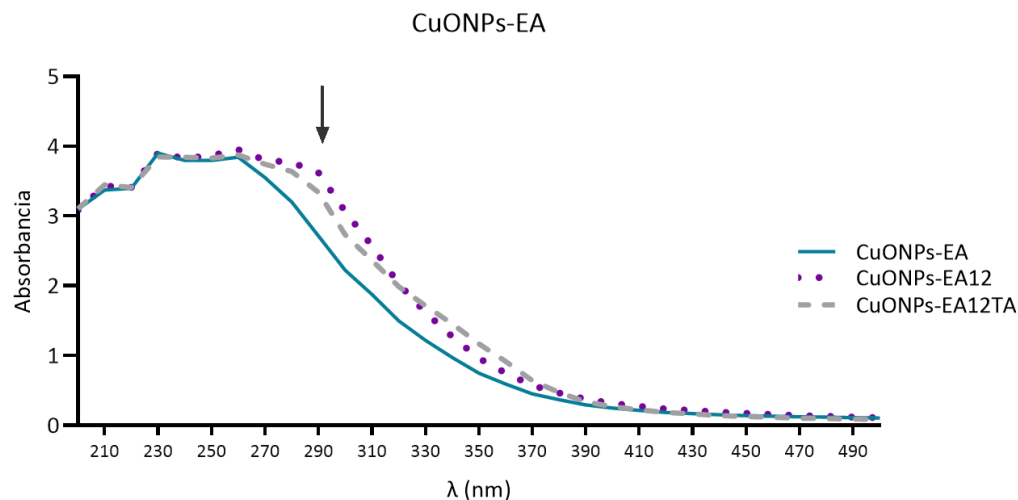


Figura 15. Análisis del espectro de absorción por espectroscopia UV-vis de las CuONPs-EA 30 días después de su síntesis. Las absorbancias de las muestras de CuONPs obtenidas con extracto acuoso (EA) a pH 10 y 12 incubadas a 60°C fueron comparadas con la muestra de las CuONPs obtenidas a temperatura ambiente después de 30 días de su síntesis. En la gráfica se muestra con una flecha negra, la persistencia de la banda de absorción a λ de 300 nm en la muestra de CuONPs-EA12 obtenidas con EA a pH 12.

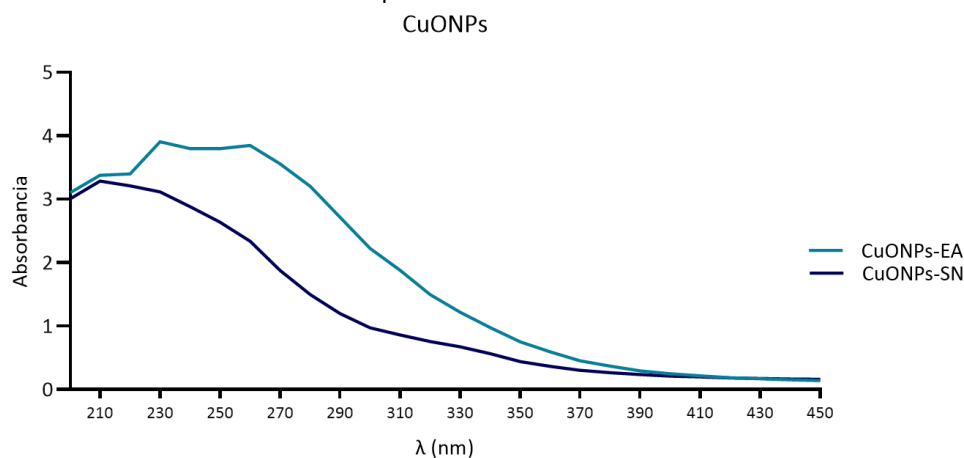


Figura 16. Análisis del espectro de absorción por UV-vis de las CuONPs pH10 EA y SN incubadas a 60°C 30 días después de su síntesis.

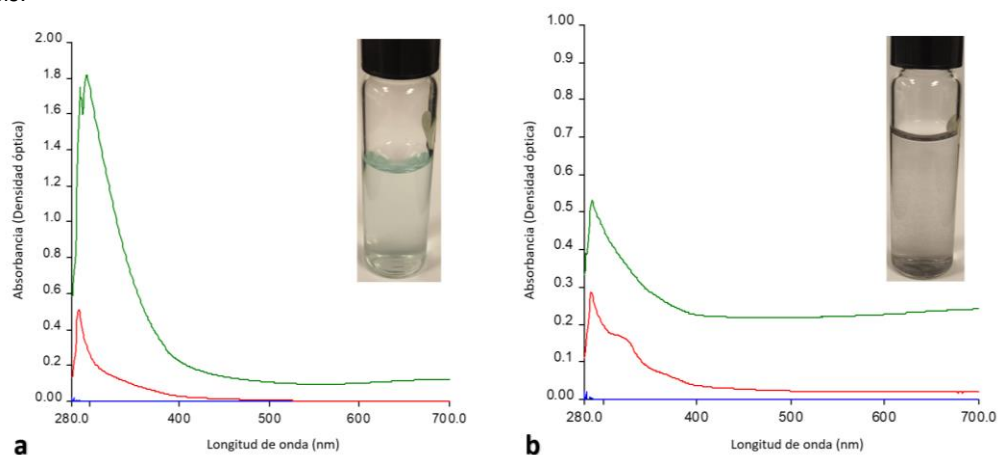


Figura 17. Gráfica de espectrofotometría UV-visible de nanopartículas de cobre sintetizadas con el extracto acuoso (a, CuONPs-EA) y sobrenadante (b, CuONPs-SN) *G. sessile*, ambas incubadas a 60 °C y con pH de 10. a) Gráfica con espectro de absorción de EA (rojo), y CuONPs-EA (verde) obtenidas con el EA de *G. sessile*, b) Gráfica con espectro de absorción de SN (rojo) y CuONPs-SN (verde).

3.2.2 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Se analizaron tres muestras de CuONPs obtenidas con EA y una muestra obtenida con SN de *G. sessile*. En la muestra de CuONPs sintetizadas con EA con pH 10 incubadas a 60 °C se obtuvo un diámetro hidrodinámico de 798.2 nm y un índice de polidispersidad (PDI por sus siglas en inglés) de 0.674, como se muestra en la tabla 6. En el caso de la muestra de CuONPs sintetizadas con el sobrenadante, bajo las mismas condiciones, se obtuvo un diámetro hidrodinámico de 1145 nm y un PDI de 0.619. Comparando ambas muestras incubadas bajo las mismas condiciones, ajustando el pH a 10 con NaOH a 10 mM, se observó un diámetro hidrodinámico menor a en la muestra de CuONPs obtenida con el EA, pero una mayor heterogeneidad que en la muestra de CuONPs obtenida con el SN.

En el caso de las muestras de CuONPs sintetizadas con EA, ajustadas a pH 12 con NaOH a una concentración de 100 mM, y expuestas a diferentes temperaturas 22 °C y 60 °C, se observó un PDI de 0.666 en la muestra incubada a 22 °C, y un diámetro hidrodinámico de 712.7 nm. Mientras que la muestra de CuONPs se obtuvo un radio hidrodinámico mayor (1473 nm) comparado con la muestra a 22 °C, y un PDI de 0.599.

De las cuatro muestras analizadas, la distribución de tamaño de las CuONPs fue más homodispersa en la muestra de CuONPs que fueron sintetizadas con el EA ajustadas a pH 12 incubadas a 22 °C. En la distribución de tamaño de las CuONPs-SN demostró dos grandes grupos de distribución de tamaño cercano a los 100 nm, como se muestra en la gráfica de la figura 18b. Mientras que en las CuONPs-EA solo se observó uno grupo predominante, también cercano a los 100 nm (Figura 18a).

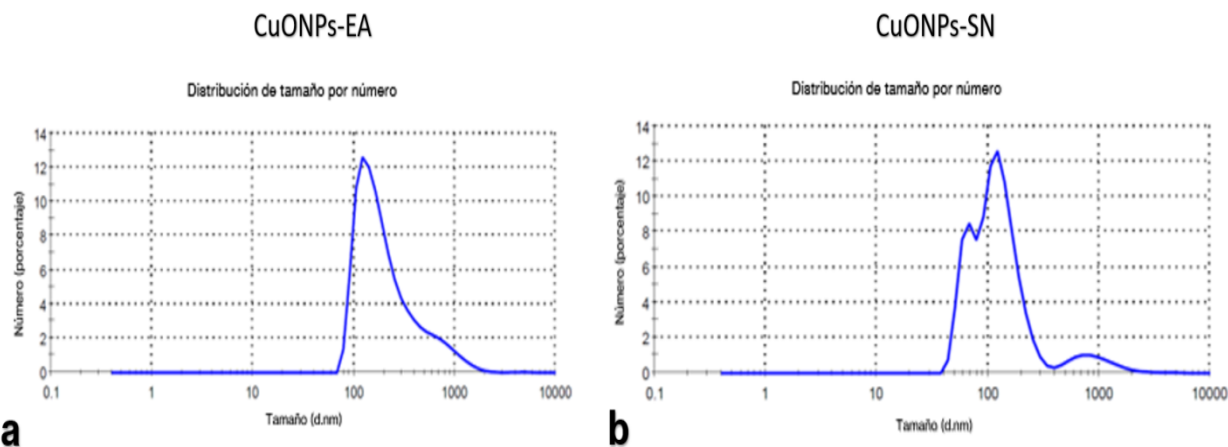


Figura 18. Distribución del radio hidrodinámico calculado mediante dispersión de luz dinámica de las CuONPs sintetizadas. a) CuONPs sintetizadas con extracto acuoso a pH 10, b) CuONPs sintetizadas con sobrenadante a pH 10.

Tabla 6. Resultados de análisis DLS y Potencial Zeta

CuONPs	Agente reductor (EA/SN)	Temperatura incubación (°C)	pH	Concentración NaOH (mM)	PDI*	Diámetro hidrodinámico promedio (nm)	Potencial Zeta (mV)
CuONPs-EA	EA	60	10	10	0.674	798.2	-24.8
CuONPs-EA12TA	EA	22	12	100	0.666	712.7	-24.8
CuONPs-EA12	EA	60	12	100	0.599	1473	-30.2
CuONPs-SN	SN	60	10	10	0.619	1145	-28.7

*Índice de polidispersidad (PDI por sus siglas en inglés)

3.2.3 Análisis del potencial zeta (ZP)

El potencial zeta se analizó en las mismas muestras cuyo radio hidrodinámico fue medido por DLS, como se resume en la tabla 6. En la muestra de CuONPs obtenida con el SN se obtuvo una potencial zeta (ZP) de -28.7 mV (Figura 19). Mientras que las muestras de CuONPs obtenidas con el EA, el ZP en las CuONPs con pH 12 incubadas a 60 °C, fue -30.2 mV comparadas con el PZ de las CuONPs con pH 10 el cual fue de -24.8 mV. Estos resultados demuestran una mejor estabilidad en las CuONPs ajustadas a pH 12 e incubadas por 24 h a 60 °C (Tabla 6).

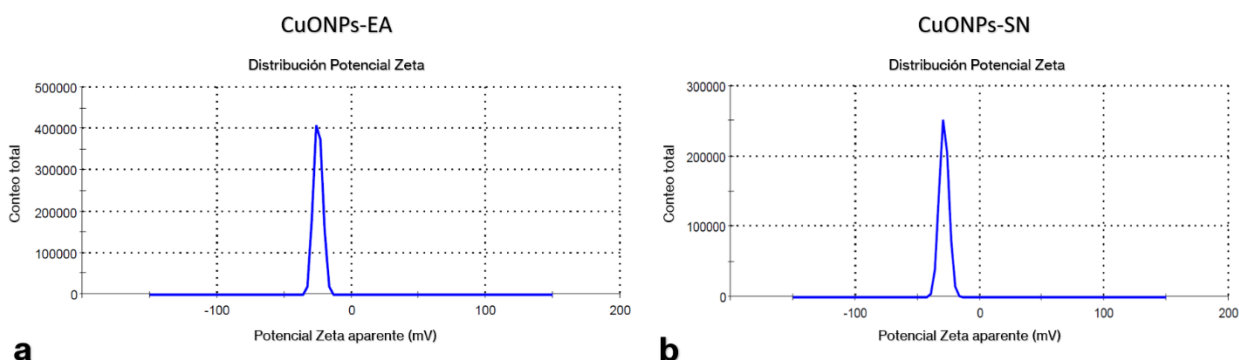


Figura 19. Distribución del potencial Zeta de las CuONPs. a) CuONPs sintetizadas utilizando el EA con pH ajustado a 10 y temperatura de incubación de 60 °C, b) CuONPs sintetizadas utilizando el SN con pH ajustado a 10 y temperatura de incubación de 60 °C.

3.2.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las CuONPs sintetizadas se visualizaron mediante TEM, bajo diferentes magnificaciones y se observaron nanopartículas de forma cuasiesférica para ambas muestras analizadas. Así mismo, en la muestra de nanopartículas sintetizadas con el extracto acuoso, se observó un halo que denota materia orgánica que

las rodea (Figura 20a), la cual no fue observada en las nanopartículas sintetizadas con sobrenadante (Figura 21a). El tamaño promedio de las nanopartículas de cobre sintetizadas con el extracto acuoso (CuONPs-EA), fue de 5.2 ± 2.1 nm, con una moda de 4 nm como se muestra en la Figura 20b. Mientras que el tamaño promedio para las nanopartículas de cobre con el sobrenadante (CuONPs-SN), fue de 4.5 ± 1.9 nm con una moda de 3 nm (Figura 21b). Las estimaciones se obtuvieron con el análisis de 1000 partículas para cada muestra, con el uso del software ImageJ.

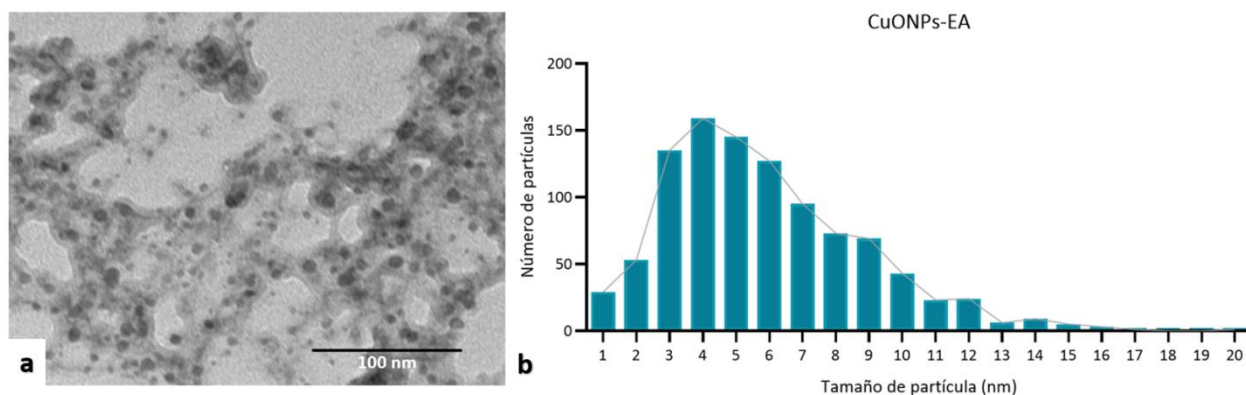


Figura 20. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión de la morfología y tamaño de las CuONPs sintetizadas con extracto acuoso (EA). a) Imagen tomada con magnificación 80 kx a 60 kV, barra de escala de 100 nm, b) Histograma de CuONPs-EA incubadas a 60 °C y con pH ajustado a 10.

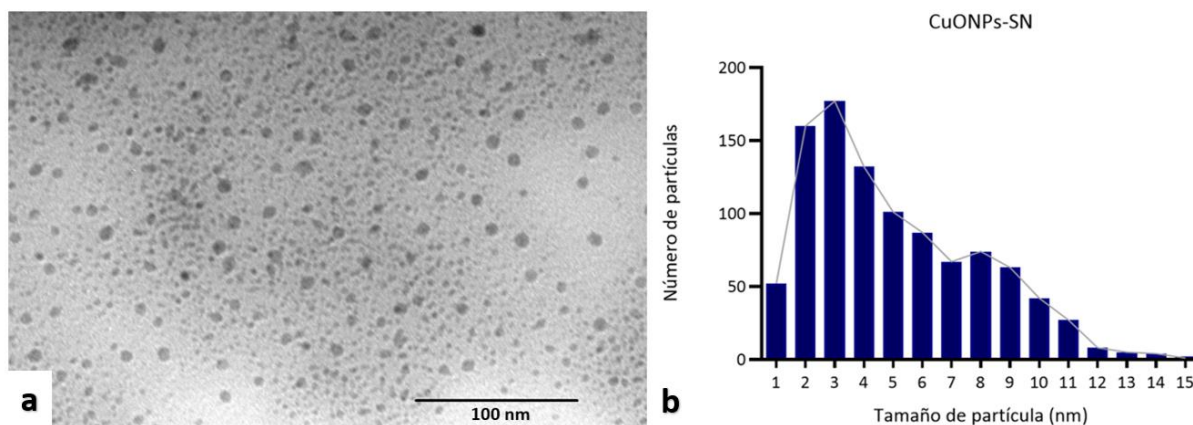


Figura 21. Caracterización por microscopia electrónica de transmisión de la morfología y tamaño de las CuONPs sintetizadas con sobrenadante (SN). a) Imagen tomada con magnificación de 80 kx a 70 kV, barra de escala de 100 nm, b) Histograma de CuONPs-SN incubadas a 60 °C y con pH ajustado a 10.

Para poder determinar la concentración molar de cobre presente en las nanopartículas sintetizadas, con los resultados y el análisis obtenido de TEM, primero se determinó el número promedio de átomos por nanopartícula, para las CuONPs-EA y CuONPs-SN. El número promedio de átomos por nanopartícula de cobre se obtuvo utilizando la fórmula propuesta por Kalishwaralal *et al.* (2010) y Liu *et al.* (2007),

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6M} N_A \quad (1)$$

donde N es el número de átomos por nanopartícula de cobre, π es 3.14, ρ es la densidad de la cara cúbica centrada (fcc) del cobre, D es el diámetro promedio de la nanopartícula, M es la masa atómica del cobre, y N_A es el número de Avogadro.

Una vez calculado el número promedio de átomos por nanopartícula, se calculó la concentración molar con la siguiente fórmula: (Kalishwaralal et al., 2010; X. Liu et al., 2007)

$$C = \frac{N_{TOTAL}}{NVN_A} N_A \quad (2)$$

donde C es la concentración molar, N_{TOTAL} es el número total de átomos agregados en CuSO_4 , y V es el volumen de la solución de reacción. Finalmente, se obtuvo una concentración molar de 96.37 nM/ μL para las CuONPs sintetizadas con extracto acuoso de *G. sessile*. Mientras que para las CuONPs sintetizadas con sobrenadante la concentración molar fue mayor, 148.7 nM/ μL (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración de cobre de las CuONPs sintetizadas.

NPs	Agente reductor (EA/SN)	Volumen de agente reductor(μL)	Volumen de CuSO_4 a 5 mM (μL)	Volumen de NaOH (μL)	Concentración NaOH (mM)	pH	Concentración de cobre ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Concentración molar (nM/ μL)
CuONPs-EA	EA	3000	1000	2928	10	10	0.1375	96.37
CuONPs-SN	SN	3000	1000	3166	10	10	0.1329	148.70

NPs: nanopartículas, EA: extracto acuoso, SN: sobrenadante.

3.3 Ensayos *in vitro*

3.3.1 Ensayo de inhibición y concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se realizaron curvas de crecimiento para cada cepa bacteriana, y se determinó el tiempo requerido para obtener una absorbancia de 0.08 a 0.13, a una λ de 625 nm (Figura 22). Después, se ajustó la muestra con medio líquido MH estéril, utilizando la referencia del 0.5 de la escala de McFarland, hasta llevarla a la turbidez deseada. Lo anterior se corroboró con un conteo de las UFC en placa, con medio LB agar, para

finalmente obtener una concentración cercana a 5×10^5 UFC/mL. Una vez obtenida la concentración deseada, se tomó la muestra ajustada y se colocó en cajas Petri de 100 mm x 15 mm rellenas con medio MH sólido, como se describió anteriormente. Posteriormente, se molificó el medio MH agar y se colocaron los discos impregnados con 10 μ L de CuONPs sintetizadas con SN y EA. Se realizó el mismo procedimiento que el método de difusión en disco, y se realizaron pozos de 10 mm, en cajas Petri de 150 mm x 15 mm con medio MH agar, en cada pozo se colocó 50 μ L de CuONPs-EA y SN (Figura 23a). Como controles se utilizó agua destilada, CuSO_4 a 5mM, EA y SN, como se muestra en la Figura 23. Después de incubar las muestras durante 24 h, no se obtuvo un halo inhibitorio en los discos impregnados con 13.29 μ g/mL de CuONPs sintetizadas con sobrenadante, ni en los discos impregnados con 13.75 μ g/mL de CuONPs sintetizadas con extracto acuoso (Figura 24b y 24c). De la misma manera no se produjo halo de inhibición en los pozos con 68.75 μ g/mL de CuONPs-EA ni 66.45 μ g/mL de CuONPs-SN (Figura 23a).

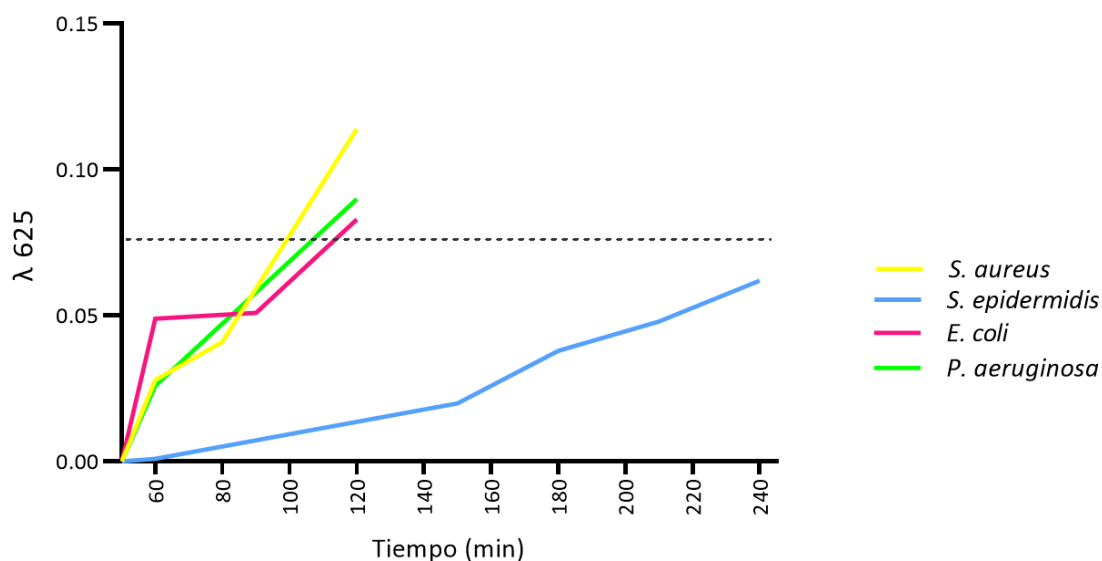


Figura 22. Crecimiento de cepas bacterianas para ensayos de inhibición.

En los ensayos para la determinación de la CMI, se utilizó el mismo inóculo estandarizado descrito anteriormente. Se observó inhibición en el crecimiento de ambas bacterias Gram negativas, con una concentración mínima de inhibición de 192.5 μ g/mL de CuONPs-EA y 186 μ g/mL de CuONPs-SN para *E. coli*, y una concentración mínima de inhibición de 165 μ g/mL de CuONPs-EA y 159.5 μ g/mL de CuONPs-SN para *P. aeruginosa* (Tabla 8). En el caso de las bacterias Gram positivas, se observó inhibición en el crecimiento de *S. aureus*, con una concentración mínima inhibitoria de 165 μ g/mL en las CuONPs-EA, y 159.5 μ g/mL en las CuONPs-SN. Mientras que en *S. epidermidis* no se observó inhibición del crecimiento

en las concentraciones máximas evaluadas de 275 µg/mL para las CuONPs-EA y de 265.8 µg/mL para las CuONPs-SN.

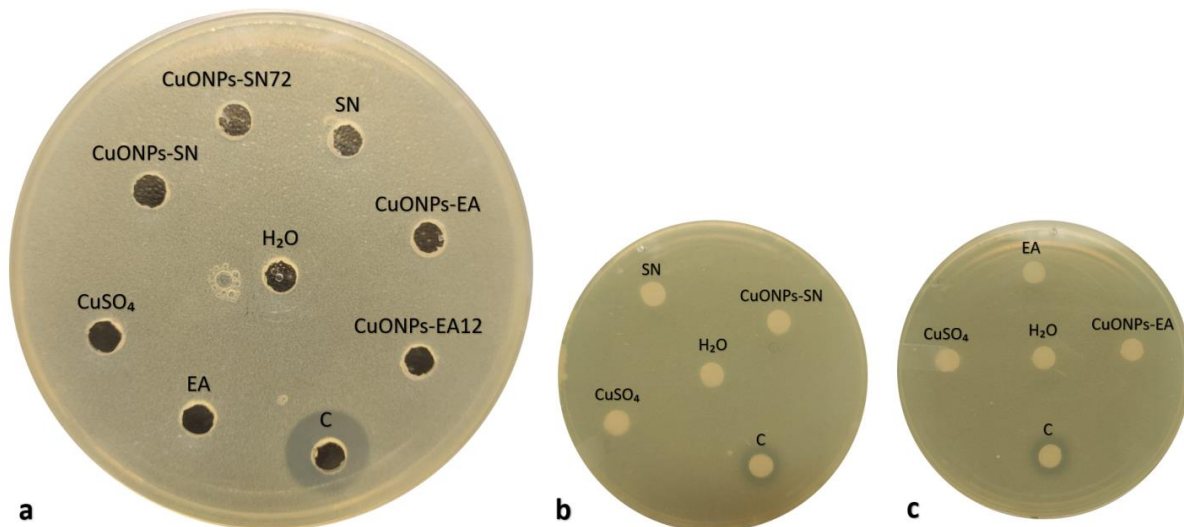


Figura 23. Ensayo del método de difusión en pozo y de difusión en disco con *S. epidermidis*. a) Ensayo del método de difusión en pozo contra *S. epidermidis*, b) Ensayo del método de difusión en disco de CuONPs-SN contra *S. epidermidis*, c) Ensayo del método de difusión en disco de CuONPs-EA contra *S. epidermidis*. Como control (C) se utilizó ciprofloxacino a una concentración de 0.01 mg, y CuSO₄ a 5 mM.

Después de identificar las CMI, se tomaron 5 µL de cada pozo con evidencia de inhibición del crecimiento bacteriano, y se esparcieron en placas Petri con LB agar, y se incubaron a 37 °C por 48 h. Después de 24 y 48 h de incubación no se observó la presencia de UFC en las placas inoculadas.

En la cepa donde no se identificó la CMI, se realizó conteo de UFC para determinar si existió disminución en el crecimiento bacteriano (Figura 24). Para el conteo de UFC se utilizó la siguiente fórmula: (Pollack et al., 2009; Prescott, 2002)

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Número de colonias en placa de dilución} \times 10}{\text{Factor de dilución de colonias en placa}} \quad (3)$$

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de CuONPs

CMI (µg/mL)				
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
CuONPs-EA	192.5	165	165	-
CuONPs-SN	186	159.5	159.5	-

CMI: concentración mínima inhibitoria

Para cada cepa bacteriana, se calculó el estimado de la biomasa producida durante el tiempo de incubación ante la exposición con CuONPs-EA y CuONPs-SN (Figura 25). Los resultados se analizaron utilizando ANOVA de 1 vía, R cuadrada, y se normalizaron los datos mediante el uso del software GraphPad Prism 9.3.0.

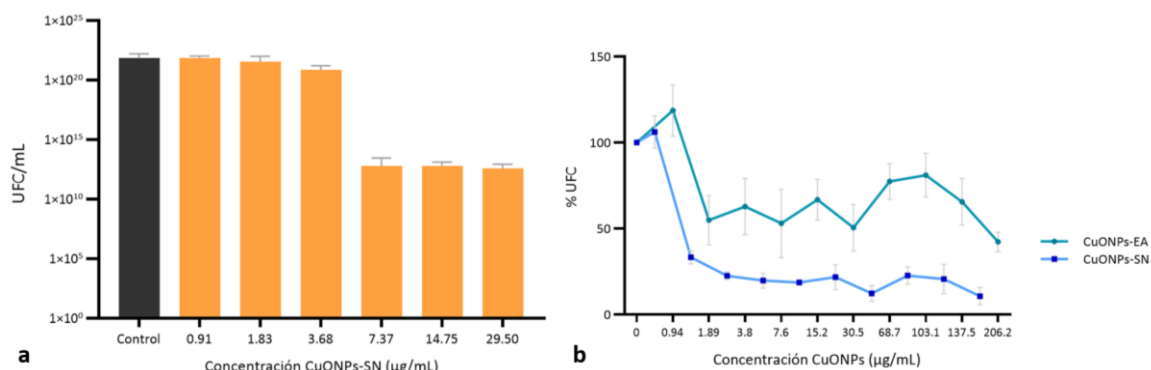


Figura 24. Crecimiento de *S. epidermidis* expuesta a CuONPs. a) UFC cuantificadas después de 24 h de exposición a diferentes concentraciones de CuONPs-SN. b) Porcentaje de UFC de *S. epidermidis* expuesta durante 24 h a CuONPs-EA y CuONPs-SN. UFC: Unidades formadoras de colonias.

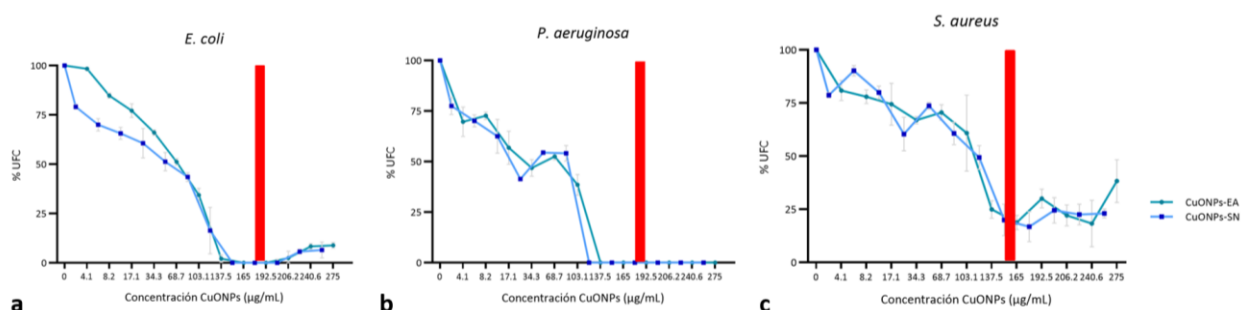


Figura 25. Porcentaje de crecimiento bacteriano en cepas bacterianas expuestas a CuONPs. a) Porcentaje de UFC calculado para *S. aureus*, b) Porcentaje de biomasa calculado para *P. aeruginosa*, c) Porcentaje de biomasa calculado para *E. coli*. La franja roja marca la concentración mínima para la inhibición del crecimiento.

3.3.2 Ensayo de viabilidad celular

Para determinar la toxicidad de las nanopartículas de cobre, se calculó el porcentaje de viabilidad celular en tres líneas celulares de mamíferos; riñón canino (MDCK), macrófagos murinos (RAW 264.7) y hepatocitos murinos (AML-12). Se utilizaron diferentes concentraciones de la solución con CuONPs sintetizadas con extracto acuoso y el sobrenadante de *G. sessile*. En el ensayo realizado con las células de riñón (MDCK), se observó excelente viabilidad celular en concentraciones entre los 0.94 µg/mL a 15.26 µg/mL de CuONPs sintetizadas con extracto acuoso ajustadas a pH 10, mientras que con una concentración de 30.52 µg/mL el porcentaje de viabilidad descendió más de 40 % (Figura 26). En el caso de las CuONPs

sintetizadas con el sobrenadante a concentraciones bajas entre 0.91 y 7.37 $\mu\text{g/mL}$ se observó un incremento del porcentaje en la viabilidad celular, comparado con el control sin tratamiento (Figura 27). A concentraciones de 14.75 y 29.50 $\mu\text{g/mL}$, la viabilidad celular de las células de riñón fue casi nula.

Tabla 9. Resultados de viabilidad en cultivos celulares tratados con CuONPs, EA y SN.

Muestra	Volumen (μL)	$(\mu\text{g/mL})$	$(\text{nM}/\mu\text{L})$	Líneas celulares (Porcentaje de Viabilidad)		
				MDCK (%)	RAW-264.7 (%)	AML-12 (%)
EA	0.68	-	-	98 ± 17.71	121 ± 12.25	118 ± 6.98
	22.2	-	-	105 ± 22.15	131 ± 9.9	128 ± 13.32
CuONPs-EA	0.68	0.94	0.66	104 ± 0.84	110 ± 6.09	136 ± 12.08
	22.2	30.52	21.39	59 ± 11.77	14 ± 3.03	18 ± 5.7
SN	0.68	-	-	103 ± 10.41	104 ± 3.21	81 ± 14.02
	22.2	-	-	97	102 ± 4.27	71 ± 11.03
CuONPs-SN	0.68	0.91	1.02	126 ± 7.68	79 ± 11.04	82 ± 4.7
	22.2	29.5	33.01	2 ± 0.82	0	8 ± 0.99

EA: extracto acuoso, SN: sobrenadante, nM: nanomolar.

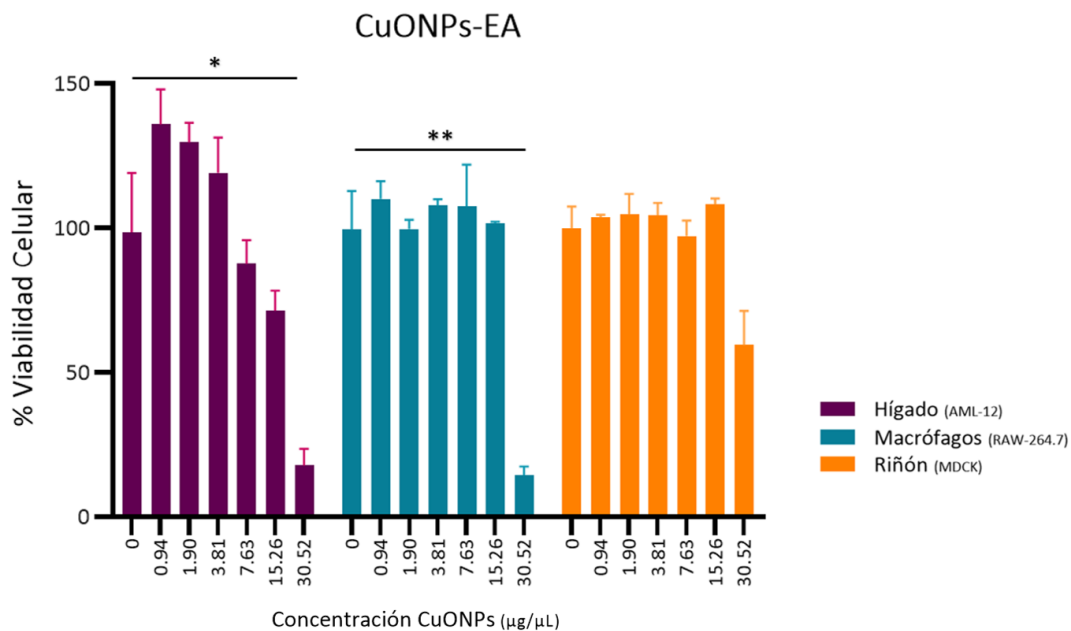


Figura 26. Porcentaje de viabilidad de células tratadas con CuONPs-EA. La gráfica muestra el porcentaje de viabilidad en células hepáticas (AML-12), macrófagos (RAW-264.7), y células de riñón (MDCK), utilizando diferentes concentraciones de CuONPs sintetizadas con extracto acuoso (EA). La gráfica representa el porcentaje promedio de tres experimentos independientes * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Como se puede observar en la Figura 26, la viabilidad celular de los hepatocitos tratados con concentraciones mayores a 7 $\mu\text{g/mL}$ de CuONPs-EA, fue de 80 %, mientras que la exposición de los hepatocitos a concentraciones de CuONPs- EA de 30.52 $\mu\text{g/mL}$ ocasionó una viabilidad del 20 % lo cual es

considerado como un efecto claramente citotóxico. Mientras que los hepatocitos tratados con las diferentes concentraciones de CuONPs-SN, se observó una disminución en la viabilidad celular aproximada un 20 % en concentraciones bajas (0.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$), como se muestra en la Figura 27 la viabilidad se fue reduciendo de manera proporcional al incremento de la concentración de CuONPs.

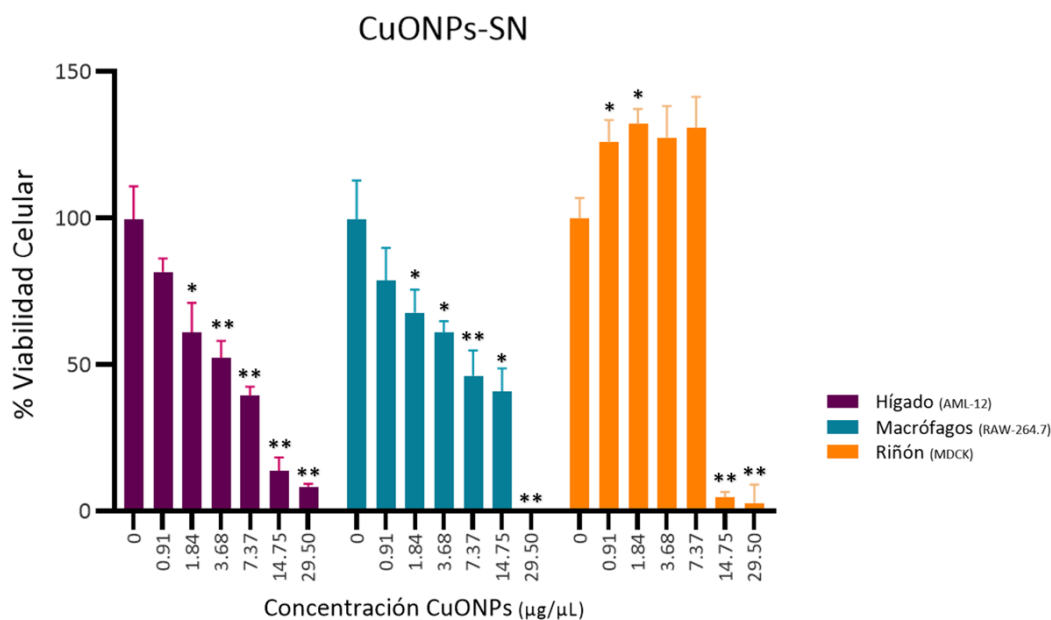


Figura 27. Porcentaje de viabilidad de células tratadas con CuONPs-SN. La gráfica muestra el porcentaje de viabilidad en células hepáticas (AML-12), macrófagos (RAW-264.7), y células de riñón (MDCK), utilizando diferentes concentraciones de CuONPs sintetizadas con sobrenadante (SN). La gráfica representa el porcentaje promedio de tres experimentos independientes *P < 0.05, **P < 0.01.

Los macrófagos, tratados con las concentraciones de 0.94 a 15.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CuONPs-EA no indujeron ningún cambio en la viabilidad celular, sin embargo, la concentración de 30.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CuONPs-EA ocasiono un descenso significativo en la viabilidad celular siendo ésta del 14 % (Tabla 9). Mientras que en los macrófagos tratados con CuONPs-SN, se observó una disminución de la viabilidad de manera proporcional al incremento de la concentración de las CuONPs-SN, siendo la concentración de 1.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la primera en la que la viabilidad celular se modifica ligeramente siendo ésta del 80 % (Figura 27).

De manera comparativa, se observó que para las 3 líneas celulares evaluadas las concentraciones de CuONPs-SN tuvieron un impacto negativo mayor en la viabilidad celular de los cultivos con tratamiento (Figura 28-30). También se observó que las concentraciones de CuONPs-EA de 12 nM/ μL , no afectó la

viabilidad celular de los macrófagos y las células de riñón (Figura 29 y 30). Sin embargo, esa misma concentración disminuye más del 25 % la viabilidad de los hepatocitos (Figura 28 y 31).

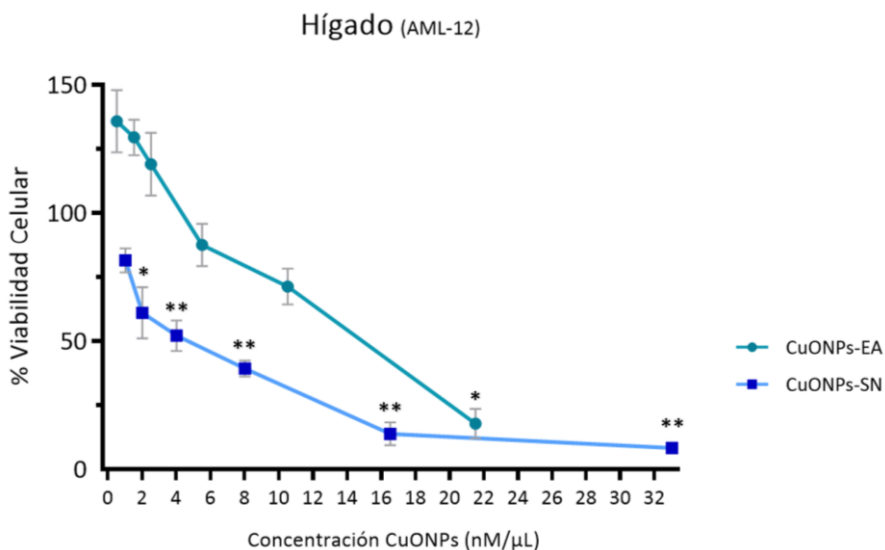


Figura 28. Viabilidad de células hepáticas tratadas con CuONPs. Gráfica comparativa de la viabilidad celular obtenida de las células de hígado (AML-12) tratadas con CuONPs-EA y CuONPs-SN. *P < 0.05, **P < 0.01.

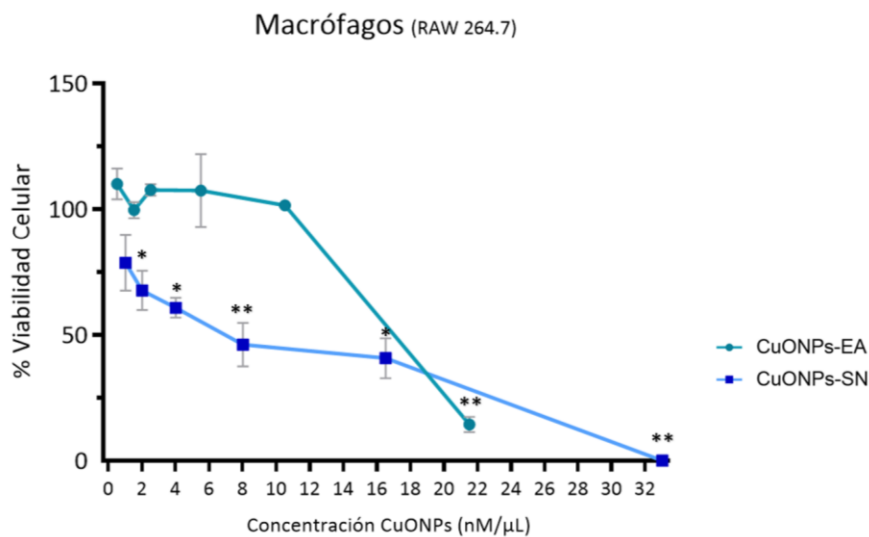


Figura 29. Viabilidad celular de macrófagos tratados con CuONPs. Gráfica comparativa de la viabilidad celular obtenida de macrófagos (RAW 264.7) tratadas con CuONPs-EA y CuONPs-SN. *P < 0.05, **P < 0.01.

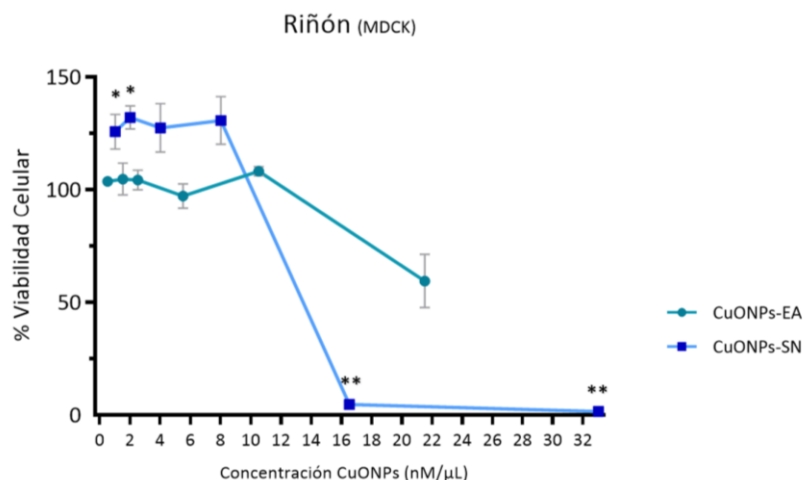


Figura 30. Viabilidad de células MDCK tratadas con CuONPs. Gráfica comparativa de la viabilidad celular obtenida de células de riñón (MDCK) tratadas con CuONPs-EA y CuONPs-SN. *P < 0.05, **P < 0.01.

Para evaluar si el efecto citotóxico observado en las líneas celulares expuestas a las CuONPs-EA y CuONPs-SN se debía meramente a las nanopartículas y no al extracto acuoso (EA) o el sobrenadante (SN) de *G. sessile*, se decidió comparar la viabilidad de los hepatocitos, macrófagos y células de riñón en presencia de diferentes volúmenes de EA y SN, así como de las nanopartículas sintetizadas a partir de ellos, CuONPs-EA y CuONPs-SN como se puede observar en las Figuras 31-33. En los hepatocitos tratados con el extracto acuoso (EA) de *G. sessile*, se observó un incremento en la viabilidad celular, comparada con el control sin tratamiento. Por otro lado, en los hepatocitos tratados con el sobre nadante (SN) si se observó una disminución de la viabilidad con respecto del control, como se muestra en la Figura 31.

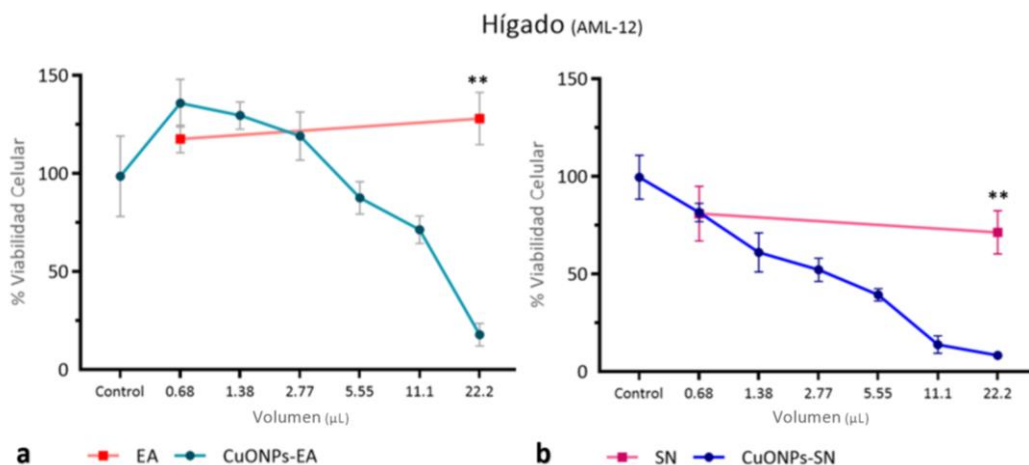


Figura 31. Comparación de la viabilidad celular de hepatocitos tratados con CuONPs, EA y SN. a) Gráfica comparativa del porcentaje de viabilidad celular de hepatocitos expuestos a extracto acuoso (EA) y los hepatocitos expuestos a CuONPs sintetizadas con el EA (CuONPs-EA), b) Gráfica comparativa del porcentaje de viabilidad celular de hepatocitos expuestos a sobrenadante (SN), y los hepatocitos expuestos a CuONPs sintetizadas con el SN (CuONPs-SN). La gráfica denota el porcentaje promedio de tres experimentos independientes. *P < 0.05, **P < 0.01.

En los macrófagos tratados con el extracto acuoso (EA) se observó un incremento de la viabilidad celular dependiente de la concentración. Mientras que, en los cultivos de macrófagos, las células tratadas con sobrenadante (SN) de *G. sessile* no mostraron disminución de la viabilidad hasta volúmenes de 22.2 μL (Figura 32).

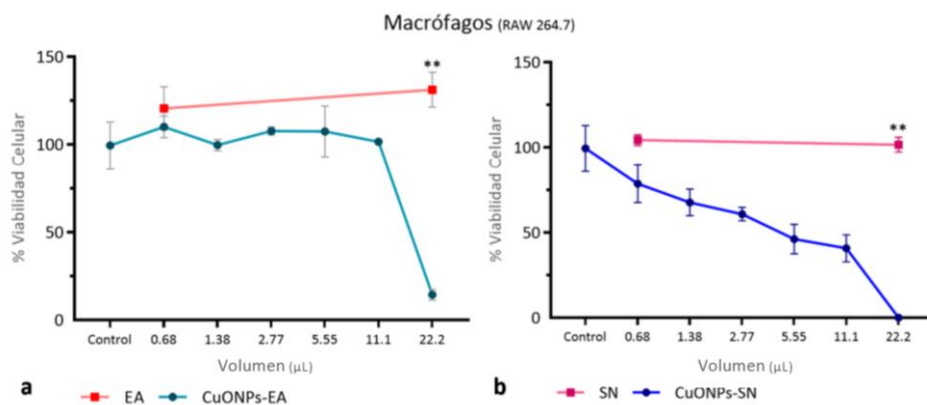


Figura 32. Comparación de la viabilidad celular de macrófagos tratados con CuONPs, SN y EA. a) Gráfica comparativa del porcentaje de viabilidad celular de macrófagos expuestos a extracto acuoso (EA) y los macrófagos expuestos a CuONPs sintetizadas con el EA (CuONPs-EA), b) Gráfica comparativa del porcentaje de viabilidad celular de macrófagos expuestos a sobrenadante (SN), y los macrófagos expuestos a CuONPs sintetizadas con el SN (CuONPs-SN). La gráfica denota el porcentaje promedio de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

En los cultivos con células de riñón, la viabilidad celular se mantuvo muy cercano a la del control (sin tratamiento), tanto para las células expuestas al extracto acuoso (EA) como el sobrenadante (SN) de *G. sessile* como se observa en la Figura 33.

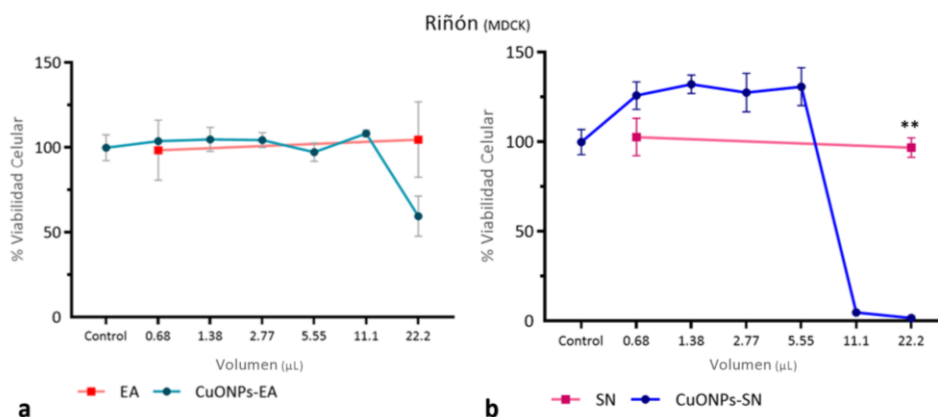


Figura 33. Comparación de la Viabilidad de células de riñón tratada con CuONPs, SN y EA. a) Gráfica comparativa del porcentaje de viabilidad celular de células renales expuestas a extracto acuoso (EA) y las células renales expuestas a CuONPs sintetizadas con el EA (CuONPs-EA), b) Gráfica comparativa del porcentaje de viabilidad celular de células

renales expuestas a sobrenadante (SN), y las células renales expuestas a CuONPs sintetizadas con el SN (CuONPs-SN). La gráfica denota el porcentaje promedio de tres experimentos independientes. *P <0.05, **P <0.01.

Finalmente, en la tabla 10 se resumen las características fisicoquímicas de las CuONPs-EA y CuONPs-SN, con las cuales se evaluó la toxicidad en las líneas celulares de hígado y macrófagos murinos, y riñón canino. Así como los resultados del efecto antibacteriano contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* y *S. aureus*.

Tabla 10. Características fisicoquímicas, toxicidad y efecto antimicrobiano de las CuONPs sintetizadas con *G. sessile*.

NPs	Características fisicoquímicas					Toxicidad			Propiedad antibacteriana						
	TEM			PDI	PZ (mV)	Líneas celulares			Bacterias (µg/ml)						
	Tamaño (nm)	DE (nm)	Forma			AML-12	RAW-264.7	MDCK	EC		PA		SE	SA	
						DL50 µg/mL	DL50 µg/mL	DL50 µg/mL	CMI	IC50	CMI	IC50		CMI	IC50
CuONP s-EA	5.2	2.1	Casi esférica	0.674	-24.8	17.86	27	69.53	192.5	85.57	165	34.01	--	165	102.3
CuONP s-SN	4.5	1.9	Casi esférica	0.619	-28.7	3.37	6.77	9.37	186	80.84	159.5	41.92	-	159.5	188.4

NPs: Nanopartículas, PDI: Índice de polidispersidad, PZ: potencial zeta, CMI: concentración mínima inhibitoria, TEM: Microscopía electrónica de transmisión, EC: *Escherichia coli*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, SE: *Staphylococcus epidermidis*, SA: *Staphylococcus aureus*.

Capítulo 4. Discusión

La síntesis biológica de nanopartículas metálicas, también llamada biosíntesis o síntesis verde, considerado como un método eficiente y menos tóxico con el ambiente (Azizi et al., 2014; Sharma et al., 2019). Para llevar a cabo la biosíntesis de nanopartículas, se han utilizado múltiples metales como el oro, la plata, el zinc, el cobre, el silicio y, el hierro, entre otros. El principal interés del uso de las nanopartículas metálicas se debe a sus propiedades, dentro de las cuales destacan las catalíticas, ópticas y las biológicas (Mali et al., 2020; Maruthupandy et al., 2017; Sivaraj et al., 2014). Para la biosíntesis de nanopartículas de cobre (CuNPs) y nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), se ha descrito el uso de acetato de cobre, sulfato de cobre (CuSO_4), nitrato de cobre y cloruro de cobre (Akintelu et al., 2020; Consolo et al., 2020; Joshi et al., 2019; Rajeshkumar et al., 2019; Ullah et al., 2019). La elección del metal precursor puede modificar las características fisicoquímicas de la nanopartícula metálica, así como las propiedades de las mismas. En estudios previos donde se sintetizaron CuONPs utilizando hongos (micosíntesis), se reportó el uso de CuSO_4 como sal precursora, obteniendo la síntesis de CuONPs con propiedades antimicrobianas, antidiabéticas, anticancerígenas y antioxidantes (El-Batal et al., 2018; Honary et al., 2012; Noor et al., 2020).

Múltiples estudios han reportado el ajuste del pH en la biosíntesis de CuONPs, utilizando CuSO_4 como agente precursor (Consolo et al., 2020; Honary et al., 2012; Noor et al., 2020; Oza et al., 2020). Por ejemplo, Noor y colaboradores (2020), reportaron el ajuste del pH de la mezcla del extracto del hongo *Aspergillus niger* con CuSO_4 , utilizando ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH). Al realizar el ajuste de pH a 5, 7 y 8, observaron que la síntesis de CuONPs se logró sólo bajo el pH de 7. En la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs), con el extracto acuoso de *G. sessile*, no fue requerido un ajuste del pH, como lo reportó Mazón-Martínez en el 2020. Sin embargo, para la síntesis de CuONPs utilizando el extracto acuoso y el sobrenadante de *G. sessile*, fue necesario realizar un ajuste de pH a 8, 10 ó 12, utilizando NaOH. La necesidad de ajustar el pH, puede deberse a la actividad disminuida de biomoléculas reductoras debido a la acidez de la suspensión, el pH ácido puede ser proporcionado por la sal precursora y/o el extracto con los que se realiza la síntesis. El pH de la solución de CuSO_4 a 5 mM fue de 3.72, mientras que el pH de la mezcla del extracto acuoso de *G. sessile* con CuSO_4 , y el sobrenadante de *G. sessile* con CuSO_4 fueron de 3.37 y 3.18 respectivamente (relación 1:3 y sin agregar NaOH). En el 2020, Oza y colaboradores sintetizaron CuONPs, mediante síntesis verde utilizando el extracto de hojas y flores de *Galphimia glauca*, los autores observaron que el pH más favorable para la síntesis de CuONPs era de 12. Mientras que a pH bajos reportaron que la actividad de los grupos carboxilo presentes en el extracto de

G. glauca disminuía; de tal forma que con un pH de 2 obtuvieron CuONPs esféricas de mayor tamaño (50-60 nm) con mayor tendencia a la aglomeración (Oza et al., 2020).

Mediante espectrofotometría en el rango de la luz UV-visible, se encontró una absorbancia máxima en la λ de 296.10 nm con las CuONPs utilizando el extracto acuoso (EA) y a una λ de 290.73 nm utilizando el sobrenadante (SN) de *G. sessile*. En un estudio realizado por Maruthupandy y colaboradores (2017), identificaron el pico de absorbancia máximo en 290 nm utilizando el extracto de hojas de *Camellia japonica*.

En relación a los tamaños de las CuONPs obtenidos por TEM, se encontró que difieren de manera considerable de los diámetros hidrodinámicos obtenidos con DLS, lo cual puede deberse a la adhesión de componentes (moléculas, proteínas), presentes en los extractos utilizados de *G. sessile*.

Algunos de los mecanismos propuestos del efecto antibacteriano son mediante la interacción y disrupción de la membrana celular bacteriana, lo que permite la pérdida del contenido citoplasmático (Ameh y Sayes, 2019). La actividad antibacteriana de las CuONPs se determinó mediante el ensayo de inhibición de crecimiento bacteriano, la concentración mínima inhibitoria (CMI), obtuvo con la concentración de 165 $\mu\text{g/mL}$ para *P. aeruginosa* y *S. aureus*. En el caso de *E. coli* fue de 192.5 $\mu\text{g/mL}$, esta concentración está dentro del intervalo reportado por Ruparelia y colaboradores en 2008, cuando determinaron la CMI para diferentes cepas de *E. coli*, y encontraron concentraciones en un rango de 140 a 280 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Las CMI de las CuONPs-SN, fueron de 186 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli*, 159.5 $\mu\text{g/mL}$ para *P. aeruginosa* y *S. aureus*. En el caso, de *S. epidermidis* no se encontró una CMI, pero al compararse con el control sin tratamiento, se observó que a concentraciones de 17 $\mu\text{g/mL}$, disminuyeron las UFC. Existen reportes donde, las CuNPs no presentan efecto antibacteriano a concentraciones menores de 200 $\mu\text{g/mL}$ con algunas bacterias Gram negativo, como *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Erci et al., 2020).

La toxicidad celular producida por las nanopartículas metálicas está bien documentada (Bondarenko et al., 2013; Henson et al., 2019; Pohanka, 2019; Yu et al., 2020). Los mecanismos específicos de dicha toxicidad aún no se encuentran descritos por completo. Existen diferentes teorías del efecto tóxico en las células animales, una de ellas se basa en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como uno de los factores determinantes de la muerte celular (Oza et al., 2020). De esta manera en el área biomédica, las nanopartículas metálicas pueden actuar como un agente terapéutico o bien que esta propiedad tóxica sea considerada como un efecto no deseado. Por ejemplo, en las células cancerígenas es de interés observar

este efecto tóxico, para poder limitar y controlar cánceres con alta letalidad. En el 2020, Noor y colaboradores, sintetizaron CuNPs utilizando el sobrenadante libre de biomasa de *A. niger*. En este estudio, se observó que a concentraciones de 10 µg/mL las CuNPs tenían un efecto citotóxico del 50 % en células de cáncer de hígado. En algunas de las aplicaciones biomédicas de las CuNPs, así como otras nanopartículas metálicas, es necesario enfocarse en minimizar la toxicidad. Por ejemplo, las CuNPs pueden ser embebidas en materiales para uso médico, proporcionando el efecto antibacteriano únicamente al contacto con la superficie, pero sin generar toxicidad en aquellas personas que lo manipulan (Humphreys, 2014; Mitra et al., 2020).

Es importante identificar el grado de toxicidad que puede producir las CuONPs, independientemente del método de síntesis con el que fueron obtenidas. Determinar las concentraciones tóxicas de las CuONPs, permitirá conocer las concentraciones seguras para futuras aplicaciones en el área biomédica. Las CuONPs sintetizadas con el extracto acuoso (EA) o los compuestos intracelulares de *G. sessile*, demostraron ser menos tóxicas que las CuONPs sintetizadas con el sobrenadante (SN) o los metabolitos extracelulares. Lo anterior, permitirá dirigir la aplicación adecuada de cada una de ellas.

Capítulo 5. Conclusión

Se obtuvieron de manera exitosa CuONPs, utilizando los componentes intracelulares (extracto acuoso) y los metabolitos extracelulares (sobrenadante) del hongo filamentoso *G. sessile*. La propiedad antibacteriana identificada contra bacterias patógenas para humanos, las convierte en una posible alternativa eco-amigable para el manejo de enfermedades infecciosas. Los resultados de viabilidad celular indican que concentraciones bajas ($<15 \mu\text{g/mL}$) de CuONPs sintetizadas con extracto acuoso no son tóxicas para células de riñón y ni para macrófagos. Mientras que las CuONPs sintetizadas con el sobrenadante, en concentraciones de 0.91 hasta $7.37 \mu\text{g/mL}$, no disminuyeron la viabilidad de las células de riñón. Lo anterior demuestra una biocompatibilidad de las CuONPs sintetizadas con el hongo *G. sessile*, a bajas concentraciones, con células renales. Esto último, las convierte en excelentes candidatas para el tratamiento de enfermedades infecciosas superficiales. Sin embargo, habría que demostrar que éstas posean una baja absorción a la circulación sistémica, y por consiguiente una baja concentración durante la excreción renal.

Literatura citada

- Abdel-Wareth, M. T. A. 2017. Fungal applications in sustainable environmental biotechnology. En International Journal of Environmental Studies. doi:10.1080/00207233.2017.1363570
- Akintelu, S. A., Folorunso, A. S., Folorunso, F. A., Oyebamiji, A. K. 2020. Green synthesis of copper oxide nanoparticles for biomedical application and environmental remediation. Heliyon, 6(7), e04508. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04508
- Alizadeh, H., Salouti, M., Shapouri, R. 2014. Bactericidal effect of silver nanoparticles on intramacrophage *Brucella abortus* 544. Jundishapur Journal of Microbiology, 7(3), 3–7. doi:10.5812/jjm.9039
- Alizadeh, S., Seyedalipour, B., Shafieyan, S., Kheime, A., Mohammadi, P., Aghdami, N. 2019. Copper nanoparticles promote rapid wound healing in acute full thickness defect via acceleration of skin cell migration, proliferation, and neovascularization. Biochemical and Biophysical Research Communications, 517(4), 684–690. doi:10.1016/j.bbrc.2019.07.110
- Ameh, T., Sayes, C. M. 2019. The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 71(June), 103220. doi:10.1016/j.etap.2019.103220
- Andrei, S., Droc, G., Stefan, G. 2019. FDA approved antibacterial drugs: 2018-2019. Discoveries, 7(4), e102. doi:10.15190/d.2019.15
- Ashraf, N., Ahmad, F., Da-Wei, L., Zhou, R. Bin, Feng-Li, H., Yin, D. C. 2019. Iron/iron oxide nanoparticles: advances in microbial fabrication, mechanism study, biomedical, and environmental applications. Critical Reviews in Microbiology, 45(3), 278–300. doi:10.1080/1040841X.2019.1593101
- Azizi, S., Ahmad, M. B., Namvar, F., Mohamad, R. 2014. Green biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using brown marine macroalga *Sargassum muticum* aqueous extract. Materials Letters, 116, 275–277. doi:10.1016/j.matlet.2013.11.038
- Baym, M., Stone, L. K., Kishony, R. 2016. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. Science, 351(6268). doi:10.1126/science.aad3292
- Benelli, G. 2018. Mode of action of nanoparticles against insects. Environmental Science and Pollution Research, 25(13), 12329–12341. doi:10.1007/s11356-018-1850-4
- Benelli, G., Maggi, F., Romano, D., Stefanini, C., Vaseeharan, B., Kumar, S., Higuchi, A., Alarfaj, A. A., Mehlhorn, H., Canale, A. 2017. Nanoparticles as effective acaricides against ticks—A review. Ticks and Tick-borne Diseases, 8(6), 821–826. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.08.004
- Bharadwaj, K. K., Rabha, B., Pati, S., Sarkar, T., Choudhury, B. K., Barman, A., Bhattacharjya, D., Srivastava, A., Baishya, D., Edinur, H. A., Kari, Z. A., Noor, N. H. M. 2021. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as beneficial prospect for cancer theranostics. Molecules, 26(21). doi:10.3390/molecules26216389
- Black, K. C. L., Wang, Y., Luehmann, H. P., Cai, X., Xing, W., Pang, B., Zhao, Y., Cutler, C. S., Wang, L. V., Liu, Y., Xia, Y. 2014. Radioactive ¹⁹⁸Au-doped nanostructures with different shapes for *in vivo* analyses of their biodistribution, tumor uptake, and intratumoral distribution. ACS Nano, 8(5), 4385–4394. doi:10.1021/nn406258m

- Blanco, E., Shen, H., Ferrari, M. 2015. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941–951. doi:10.1038/nbt.3330
- Blecher, K., Nasir, A., Friedman, A. 2011. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*, 2(5), 395–401.
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., Kahru, A. 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells *in vitro*: A critical review. *Archives of Toxicology*, 87(7), 1181–1200. doi:10.1007/s00204-013-1079-4
- Burlacu, E., Tanase, C., Coman, N. A., Berta, L. 2019. A review of bark-extract-mediated green synthesis of metallic nanoparticles and their applications. *Molecules*, 24(23), 1–18. doi:10.3390/molecules24234354
- Castro-Longoria, E., Vilchis-Nestor, A. R., Avalos-Borja, M. 2011. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(1), 42–48. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.10.035
- Castro-Longoria, E. 2022. Biosynthesis of Metal-Based Nanoparticles by *Trichoderma* and Its Potential Applications. *Fungal Biology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-91650-3_17
- Chabala, L. F. G., Cuartas, C. E. E., López, M. E. L. o. 2017. Release behavior and antibacterial activity of chitosan/alginate blends with aloe vera and silver nanoparticles. *Marine Drugs*, 15(10). doi:10.3390/md15100328
- Chinnasamy, G., Chandrasekharan, S., Bhatnagar, S. 2019. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Melia azedarach*: Enhancement of antibacterial, wound healing, antidiabetic and antioxidant activities. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9823–9836. doi:10.2147/IJN.S231340
- CLSI. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition (CLSI docum, Vol. 32). Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA.
- Consolo, V. F., Torres-Nicolini, A., Alvarez, V. A. 2020. Mycosinthesized Ag, CuO and ZnO nanoparticles from a promising *Trichoderma harzianum* strain and their antifungal potential against important phytopathogens. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. doi:10.1038/s41598-020-77294-6
- Cuevas, R., Durán, N., Diez, M. C., Tortella, G. R., Rubilar, O. 2015. Extracellular biosynthesis of copper and copper oxide nanoparticles by *Stereum hirsutum*, a native white-rot fungus from Chilean forests. *Journal of Nanomaterials*, 2015. doi:10.1155/2015/789089
- Dadfar, S. M., Roemhild, K., Drude, N. I., von Stillfried, S., Knüchel, R., Kiessling, F., Lammers, T. 2019. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 138, 302–325. doi:10.1016/j.addr.2019.01.005
- deMello, A. J., Woolley, A. T. 2010. Nanotechnology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(5), 545–547. doi:10.1016/j.cbpa.2010.08.023
- Dhillon, G. S., Brar, S. K., Kaur, S., Verma, M. 2012. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: Current trends and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(1), 49–73. doi:10.3109/07388551.2010.550568

- Durán, N., Durán, M., De Souza, C. E. 2017. Silver and silver chloride nanoparticles and their anti-tick activity: A mini review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(6), 927–932. doi:10.21577/0103-5053.20170045
- El-Batal, A. I., Al-Hazmi, N. E., Mosallam, F. M., El-Sayyad, G. S. 2018. Biogenic synthesis of copper nanoparticles by natural polysaccharides and *Pleurotus ostreatus* fermented fenugreek using gamma rays with antioxidant and antimicrobial potential towards some wound pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 118, 159–169. doi:10.1016/j.micpath.2018.03.013
- El-Batal, A. I., El-Sayyad, G. S., Mosallam, F. M., Fathy, R. M. 2020. Penicillium chrysogenum-Mediated Mycogenic Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using Gamma Rays for In Vitro Antimicrobial Activity Against Some Plant Pathogens. *Journal of Cluster Science*, 31(1), 79–90. doi:10.1007/s10876-019-01619-3
- Elgorban, A. M., El-Samawaty, A. E. R. M., Yassin, M. A., Sayed, S. R., Adil, S. F., Elhindi, K. M., Bakri, M., Khan, M. 2016. Antifungal silver nanoparticles: Synthesis, characterization and biological evaluation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(1), 56–62. doi:10.1080/13102818.2015.1106339
- Erci, F., Cakir-Koc, R., Yontem, M., Torlak, E. 2020. Synthesis of biologically active copper oxide nanoparticles as promising novel antibacterial-antibiofilm agents. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 6068. doi:10.1080/10826068.2019.1711393
- Escárcega-González, C. E., Garza-Cervantes, J. A., Vázquez-Rodríguez, A., Montelongo-Peralta, L. Z., Treviño-González, M. T., Díaz Barriga Castro, E., Saucedo-Salazar, E. M., Chávez Morales, R. M., Regalado Soto, D. I., Treviño González, F. M., Carrasco Rosales, J. L., Villalobos Cruz, R., Morones-Ramírez, J. R. 2018. *In vivo* antimicrobial activity of silver nanoparticles produced via a green chemistry synthesis using *Acacia rigidula* as a reducing and capping agent. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 2349–2363. doi:10.2147/IJN.S160605
- Evans, A., Kavanagh, K. A. 2021. Evaluation of metal-based antimicrobial compounds for the treatment of bacterial pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 70(5). doi:10.1099/JMM.0.001363
- Farokhzad, O. C., Langer, R. 2009. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3(1), 16–20. doi:10.1021/nn900002m
- Fröhlich, E. 2012a. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5577–5591. doi:10.2147/IJN.S36111
- Fröhlich, E. 2012b. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5577–5591. doi:10.2147/IJN.S36111
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L. J., Maldonado-Anicacio, J. Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H. L., Gomez-Choel, A., Jaime-Sanchez, J. L., ... Camacho-Ortiz, A. 2019. A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS ONE*, 14(3), 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0209865
- Gour, A., Jain, N. K. 2019. Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 844–851. doi:10.1080/21691401.2019.1577878

- Gurunathan, S., Raman, J., Abd Malek, S. N., John, P. A., Vikineswary, S. 2013. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: A potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4399–4413. doi:10.2147/IJN.S51881
- Haggag, E. G., Elshamy, A. M., Rabeh, M. A., Gabr, N. M., Salem, M., Youssif, K. A., Samir, A., Bin Muhsinah, A., Alsayari, A., Abdelmohsen, U. R. 2019. Antiviral potential of green synthesized silver nanoparticles of *Lampranthus coccineus* and *Malephora lutea*. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 6217–6229. doi:10.2147/IJN.S214171
- Hans, M., Mathews, S., Mücklich, F., Solioz, M. 2016. Physicochemical properties of copper important for its antibacterial activity and development of a unified model. *Biointerphases*, 11(1), 018902. doi:10.1116/1.4935853
- Henson, T. E., Navratilova, J., Tennant, A. H., Bradham, K. D., Rogers, K. R., Hughes, M. F. 2019. *In vitro* intestinal toxicity of copper oxide nanoparticles in rat and human cell models. *Nanotoxicology*, 13(6), 795–811. doi:10.1080/17435390.2019.1578428
- Hernández-Rangel, A., Silva-Bermudez, P., España-Sánchez, B. L., Luna-Hernández, E., Almaguer-Flores, A., Ibarra, C., Garcia-Perez, V. I., Velasquillo, C., Luna-Barcenas, G. 2019. Fabrication and *in vitro* behavior of dual-function chitosan/silver nanocomposites for potential wound dressing applications. *Materials Science and Engineering C*, 94, 750–765. doi:10.1016/j.msec.2018.10.012
- Honary, S., Barabadi, H., Gharaei-Fathabad, E., Naghibi, F. 2012. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* and *Penicillium waksmanii*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(3), 999–1005.
- Hu, J. J., Cheng, Y. J., Zhang, X. Z. 2018. Recent advances in nanomaterials for enhanced photothermal therapy of tumors. *Nanoscale*, 10(48), 22657–22672. doi:10.1039/c8nr07627h
- Humphreys, H. 2014. Self-disinfecting and microbicide-impregnated surfaces and fabrics: What potential in interrupting the spread of healthcare-associated infection? *Clinical Infectious Diseases*, 58(6), 848–853. doi:10.1093/cid/cit765
- Hussain, I., Singh, N. B., Singh, A., Singh, H., Singh, S. C. 2016. Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology Letters*, 38(4), 545–560. doi:10.1007/s10529-015-2026-7
- Jamdagni, P., Khatri, P., Rana, J. S. 2018. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. *Journal of King Saud University - Science*, 30(2), 168–175. doi:10.1016/j.jksus.2016.10.002
- Joshi, A., Thiel, K., Jog, K., Dringen, R. 2019. Uptake of Intact Copper Oxide Nanoparticles Causes Acute Toxicity in Cultured Glial Cells. *Neurochemical Research*, 44(9), 2156–2169. doi:10.1007/s11064-019-02855-9
- Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S. R. K., Deepak, V., Gurunathan, S. 2010. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2), 340–344. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.04.014

- Kaweeteerawat, C., Na Ubol, P., Sangmuang, S., Aueviriyavit, S., Maniratanachote, R. 2017. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria mediated by silver nanoparticles. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 80(23–24), 1276–1289. doi:10.1080/15287394.2017.1376727
- Kharissova, O. V., Dias, H. V. R., Kharisov, B. I., Pérez, B. O., Pérez, V. M. J. 2013. The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 31(4), 240–248. doi:10.1016/j.tibtech.2013.01.003
- Li, Z., Yu, T., Paul, R., Fan, J., Yang, Y., Wei, Q. 2020. Nanoscale Advances Agricultural nanodiagnostics for plant diseases : recent advances and challenges. *Nanoscale Advances*. doi:10.1039/c9na00724e
- Liang, J., Wang, J., Li, S., Xu, L., Wang, R., Chen, R., Sun, Y. 2019. The size-controllable preparation of chitosan/silver nanoparticle composite microsphere and its antimicrobial performance. *Carbohydrate Polymers*, 220(May), 22–29. doi:10.1016/j.carbpol.2019.05.048
- Liu, W., Yuan, C., Zhang, L., Feng, Y. 2019. Development of isothermal amplification methods for rapid and sensitive detection of heat-labile enterotoxin producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 161(April), 47–55. doi:10.1016/j.mimet.2019.04.010
- Liu, X., Atwater, M., Wang, J., Huo, Q. 2007. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(1), 3–7. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.08.005
- Liu, Y., Ji, M., Wang, P. 2019. Recent Advances in Small Copper Sulfide Nanoparticles for Molecular Imaging and Tumor Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 16(8), 3322–3332. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00273
- Livermore, D. M. 2012. Fourteen years in resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(4), 283–294. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.12.012
- Longmire, M., Choyke, P. L., Kobayashi, H. 2008. Clearance Properties of Nano-sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Consideration and Caveats. *Nanomedicine*, 3(5), 703–717. doi:10.2217/17435889.3.5.703.Clearance
- Lu, Y., Lihua, L., Zhu, Y., Wang, X., Li, M., Zefeng, L., Xiaoming, H., Zhang, Y., Qingshiu, Y., Chuanbin, M. 2018. Multifunctional copper-containing carboxymethyl chitosan/alginate scaffolds for eradicating clinical bacterial infection and promoting bone formation. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(1), 127–138. doi:10.1021/acsami.7b13750.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., Monnet, D. L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Mali, S. C., Dhaka, A., Githala, C. K., Trivedi, R. 2020. Green synthesis of copper nanoparticles using *Celastrus paniculatus* Willd. leaf extract and their photocatalytic and antifungal properties. *Biotechnology Reports*, 27, e00518. doi:10.1016/j.btre.2020.e00518
- Malzahn, K., Jamieson, W. D., Dröge, M., Mailänder, V., Jenkins, A. T. A., Weiss, C. K., Landfester, K. 2014.

- Advanced dextran based nanogels for fighting *Staphylococcus aureus* infections by sustained zinc release. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(15), 2175–2183. doi:10.1039/c3tb21335h
- Maruthupandy, M., Zuo, Y., Chen, J. S., Song, J. M., Niu, H. L., Mao, C. J., Zhang, S. Y., Shen, Y. H. 2017. Synthesis of metal oxide nanoparticles (CuO and ZnO NPs) via biological template and their optical sensor applications. *Applied Surface Science*, 397, 167–174. doi:10.1016/j.apsusc.2016.11.118
- Mazón Martínez, M. E. 2020. Obtención de nanopartículas de plata y andamios bioactivos: caracterización y actividad antimicrobiana contra patógenos humanos. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada , Baja California. 81 pp.
- Mba, I. E., Nweze, E. I. 2021. Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(6), 1–30. doi:10.1007/s11274-021-03070-x
- Midander, K., Cronholm, P., Karlsson, H. L., Elihn, K., Möller, L., Leygraf, C., Wallinder, I. O. 2009. Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: A cross-disciplinary study. *Small*, 5(3), 389–399. doi:10.1002/smll.200801220
- Mitra, D., Kang, E. T., Neoh, K. G. 2020. Antimicrobial Copper-Based Materials and Coatings: Potential Multifaceted Biomedical Applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(19), 21159–21182. doi:10.1021/acsami.9b17815
- Mohanta, Y. K., Nayak, D., Biswas, K., Singdevsachan, S. K., Abd_Allah, E. F., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Yadav, D., Mohanta, T. K. 2018. Silver nanoparticles synthesized using wild mushroom show potential antimicrobial activities against food borne pathogens. *Molecules*, 23(3), 1–18. doi:10.3390/molecules23030655
- Mohanta, Y. K., Singdevsachan, S. K., Parida, U. K., Panda, S. K., Mohanta, T. K., Bae, H. 2016. Green synthesis and antimicrobial activity of silver nanoparticles using wild medicinal mushroom *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. *IET Nanobiotechnology*, 10(4), 184–189. doi:10.1049/iet-nbt.2015.0059
- Morris, D., Ansar, M., Speshock, J., Ivanciuc, T., Qu, Y., Casola, A., Garofalo, R. 2019. Antiviral and immunomodulatory activity of silver nanoparticles in experimental rsv infection. *Viruses*, 11(8). doi:10.3390/v11080732
- Nafari, A., Cheraghpour, K., Sepahvand, M., Shahrokhi, G., Gabal, E., Mahmoudvand, H. 2020. Nanoparticles: New agents toward treatment of leishmaniasis. *Parasite Epidemiology and Control*, 10, e00156. doi:10.1016/j.parepi.2020.e00156
- Naqvi, S. T. Q., Shah, Z., Fatima, N., Qadir, M. I., Ali, A., Muhammad, S. A. 2017. Characterization and biological studies of copper nanoparticles synthesized by *Aspergillus Niger*. *Journal of Bionanoscience*, 11(2), 136–140. doi:10.1166/jbns.2017.1426
- Narayan, R., Nayak, U. Y., Raichur, A. M., Garg, S. 2018. Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances. *Pharmaceutics*, 10(3), 1–49. doi:10.3390/pharmaceutics10030118

- Nath, J., Dror, I., Landa, P., Vanek, T., Kaplan-Ashiri, I., Berkowitz, B. 2018. Synthesis and characterization of isotopically-labeled silver, copper and zinc oxide nanoparticles for tracing studies in plants. *Environmental Pollution*, 242, 1827–1837. doi:10.1016/j.envpol.2018.07.084
- Ning, C., Wang, X., Li, L., Zhu, Y., Li, M., Yu, P., Zhou, L., Zhou, Z., Chen, J., Tan, G., Zhang, Y., Wang, Y., Mao, C. 2015. Concentration Ranges of Antibacterial Cations for Showing the Highest Antibacterial Efficacy but the Least Cytotoxicity against Mammalian Cells: Implications for a New Antibacterial Mechanism. *Chemical Research in Toxicology*, 28(9), 1815–1822. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00258
- Noor, S., Shah, Z., Javed, A., Ali, A., Hussain, S. B., Zafar, S., Ali, H., Muhammad, S. A. 2020. A fungal based synthesis method for copper nanoparticles with the determination of anticancer, antidiabetic and antibacterial activities. *Journal of Microbiological Methods*, 174(March), 105966. doi:10.1016/j.mimet.2020.105966
- Norambuena, G. A., Patel, R., Karau, M., Wyles, C. C., Jannetto, P. J., Bennet, K. E., Hanssen, A. D., Sierra, R. J. 2017. Antibacterial and Biocompatible Titanium-Copper Oxide Coating May Be a Potential Strategy to Reduce Periprosthetic Infection: An In Vitro Study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 475(3), 722–732. doi:10.1007/s11999-016-4713-7
- Oza, G., Calzadilla-Avila, A. I., Reyes-Calderón, A., Anna, K. K., Ramírez-Bon, R., Tapia-Ramirez, J., Sharma, A. 2020. pH-dependent biosynthesis of copper oxide nanoparticles using *Galphimia glauca* for their cytocompatibility evaluation. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 10(2), 541–550. doi:10.1007/s13204-019-01159-2
- Palanisamy, N. K., Ferina, N., Amirulhusni, A. N., Mohd-Zain, Z., Hussaini, J., Ping, L. J., Durairaj, R. 2014. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Nanobiotechnology*, 12(1), 1–7. doi:10.1186/1477-3155-12-2
- Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., Dyčka, F., Šebela, M., Pucek, R., Tomanec, O., Zbořil, R. 2018. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology*, 13(1), 65–71. doi:10.1038/s41565-017-0013-y
- Parthiban, E., Ramachandran, M., Jayakumar, M., Ramanibai, R. 2019. Biocompatible green synthesized silver nanoparticles impact on insecticides resistant developing enzymes of dengue transmitted mosquito vector. *SN Applied Sciences*, 1(10). doi:10.1007/s42452-019-1311-9
- Patil, M. P., Kim, G. Do. 2017. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 79–92. doi:10.1007/s00253-016-8012-8
- Patra, J. K., Das, G., Shin, H. 2019. Facile green biosynthesis of silver nanoparticles using *Pisum sativum* L. outer peel aqueous extract and its antidiabetic, cytotoxicity, antioxidant, and antibacterial activity.
- Pelaz, B., Alexiou, C., Alvarez-Puebla, R. A., Alves, F., Andrews, A. M., Ashraf, S., Balogh, L. P., Ballerini, L., Bestetti, A., Brendel, C., Bosi, S., Carril, M., Chan, W. C. W., Chen, C., Chen, X., Chen, X., Cheng, Z., Cui, D., ... Parak, W. J. 2017. Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano*, 11(3), 2313–2381. doi:10.1021/acs.nano.6b06040
- Pelgrift, R. Y., Friedman, A. J. 2013. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13–14), 1803–1815. doi:10.1016/j.addr.2013.07.011

- Pohanka, M. 2019. Copper and copper nanoparticles toxicity and their impact on basic functions in the body. *Bratislava medical journal*, 120(6), 397–409. doi:10.4149/BLL_2019_065
- Pollack, R. A., Findlay, L., Mondschein, W., Modesto, R. R. 2009. *Laboratory Exercises in Microbiology* (3rd editio; K. Witt, Ed.). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Prescott, H. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*. 5th ed. McGraw-Hill.
- Qamar, H., Rehman, S., Chauhan, D. K., Tiwari, A. K., Upmanyu, V. 2020. Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanomaterial derived from *Momordica charantia*. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2541–2553. doi:10.2147/IJN.S240232
- Qian, Y., Zhou, X., Zhang, F., Diekwisch, T. G. H., Luan, X., Yang, J. 2019. Triple PLGA/PCL Scaffold Modification including Silver Impregnation, Collagen Coating, and Electrospinning Significantly Improve Biocompatibility, Antimicrobial, and Osteogenic Properties for Orofacial Tissue Regeneration. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(41), 37381–37396. doi:10.1021/acsami.9b07053
- Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M. S., Tahir, M. B. 2017. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(7), 1272–1291. doi:10.1080/21691401.2016.1241792
- Rajeshkumar, S., Menon, S., Venkat Kumar, S., Tambuwala, M. M., Bakshi, H. A., Mehta, M., Satija, S., Gupta, G., Chellappan, D. K., Thangavelu, L., Dua, K. 2019. Antibacterial and antioxidant potential of biosynthesized copper nanoparticles mediated through *Cissus arnotiana* plant extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 197(May). doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111531
- Ramesh, M., Anbuvarannan, M., Viruthagiri, G. 2015. Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136(PB), 864–870. doi:10.1016/j.saa.2014.09.105
- Rehman, A., John, P., Bhatti, A. 2021. Biogenic selenium nanoparticles: Potential solution to oxidative stress mediated inflammation in rheumatoid arthritis and associated complications. *Nanomaterials*, 11(8). doi:10.3390/nano11082005
- Ren, Y., Yang, H., Wang, T., Wang, C. 2019. Bio-synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity. *Materials Chemistry and Physics*, 235(June), 121746. doi:10.1016/j.matchemphys.2019.121746
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay, D., Gyssens, I., Heur, O. E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liébana, E., López-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodríguez-Baño, J., ... Vila, J. 2015. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes and New Infections*, 6(February 2015), 22–29. doi:10.1016/j.nmni.2015.02.007
- Rossolini, G. M. 2016. Multidrug-Resistant and Extremely Drug-Resistant Bacteria: Are We Facing the End of the Antibiotic Era? *Journal of the Siena Academy of Sciences*, 7(1). doi:10.4081/jsas.2015.6409
- Salvadori, M. R., Lepre, L. F., Ando, R. A., Oller Do Nascimento, C. A., Corrêa, B. 2013. Biosynthesis and uptake of copper nanoparticles by dead biomass of *Hypocrea lixii* isolated from the metal mine in the Brazilian Amazon region. *PLoS ONE*, 8(11). doi:10.1371/journal.pone.0080519

- Scheiber, I. F., Mercer, J. F. B., Dringen, R. 2014. Metabolism and functions of copper in brain. *Progress in Neurobiology*, 116, 33–57. doi:10.1016/j.pneurobio.2014.01.002
- Sharma, Prashansa, Pant, S., Dave, V., Tak, K., Sadhu, V., Reddy, K. R. 2019. Green synthesis and characterization of copper nanoparticles by *Tinospora cardifolia* to produce nature-friendly copper nano-coated fabric and their antimicrobial evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 160(January), 107–116. doi:10.1016/j.mimet.2019.03.007
- Sharma, Purva, Tulsawani, R. 2020. *Ganoderma lucidum* aqueous extract prevents hypobaric hypoxia induced memory deficit by modulating neurotransmission, neuroplasticity and maintaining redox homeostasis. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. doi:10.1038/s41598-020-65812-5
- Sharma, V. K., Yngard, R. A., Lin, Y. 2009. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1–2), 83–96. doi:10.1016/j.cis.2008.09.002
- Shende, S., Ingle, A. P., Gade, A., Rai, M. 2015. Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 865–873. doi:10.1007/s11274-015-1840-3
- Siddiqi, K. S., Husen, A. 2020. Current status of plant metabolite-based fabrication of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: A review. *Biomaterials Research*, 24(1), 1–15. doi:10.1186/s40824-020-00188-1
- Sivaraj, R., Rahman, P. K. S. M., Rajiv, P., Salam, H. A., Venckatesh, R. 2014. Biogenic copper oxide nanoparticles synthesis using *Tabernaemontana divaricate* leaf extract and its antibacterial activity against urinary tract pathogen. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 133, 178–181. doi:10.1016/j.saa.2014.05.048
- Solioz, M. 2018. Copper and Bacteria. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-94439-5
- Tan, L., Zhou, Z., Liu, X., Li, J., Zheng, Y., Cui, Z., Yang, X., Liang, Y., Li, Z., Feng, X., Zhu, S., Yeung, K. W. K., Yang, C., Wang, X., Wu, S. 2020. Overcoming Multidrug-Resistant MRSA Using Conventional Aminoglycoside Antibiotics. *Advanced Science*, 7(9). doi:10.1002/advs.201902070
- Tang, H., Xu, M., Shi, F., Ye, G., Lv, C., Luo, J., Zhao, L., Li, Y. 2018. Effects and mechanism of nano-copper exposure on hepatic cytochrome P450 enzymes in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). doi:10.3390/ijms19072140
- Taubes, G. 2008. The bacteria fight back. *Science*, 321(July), 356–361.
- Toledano, M., Toledano-Orsorio, M., Osorio, R., Carrasco-Carmona, Á., Gutiérrez-Pérez, J. L., Gutiérrez-Corrales, A., Serrera-Figallo, M. A., Lynch, C. D., Torres-Lagares, D. 2020. Doxycycline and zinc loaded silica-nanofibrous polymers as biomaterials for bone regeneration. *Polymers*, 12(5). doi:10.3390/POLYM12051201
- Ullah, H., Wilfred, C. D., Shaharun, M. S. 2019. Green synthesis of copper nanoparticle using ionic liquid-based extraction from *Polygonum minus* and their applications. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 40(28), 3705–3712. doi:10.1080/09593330.2018.1485751

- Varghese, B., Kurian, M., Krishna, S., Athira, T. S. 2020. Biochemical synthesis of copper nanoparticles using *Zingiber officinalis* and *Curcuma longa*: Characterization and antibacterial activity study. *Materials Today: Proceedings*, 25(xxxx), 302–306. doi:10.1016/j.matpr.2020.01.476
- Vazquez-Muñoz, R., Meza-Villezcás, A., Fournier, P. G. J., Soria-Castro, E., Juárez-Moreno, K., Gallego-Hernández, A. L., Bogdanchikova, N., Vazquez-Duhalt, R., Huerta-Saquero, A. 2019. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS ONE*, 14(11), 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0224904
- Vetchinkina, E., Loshchinina, E., Kupryashina, M., Burov, A., Pylaev, T., Nikitina, V. 2018. Green synthesis of nanoparticles with extracellular and intracellular extracts of basidiomycetes. *PeerJ*, 2018(7). doi:10.7717/peerj.5237
- Vetchinkina, E., Shirokov, A., Bucharskaya, A., Navolokin, N., Prilepskii, A., Burov, A., Maslyakova, G., Nikitina, V. 2016. Antitumor activity of extracts from medicinal basidiomycetes mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(11), 955–964. doi:10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i11.10
- Vijayakumar, V., Samal, S. K., Mohanty, S., Nayak, S. K. 2019. Recent advancements in biopolymer and metal nanoparticle-based materials in diabetic wound healing management. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 137–148. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.120
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R. E. W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. doi:10.1038/nprot.2007.521
- Xiao, K., Li, Y., Luo, J., Lee, J. S., Xiao, W., Gonik, A. M., Agarwal, R. G., Lam, K. S. 2011. The effect of surface charge on *in vivo* biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*, 32(13), 3435–3446. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.021
- Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q., Li, P. 2020. Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field. *Nanoscale Research Letters*, 15(1). doi:10.1186/s11671-020-03344-7
- Yusof, N. A. A., Zain, N. M., Pauzi, N. 2019. Synthesis of ZnO nanoparticles with chitosan as stabilizing agent and their antibacterial properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 1132–1136. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.228
- Zangeneh, M. M., Ghaneialvar, H., Akbaribazm, M., Ghanimatdan, M., Abbasi, N., Goorani, S., Pirabbasi, E., Zangeneh, A. 2019. Novel synthesis of *Falcaria vulgaris* leaf extract conjugated copper nanoparticles with potent cytotoxicity, antioxidant, antifungal, antibacterial, and cutaneous wound healing activities under *in vitro* and *in vivo* condition. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 197(July), 111556. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111556
- Zhang, L., Gu, F., Chan, J., Wang, A., Langer, R., Farokhzad, O. 2007. Therapeutic, Nanoparticles in Medicine: Applications and Developments. *Education Policy Analysis Archives*, 8(5), 761–769. doi:10.1038/sj.clp
- Zhao, R., Chen, Q., He, Y. min. 2018. The effect of *Ganoderma lucidum* extract on immunological function and identify its anti-tumor immunostimulatory activity based on the biological network. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. doi:10.1038/s41598-018-30881-0