

# USE OF NANOBIOTECHNOLOGY AS AN ALTERNATIVE FOR THE CONTROL OF IAAS



**Universidad  
de Santander**  
Personería Jur. 010 de 12/03/96 Min.Educación  
**UES**  
VIGILADA MINEDUCACIÓN

ACREDITACIÓN  
COMPROMISO  
DE TODOS



# ANTIMICROBIAL EFFECT AND CYTOTOXIC OF COPPER AND SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIZED IN EXTRACTS OF *Moringa oleifera* AGAINST PATHOGENS INVOLVED IN INFECTIONS ASSOCIATED WITH THE SURGICAL SITE AND MEDICAL DEVICES

María Fernanda Romero Pineda <sup>1,2</sup>  
Bac. Msc. Asp PhD Enfermedades Infecciosas

José Gabriel López, Msc <sup>2</sup>  
Sandra Milena Leal Pinto, Msc, PhD<sup>1</sup>  
Martha Viviana Roa, Msc<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Programa de Maestría en Investigación en Enfermedades Infecciosas, Universidad de Santander*

<sup>2</sup> *Laboratorio Zumotec S.A.*

# Problem statement and justification

Implementation  
and development  
of new  
technologies



- IAD reported 5,141 cases.
- ISQ 2,105 cases reported

- Public Health problem



Adaptation a Chx  
Resistance to Colistina  
Wand *et al.*,2017

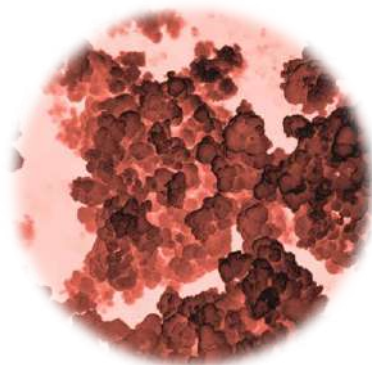


Alcohol *Pseudomona  
aeruginosa*  
*Romero et al.*,2011

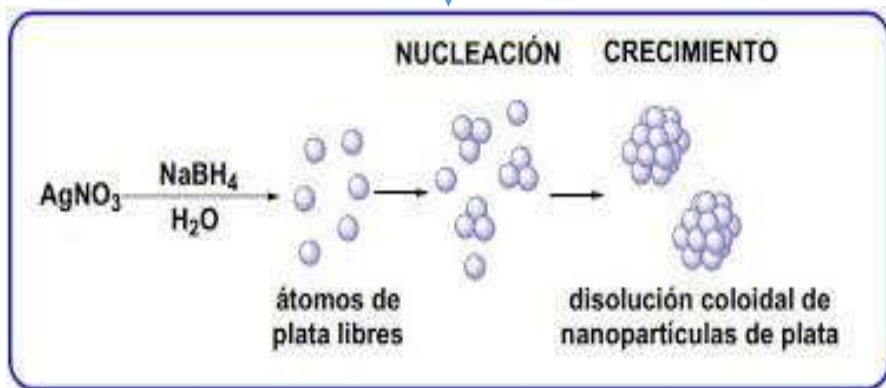


- Increase  
in cost

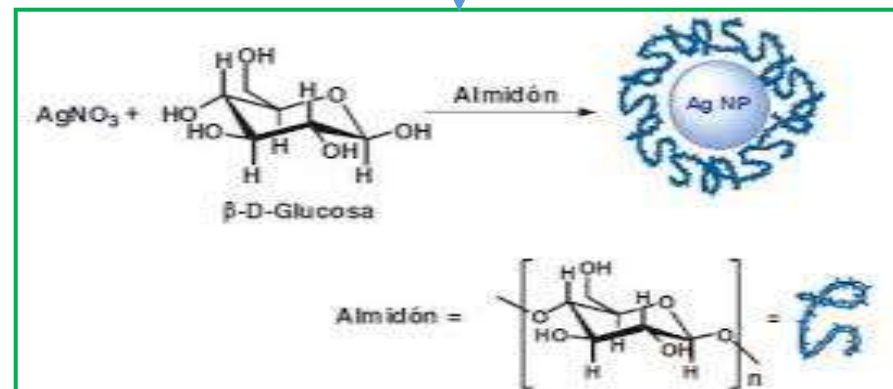
# Alternative



Roopan *et al.* Nps Copper oxide antifungal activity, versus *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*



Sánchez Moreno, M. (2017).

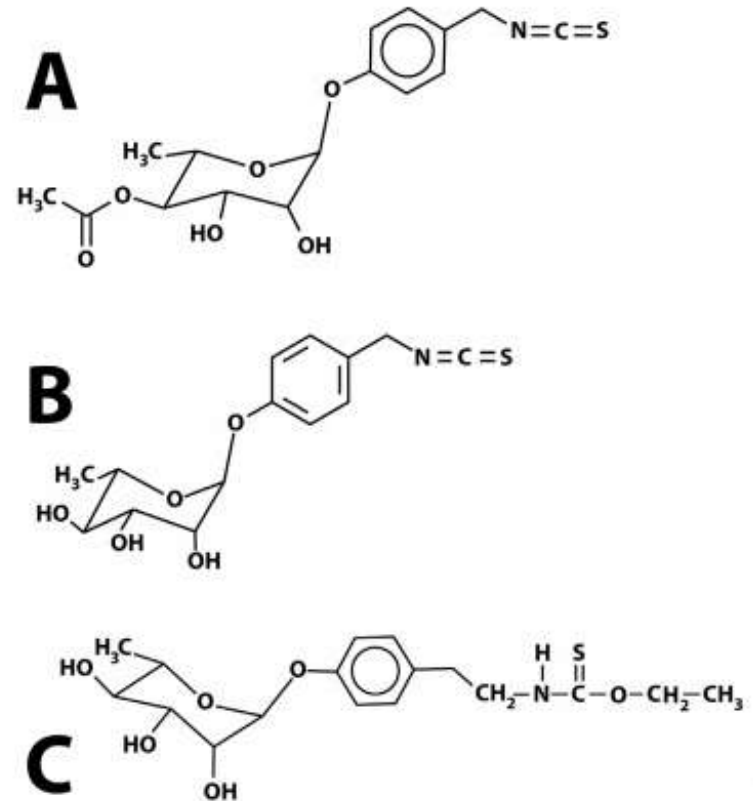


Lafuente Gómez, N. (2017).

# Improved alternative



Berkovich *et al.*, 2013 the leaf contains compounds such as terpenoids, tannins, sterols, flavonoids, saponins, anthraquinones.



Choudhary, Bodakhe, & Gupta, 2013



# Objective

Evaluate the antimicrobial and cytotoxic effect *in vitro* of copper and silver nanoparticles synthesized from Moringa aqueous extracts against pathogens involved in infections associated with medical device and surgical site.

# Specific objectives

- Determine extraction protocols by maximizing *Moringa oleifera* leaf reducing compounds.
- Synthesize copper and silver nanoparticles suspended in oily Moringa extracts.
- Evaluate *in vitro* antimicrobial activity of copper and silver nanoparticles synthesized and suspended in Moringa leaf extract against important strains in Health Care-Associated Infections.
- Evaluate the cytotoxic and genotoxic effect of copper and silver nanoparticles synthesized and suspended in *Moringa oleifera* leaf extract on mammalian cell lines.

# Methodology

**Preparation of  
plan material**



Drying in  
convective oven at  
50°C for 12 h

Size reduction per  
blade mill, sieve  
0.5-0.6 mm

**Extraction of  
active  
compounds**



Experimental  
design  $2^3$   
Tiempo: 24-48h  
%s/s : 5-30  
pH: 4-10

Centrifugation  
10 min  
3500 rpm

**Measuremnet  
of disolved  
solids**





# Methodology

**Determination  
of the  
reduction  
capacity of the  
Cu ion <sup>+2</sup>**



$$\begin{aligned} \text{Reducing capacity Cu}^{+2} &= \frac{g \text{ of beginning CuSO}_4 - g \text{ of ending CuSO}_4}{g \text{ of extract}} \\ &= \frac{g \text{ of reducing CuSO}_4}{g \text{ of extract}} \end{aligned}$$

**Reducing  
sugars**



**Quantification  
of total  
polyphenols**









**Galic acid  
solution**



# Methodology

Histochemical evaluation of the effect of extraction processes on moringa leaves.



  Lugol – starch and lignocellulosic compounds  
  Fucine - protein  
  Violet - cell wall structures

Nanoparticles synthesis



T°: 25, 52,5; 80  
NaOH: 0,0001;  
5,10mM  
Sal: 0,1; 4,55; 9 mM



## Diseño de Box-Behnken

### Resumen del diseño

Factores:	3	Réplicas:	2
Corridas base:	15	Total de corridas:	30
Bloques base:	1	Total de bloques:	1
Puntos centrales:	6		

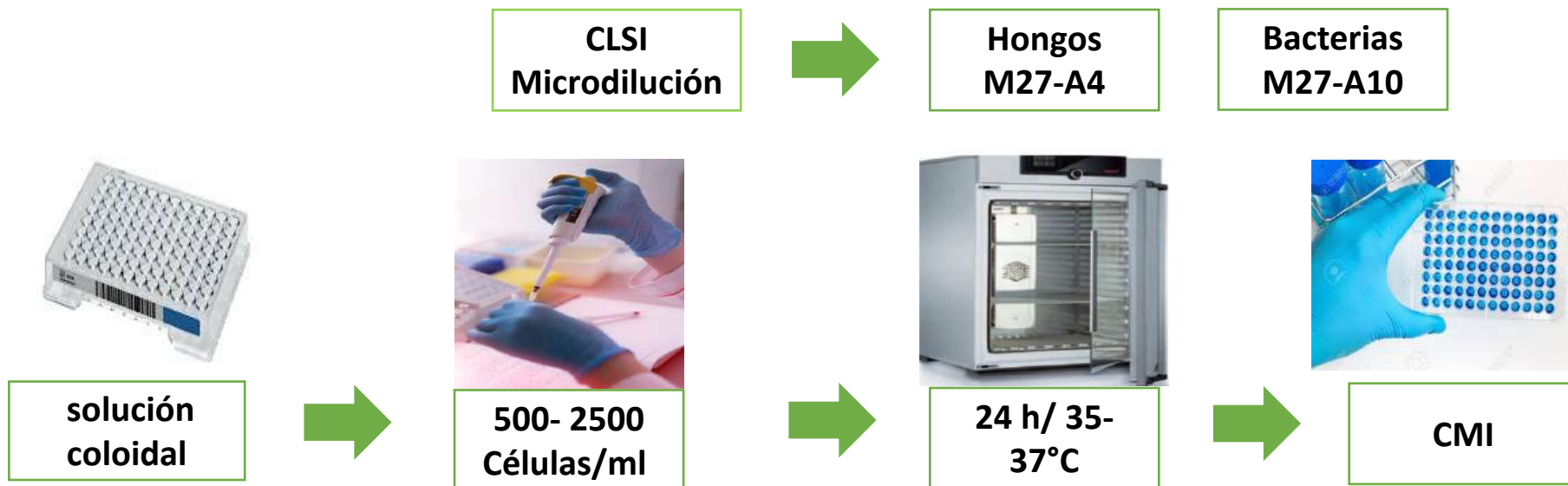
Characterization of the most active Nps



UV-VIS, DLS,  
SEM,  
Potencial Z

# Métodos

## MIC

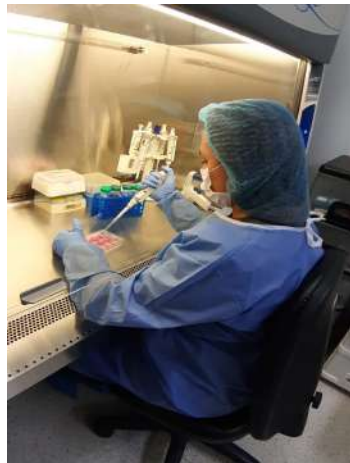


## Minimal bactericide and fungicide concentration



# Methods

## Ensayo de citotoxicidad y genotoxicidad



37°C/ 5% CO<sub>2</sub>  
95%/ 48h

cell viability

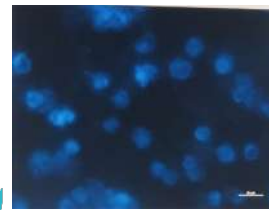
MTT

Optical  
density



XLfit

Electrophoresis



# Results

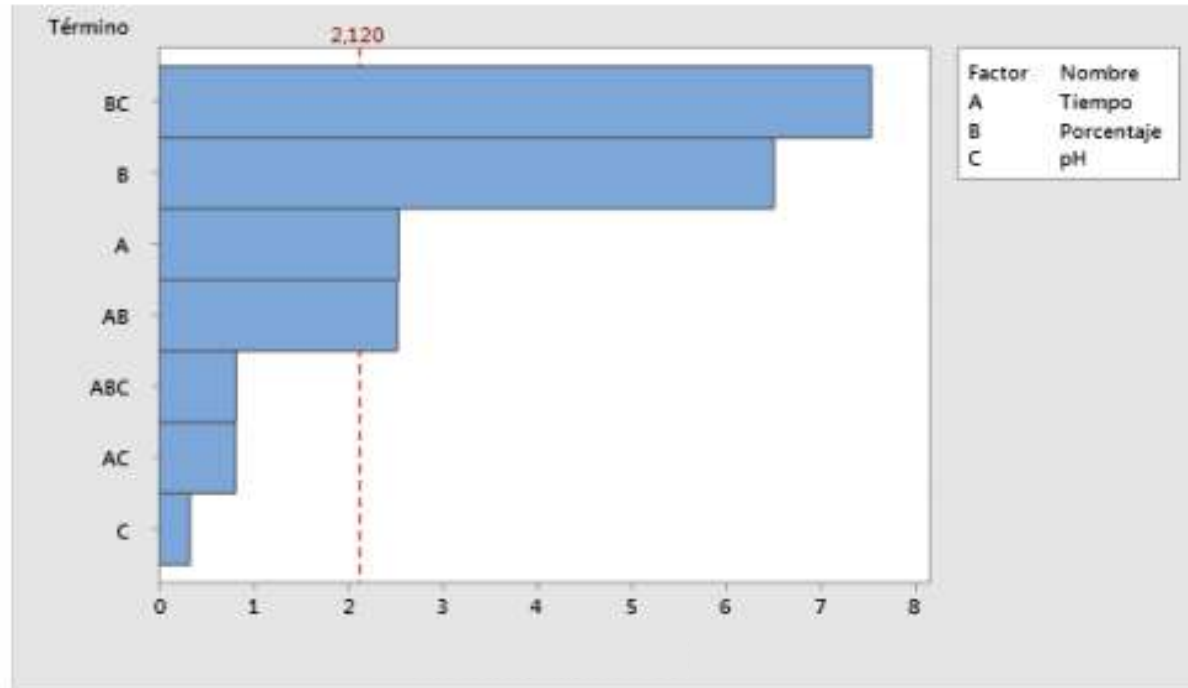
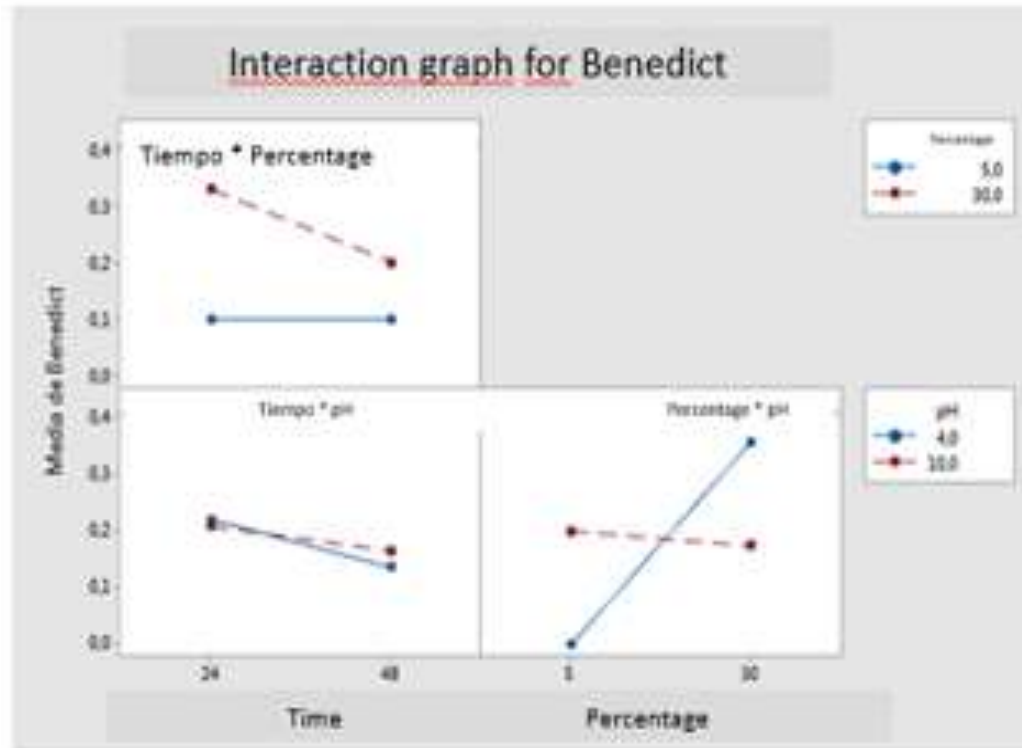


Diagram of standardized effects of aqueous extracts of *Moringa oleifera* leaf for time factors (A), solid/liquid ratio percentage (B) and pH (C), evaluated the reducing capacity of the  $\text{Cu}^{+2}$  ion

# Results

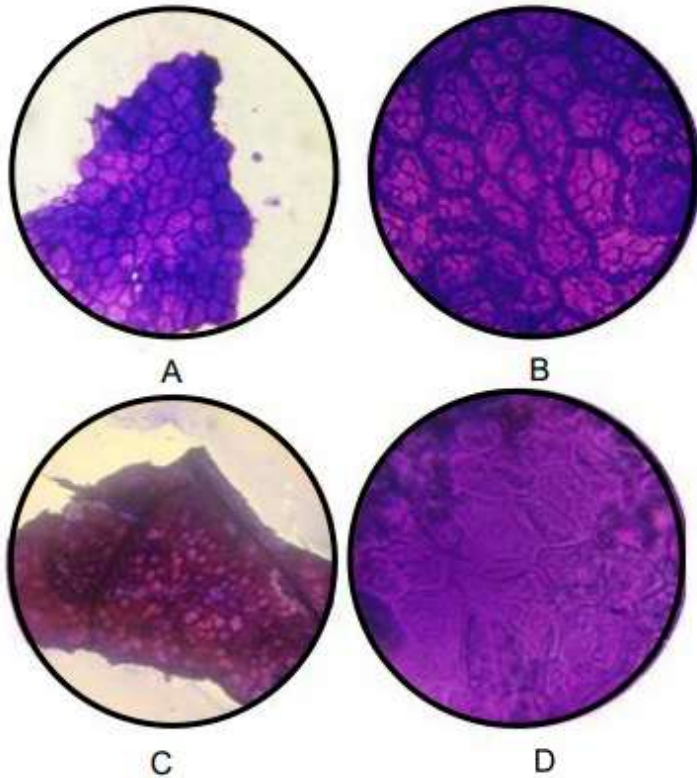


**Graph** of interaction of main variables of the pH factor levels, time, percentage in response reducing capacity

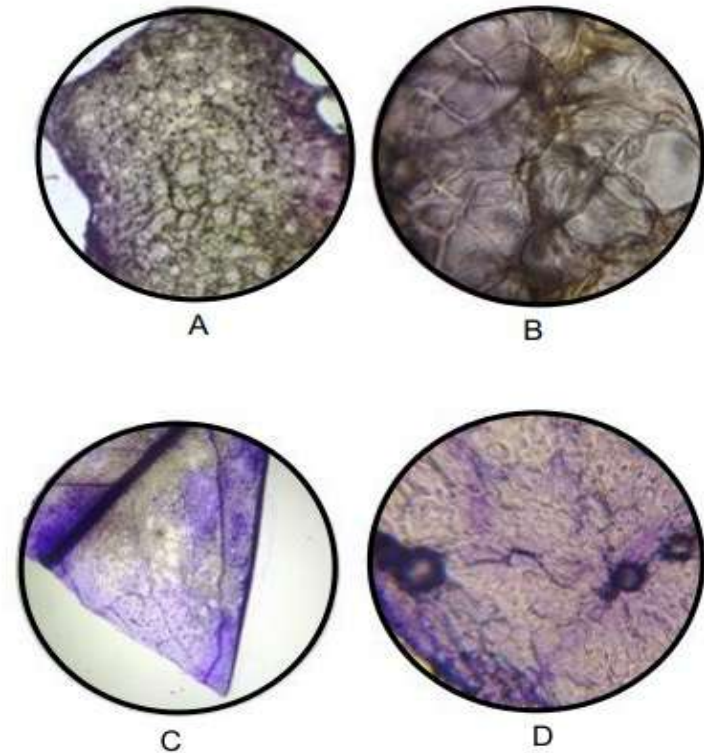


# Results

## Histychemic test



**Graphic 1.** Epidermis of fresh moringa leaf, 10X target (A).  
Epidermis staining of fresh moringa leaf, 100X target (B).  
Epidermis of the dried moringa leaf, target of 10X (C). Epidermis  
of the dried moringa leaf, 100X target (D).



**Graphic 2.** Staining with gram dyes, of cuts of the  
epidermis of the moringa leaf after eExtraction by maceration, for  
24 h and room temperature. Tissue after extraction at pH 10 (A  
(target 10X), B (target100X)) and pH 4 (C (target 10X), D (target  
100X)).

# Results

## physicochemical characterization of the extract

Physicochemical characterization of *Moringa leaf* extract using antioxidant tests.

Physicochemical characterization	Result	Units
Reducing sugars	7,437	mg EG/g extract
Total polyphenols	45,222	mg EAG/g extract

\*EAG: equivalents of galic acid

\* EG: equivalents of glucose

# Results

## Combination of experimental design

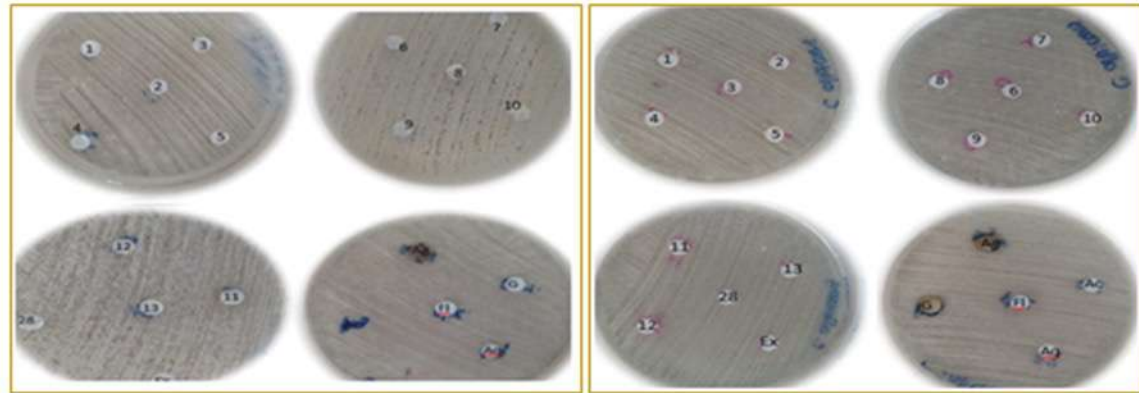


PUNTO EXP.	T°	[NaOH]	[CuSO <sub>4</sub> ] [Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]
1	25	0,0001	4,55
16	25	0,0001	4,55
3	25	10	4,55
18	25	10	4,55
5	25	5	0,1
20	25	5	0,1
7	25	5	9
22	25	5	9
9	52,5	0,0001	0,1
24	52,5	0,0001	0,1
10	52,5	10	0,1
25	52,5	10	0,1
11	52,5	0,0001	9
26	52,5	0,0001	9
12	52,5	10	9
27	52,5	10	9
13	52,5	5	4,55
28	52,5	5	4,55
14	52,5	5	4,55
29	52,5	5	4,55
15	52,5	5	4,55
30	52,5	5	4,55
2	80	0,0001	4,55
17	80	0,0001	4,55
4	80	10	4,55
19	80	10	4,55
6	80	5	0,1
21	80	5	0,1
8	80	5	9
23	80	5	9



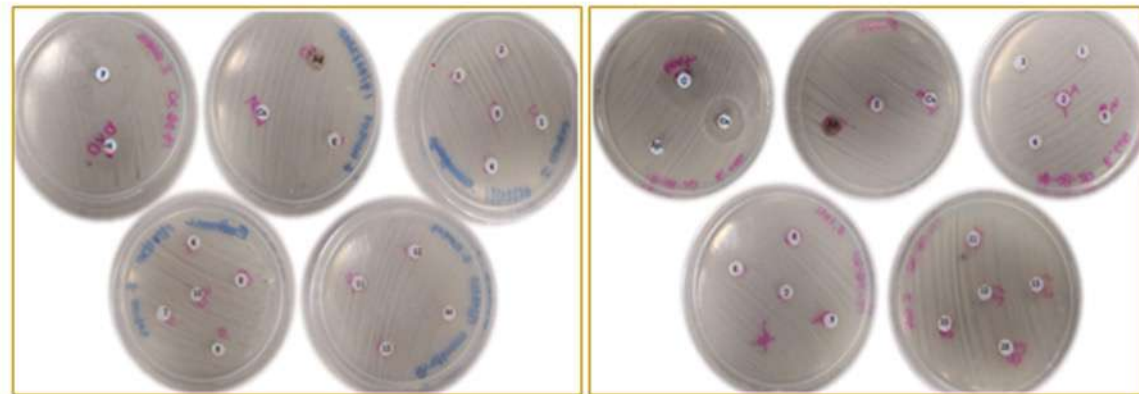
# Results

## preliminary sensidisco



A.

B.



C.

D.

**Figura A:** *Candida albicans* (ATCC® 90028) **Figura B:** *Candida tropicalis* (ATCC® 66029), **Figura C:** *Escherichia coli* (ATCC® 25922), **Figura D:** *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923).

# Preliminary microplate results

\*50%: inhibition of 50% visible growth of the microorganism

\*90%: inhibition of 90% visible growth of the microorganism

\* FI: fluconazole (16 µg/ml)

\* Chlorine: chloranfenicol (32 µg/ml)

\*C+: positive control (4000 yeasts/ml) (100,000 bacteria/ml)

Nps Cu	<i>E. coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>C.albicans</i>		<i>C.tropicalis</i>	
	*50%	*90%	*50%	*90%	*50%	*90%	*50%	*90%
1-16	-	-	-	-	-	-	-	-
2-17	-	-	-	-	-	-	-	-
3-18	Inhibió	-	-	-	Inhibió	-	-	-
4-19	Inhibió	-	Inhibió	-	-	-	-	-
5-20	-	-	-	-	Inhibió	-	Inhibió	-
6-21	-	-	-	Inhibió	-	-	-	-
7-22	-	-	-	-	-	-	-	-
8-23	-	Inhibió	-	Inhibió	-	Inhibió	-	Inhibió
9-24	-	-	-	-	-	-	-	-
10-25	-	-	Inhibió	-	Inhibió	-	Inhibió	-
11-26	-	Inhibió	-	Inhibió	-	-	-	-
12-27	-	-	-	Inhibió	-	-	Inhibió	-
13-28	-	-	-	-	-	-	-	-
14-29	-	-	-	-	-	-	-	-
15-30	-	-	-	-	-	-	-	-
Extracto	-	-	-	-	Inhibió	-	-	-
Clx (2%)	-	Inhibió	-	-	-	-	-	-
Clor (32 µl)	-	Inhibió	-	Inhibió	-	-	-	-
FI (16 µl)	Inhibió	-	Inhibió	-	-	-	-	-
C+	+	+		+		+		+

# Results

## Preliminary microplate results

**\*50%:** inhibition of 50% visible growth of the microorganism

**\*90%:** inhibition of 90% visible growth of the microorganism

\* FI: fluconazole (16 µg/ml)

\* Chlorine: chloranfenicol (32 µg/ml)

\*C+: positive control (4000 yeasts/ml) (100,000 bacteria/ml)

	<i>C. albicans</i>		<i>C.tropicalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. Coli</i>	
Nps Ag	*50%	*90%	*50%	*90%	*50%	*90%	*50%	*90%
1-16	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió
2-17	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió
3-18	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió
4-19	-	-	-	-	Inhibió	-	Inhibió	-
7-22	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió
8-23	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió
9-24	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió
11-26	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió
12-27	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió
13-28	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió
14-29	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió
15-30	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió	Inhibió
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	Inhibió	-	Inhibió	-	Inhibió	Inhibió	Inhibió



# Results

*Antimicrobial activity of the Nps of Cu in fungal and bacterial strain(mg/ml).*

Nps Cu	<i>C. albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC <sub>90</sub>	CFM	MIC <sub>90</sub>	CFM	MIC <sub>90</sub>	CBM	MIC <sub>90</sub>	CBM
6-21	*NI	*NI	*NI	*NI	*NI	*NI	500	500
8-23	15,6	15,6	250	250	500	500	500	500
11-26	*NI	*NI	*NI	*NI	*NI	*NI	500	500
12-27	*NI	*NI	*NI	*NI	*NI	*NI	500	500
Cuso <sub>4</sub>	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	2,2	1,1	>2,2
Extracto	*NI	*NI	*NI	*NI	*NI	*NI	*NI	*NI
Clorx	7,6e <sup>-5</sup>	7,6e <sup>-5</sup>	1,53e <sup>-4</sup>	1,53e <sup>-4</sup>	<3,7e <sup>-5</sup>	<3,7e <sup>-5</sup>	<3,7e <sup>-5</sup>	<3,7e <sup>-5</sup>
*FI	2,5e <sup>-2</sup>	>1,6e <sup>-2</sup>	1,25e <sup>-4</sup>	>1,6e <sup>-2</sup>	-	-	-	-
*Clor	-	-	-	-	2,5e <sup>-4</sup>	<2,3e <sup>-2</sup>	1e <sup>-3</sup>	<2,3e <sup>-2</sup>

\*FI: Mic<sub>50</sub> fluconazole(16µg/ml)

\*Clor: Mic<sub>50</sub> choranphenicol (32 µg/ml)

\*Clorx: Clorhexidina (2%)

\*NI: no inhibe

# Results

*Antimicrobial activity of the Nps of Ag in fungal and bacterial strain (mg/ml).*

Nps Ag	<i>C. albicans</i>		<i>C.tropicalis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	MIC <sub>90</sub>	CFM	MIC <sub>90</sub>	CFM	MIC <sub>90</sub>	CBM	MIC <sub>90</sub>	CBM
<b>1-16</b>	7,8	7,8	1,9	1,9	62,5	62,5	15,6	15,6
<b>2-17</b>	3,9	3,9	1,9	1,9	31,3	31,3	7,8	7,8
<b>3-18</b>	31,3	31,3	7,8	7,8	250	250	31,3	62,5
<b>4-19</b>	NI	NI	NI	NI	500	500	500	500
<b>7-22</b>	1,9	1,9	0,12	0,48	3,9	15,6	1,9	7,8
<b>8-23</b>	0,48	0,48	0,48	0,48	3,9	7,8	3,9	3,9
<b>9-24</b>	7,8	15,6	3,9	3,9	61,5	125	61,5	125
<b>11-26</b>	0,48	0,48	0,24	0,48	3,9	7,8	0,9	15,6
<b>12-27</b>	1,9	1,9	0,48	0,48	7,8	15,6	1,9	15,6
<b>13-28</b>	125	125	31,3	31,3	250	250	250	250
<b>14-29</b>	250	250	31,3	31,3	250	250	250	250
<b>15-30</b>	250	250	31,3	31,3	250	250	250	250
<b>Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	6e <sup>-4</sup>	6e <sup>-3</sup>	5e <sup>-3</sup>	5e <sup>-3</sup>	6e <sup>-4</sup>	6e <sup>-4</sup>	1e <sup>-3</sup>	1e <sup>-3</sup>

\*Fl: Mic<sub>50</sub> fluconazole (16 µg/ml)

\*Clor: Mic<sub>50</sub> cloranphenicol(32 µg/ml)

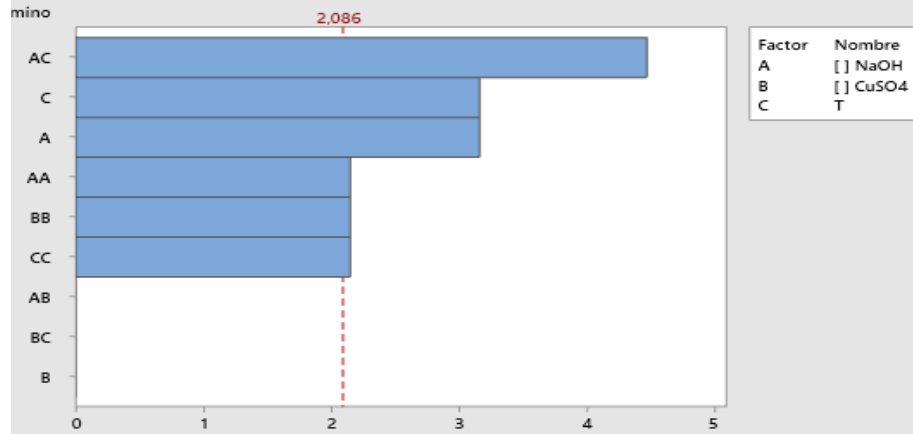
\*Clorx: Clorhexidina (2%)

\*NI: no inhibe

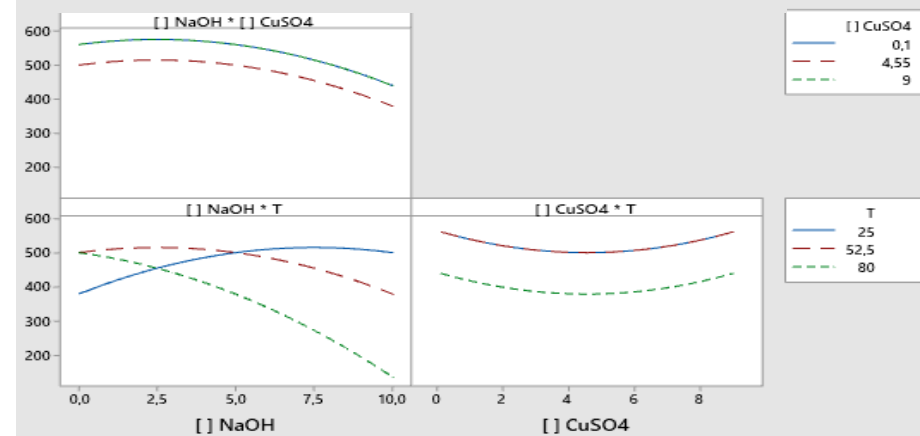
# Results

## Antimicrobial Cu Nps

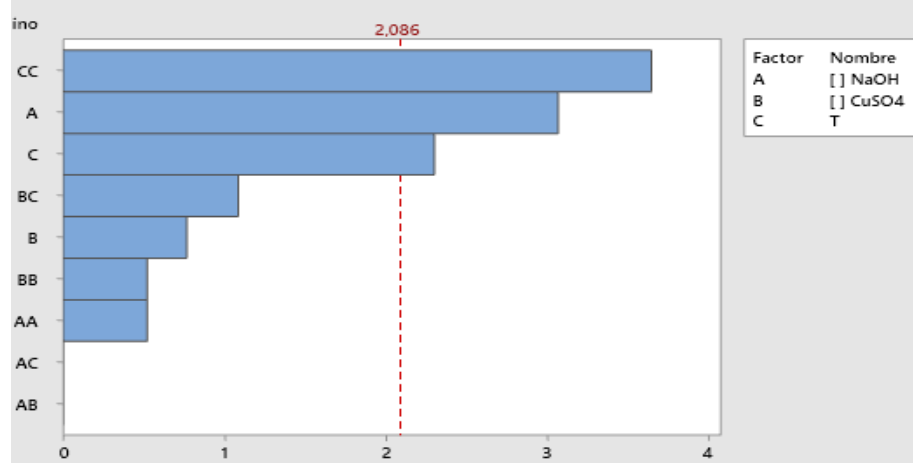
Pareto diagram of standardized  
(answer MIC. *C. albicans*, *tropicalis*, *E.coli*;  $\alpha=0,005$ )



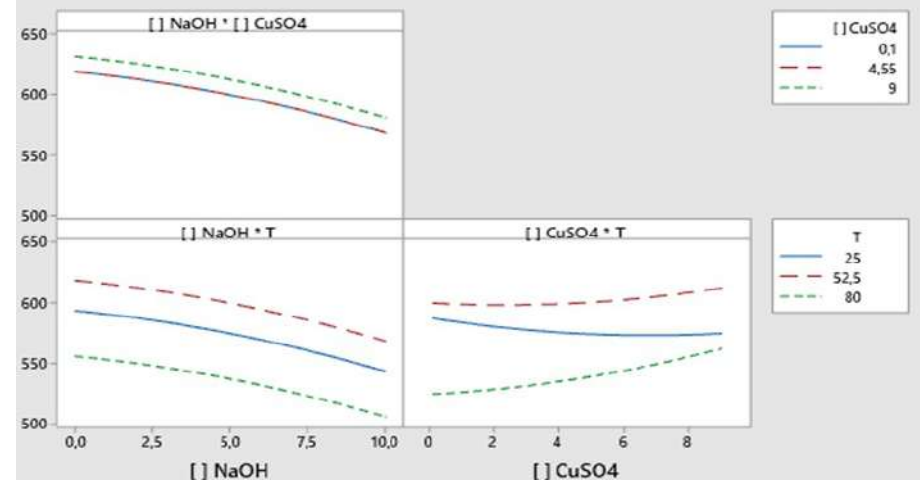
Interaction graph plot for MIC



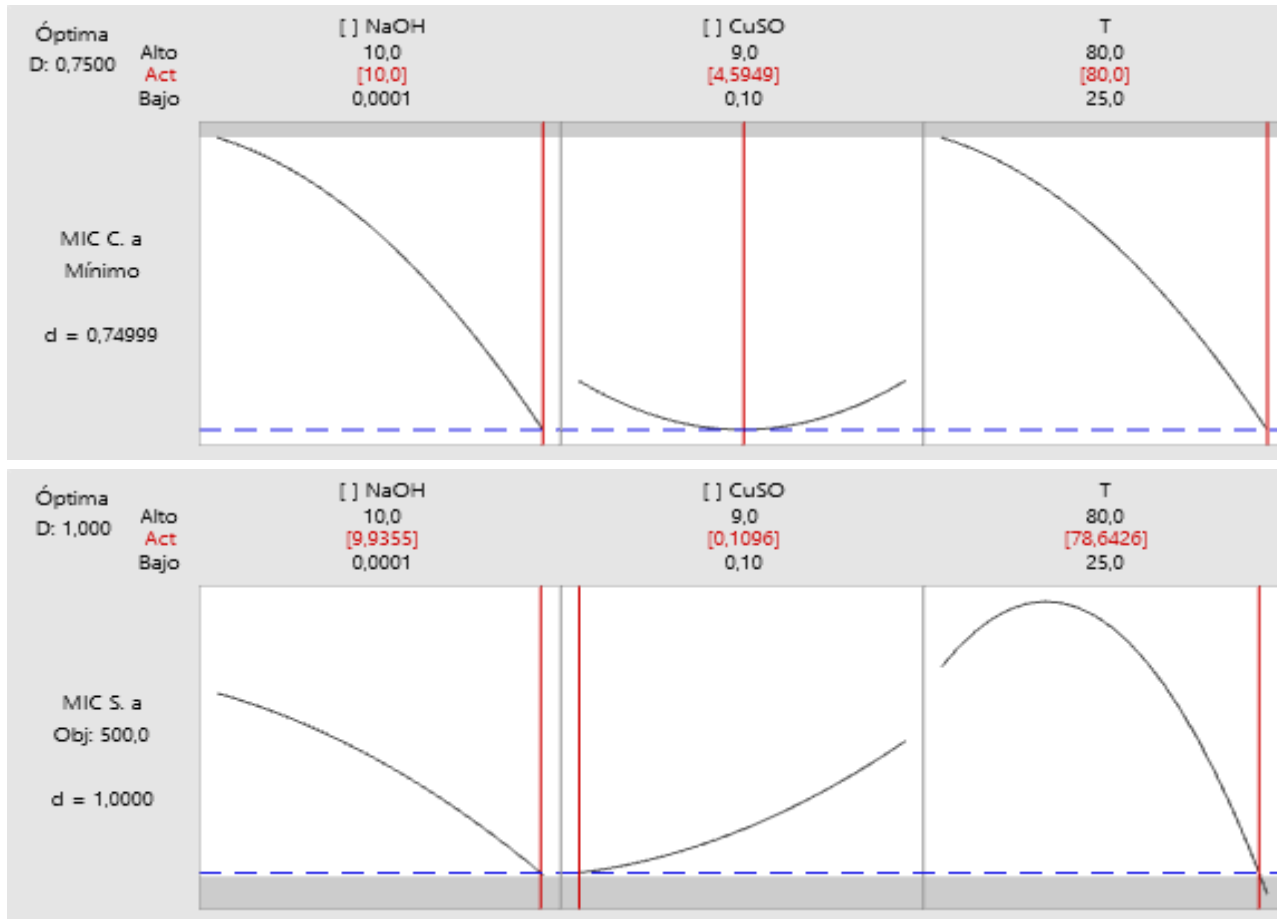
Pareto diagram of standardized  
(answer MIC. *S. aureus*;  $\alpha=0,005$ )



Interaction graph plot for MIC



# Results

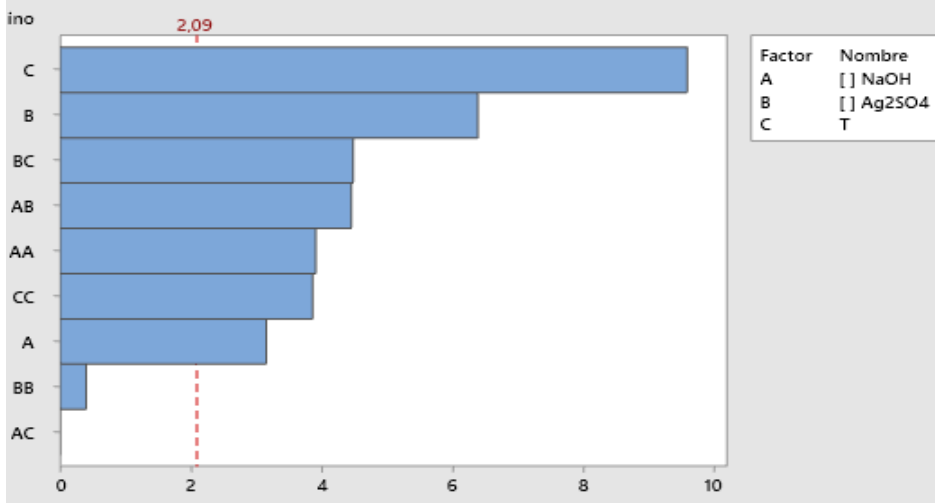


**graph of the best conditions; 10 Mm NaOH concentration, 80°C temperature and 4,5 mm copper sulfate concentration, better synthesis conditions to inhibit Candida albicans, and Candida tropicalis and E.coli.**

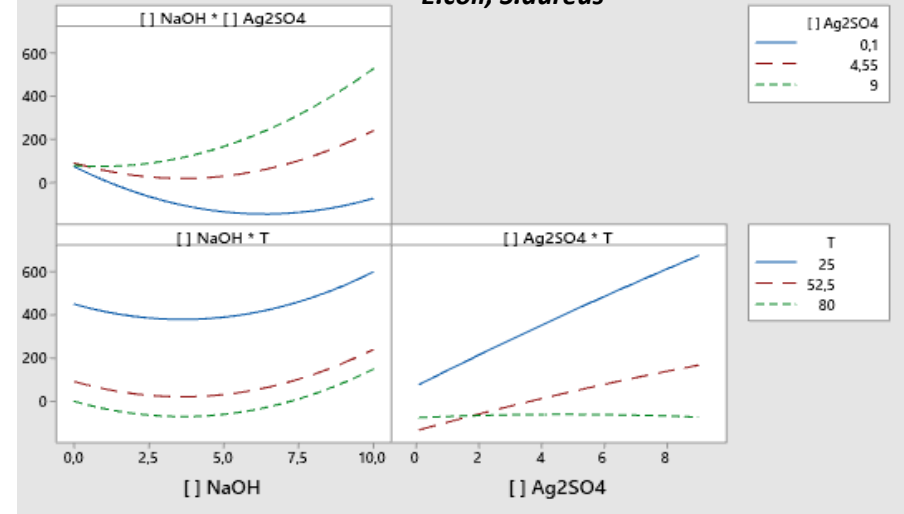
# Results

## Antimicrobial Ag Nps

Pareto diagram of standardized  
(answer MIC. *C. albicans*, *tropicalis*, *E.coli*, *S. aureus*;  $\alpha=0,005$ )

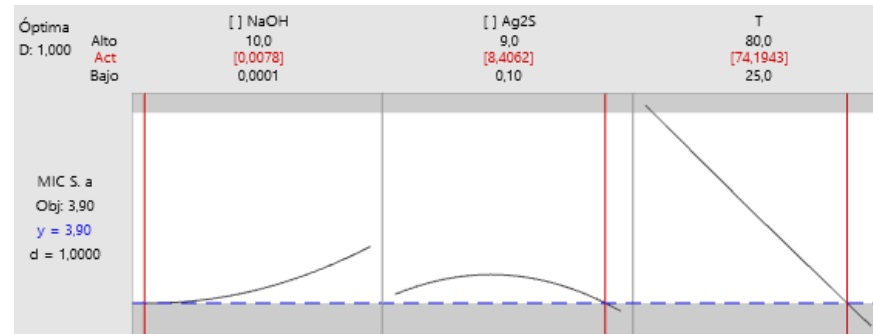
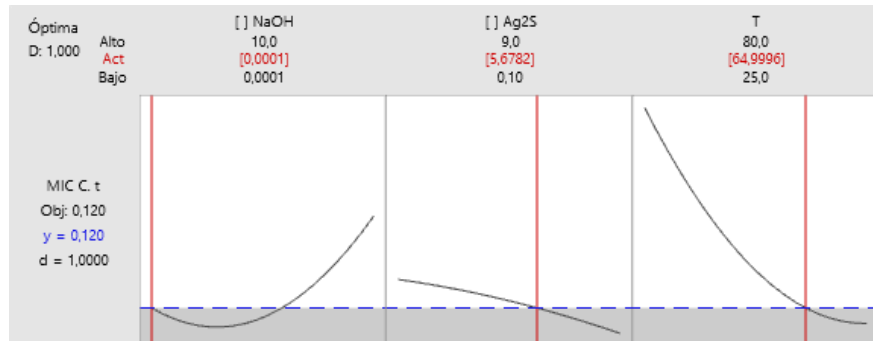
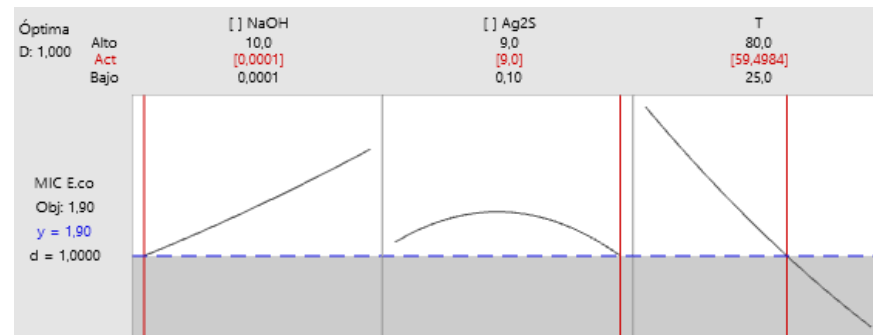
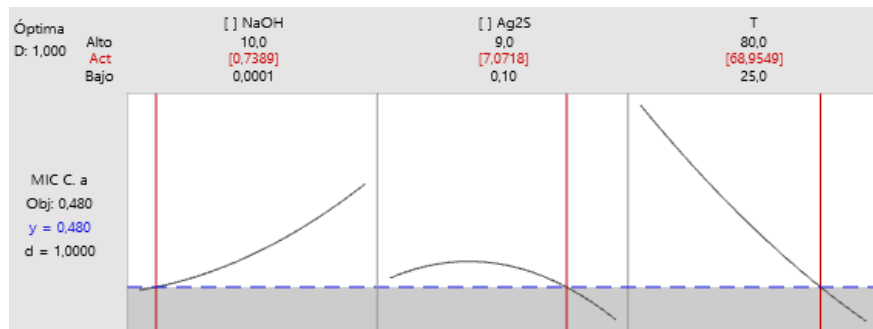


Grafica de interacción para la MIC *C. albicans*, *C. tropicalis*,  
*E.coli*, *S.aureus*



**Pareto and interactions graph; <8 Mm NaOH concentration, 80°C temperature and 9 mM silver sulfate concentration, better synthesis conditions to inhibit microorganisms**

# Results

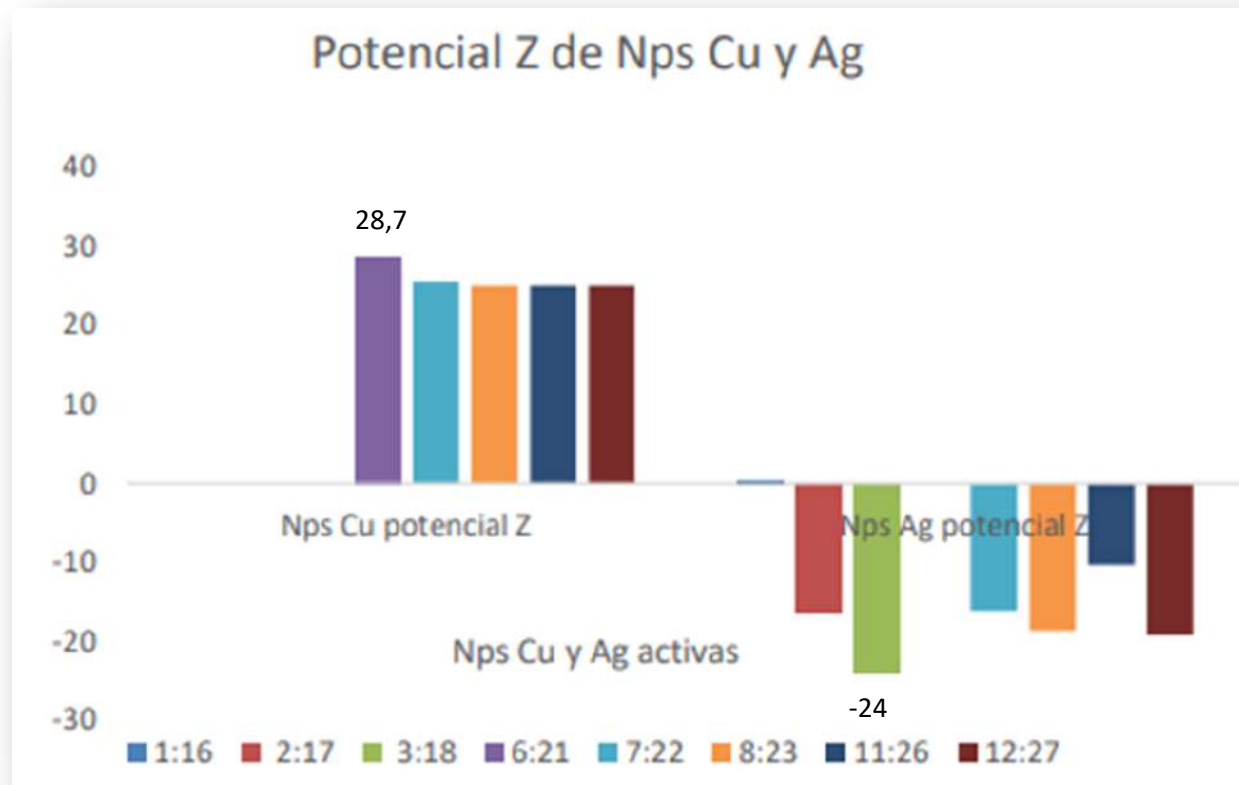


**Graph of the best conditions; 0,0001- 0,1 Mm NaOH concentration, 59,4 – 68,9 °C temperature and 5,6 -8,4 mm silver sulfate concentration, better synthesis conditions to inhibit microorganisms**



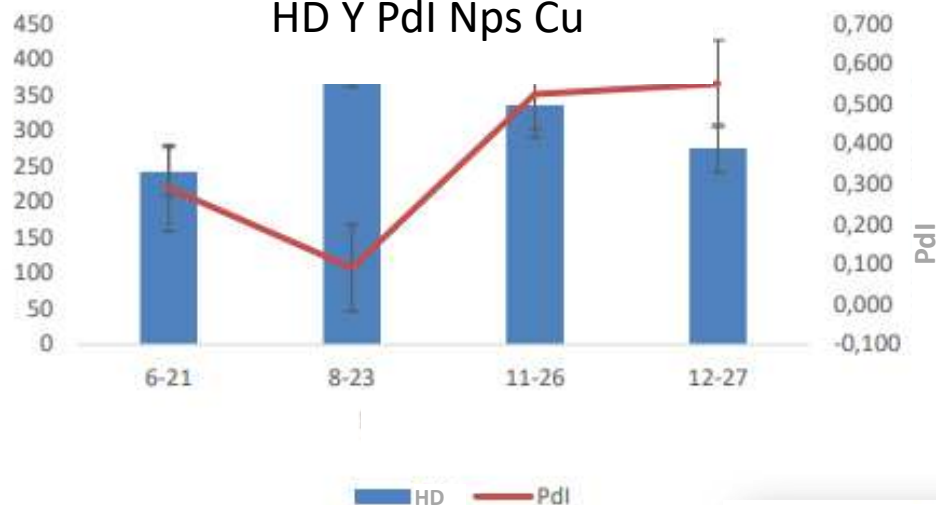
# Results

Physical quematical characteristical



# Results

HD Y Pdl Nps Cu



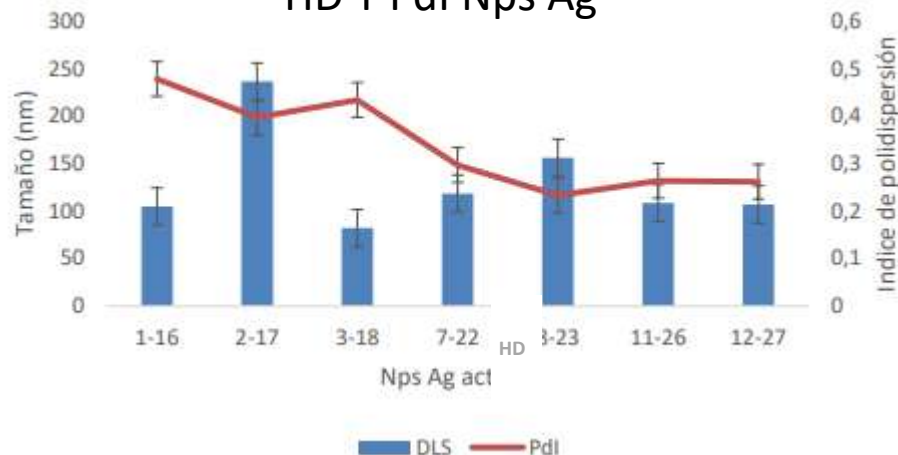
HD: 242 - 395

Pdl: 0,09 - 0,4

HD: 82 - 236

Pdl: 0,2 - 0,4

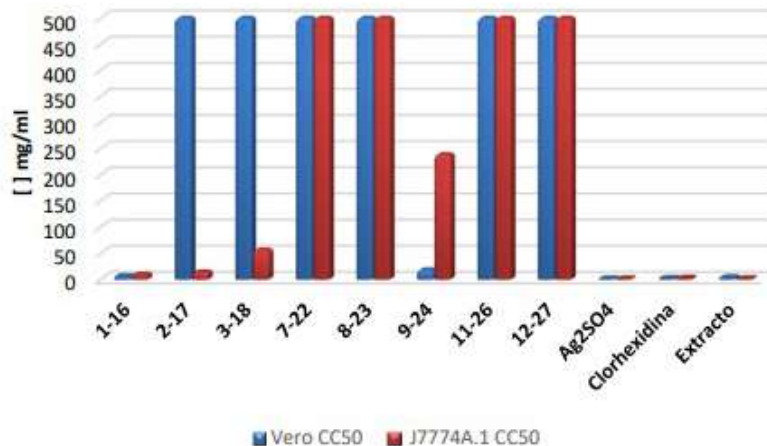
HD Y Pdl Nps Ag



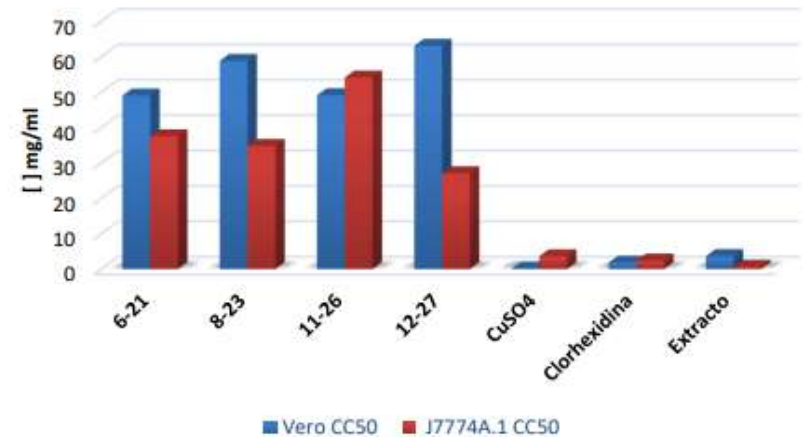
# Results

## Cytotoxic activity Nps Cu and Ag

### Cytotoxicity of Nps Ag



### Cytotoxicity of Nps Cu



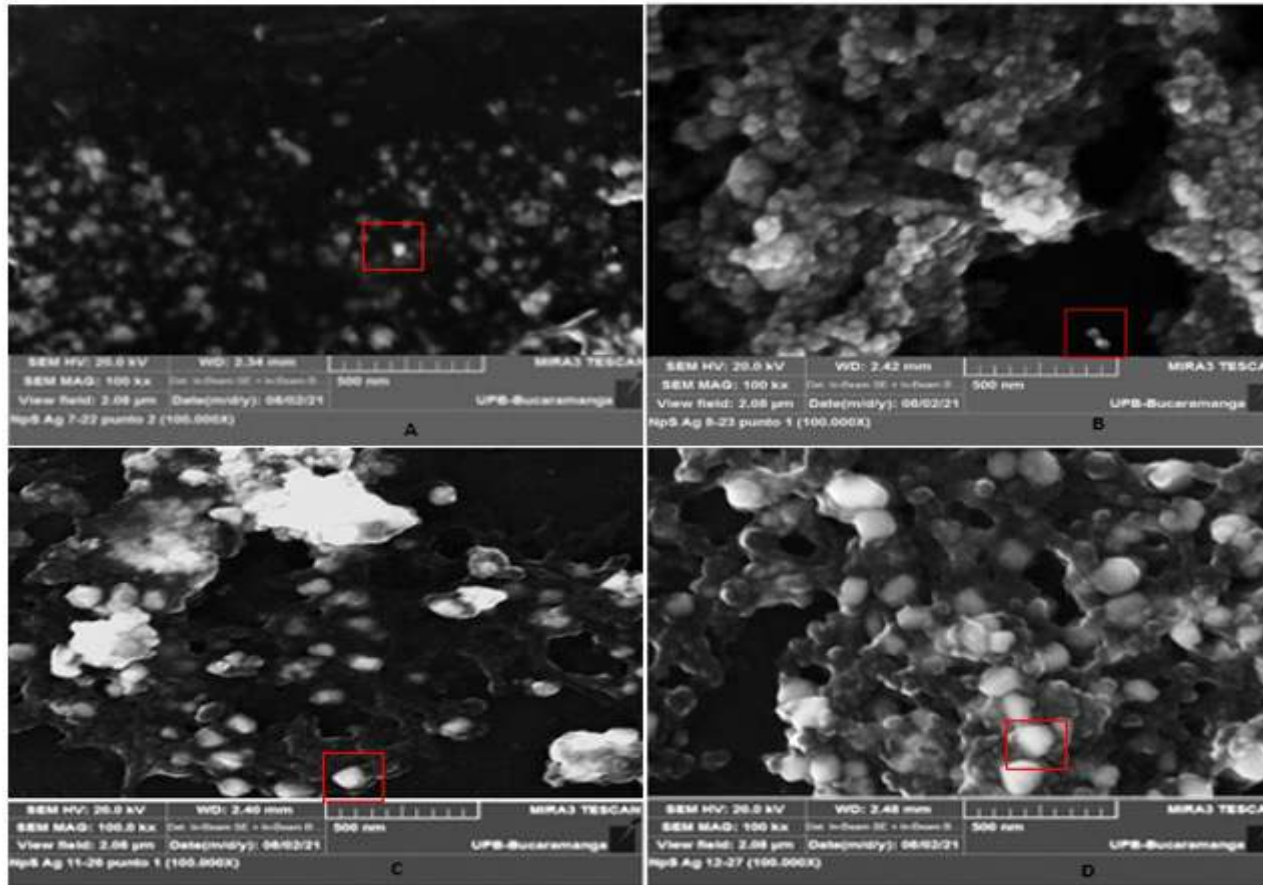
CYTOTOXICITY AND SELECTIVITY INDEX Nps Ag				
	Vero		J7774A.1	
	CC <sub>50</sub>	I.S.	CC <sub>50</sub>	I.S.
7	>500	4166,67	>500	1041,67
8	>500	1041,67	>500	1041,67
11	>500	2083,33	>500	2083,33
12	>500	1041,67	>500	1041,67

CYTOTOXICITY AND SELECTIVITY INDEX Nps Cu				
	Vero		J7774	
	CC <sub>50</sub>	I.S.	CC <sub>50</sub>	I.S.
Nps 8	58,8	3,77	34,76	2,23

**Results of cytotoxic concentration of active nanoparticles for microorganisms evaluated**

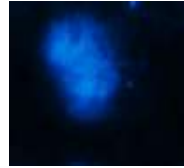
# Results

## Characterization

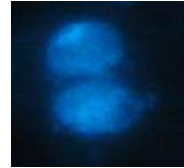


Grade 0   Grade 1   Grade 2   Grade 3   Grade 4

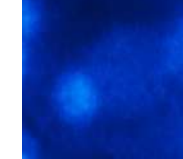
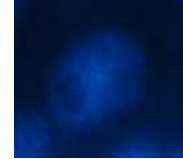
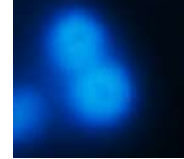
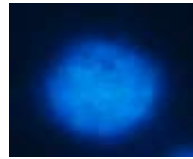
Control (-)



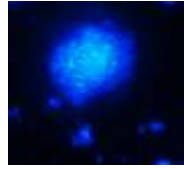
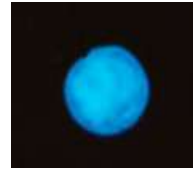
CuNp 8



AgNp 7



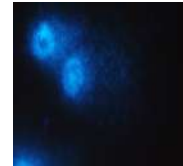
AgNp 8



AgNp 11



AgNp 12



Results  
Genotoxicity in vero cells

# Conclusions

- Ideal extraction conditions 24 horas, pH 4, 30% S/ S
- Better synthesis conditions de Nps de Cu y Ag.
- 53% de AgNps tenían un efecto inhibitorio < 10 mg/ml en los microorganismos evaluados.
- 50% AgNps No cytotoxicity in the cells evaluated



# Bibliography

- Acosta, S., & Andrade, V. (2008). Manual de esterilización para centros de salud, organizacion panamericana de la salud. Biblioteca OPS, Catalogacion En La Fuente.
- Adeyemi, O. S., & Elebiyo, T. C. (2014). Moringa oleifera supplemented diets prevented nickel-induced nephrotoxicity in wistar rats. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2014.
- Aguado, J. M., Ruiz-Camps, I., Muñoz, P., Mensa, J., Almirante, B., Vázquez, L., ... Álvarez-Lerma, F. (2011). Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(5), 345–361.
- Aranaz-Andrés, J. M., Aibar-Remón, C., Limón-Ramírez, R., Amarilla, A., Restrepo, F. R., Urroz, O., ... Gonseth-García, J. (2011). Diseño del estudio IBEAS: prevalencia de efectos adversos en hospitales de Latinoamérica. *Revista de Calidad Asistencial*, 26(3), 194–200.
- Armas Fernández, A., Suárez Trueba, B., Crespo Toledo, N., & Suárez Casal, A. (2015). Resistencia de *Staphylococcus aureus* a la meticilina en aislamientos nosocomiales en un hospital provincial. *Gaceta Médica Espirituana*, 17(3), 80–91.
- Asante, W. J., Nasare, I. L., Tom-Dery, D., Ochire-Boadu, K., & Kentil, K. B. (2014). Nutrient composition of Moringa oleifera leaves from two agro ecological zones in Ghana. *African Journal of Plant Science*, 8(1), 65–71.
- Barros, B. S., Barbosa, R., Dos Santos, N. R., Barros, T. S., & Souza, M. A. (2006). Synthesis and X-ray diffraction characterization of nanocrystalline ZnO obtained by Pechini method. *Inorganic Materials*, 42(12), 1348–1351.



**Universidad  
de Santander**

Presidencia del 410 de 1993 del Ministerio de Educación  
VIGILADA MINEDUCACIÓN

**UDES**

ACREDITACIÓN  
COMPROMISO  
DE TODOS

Universidad  
Industrial de  
Santander



**zumotec**s.a.

ZUMO TECNOLOGIA



**Tecnoparque**  
Nodo Bucaramanga



**Universidad  
de Santander**

Presidencia del 410 de 1993 del Ministerio de Educación  
VIGILADA MINEDUCACIÓN

**UDES**

ACREDITACIÓN  
COMPROMISO  
DE TODOS

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



WIPO | PCT



(10) Número de publicación internacional

WO 2022/168070 A1

(43) Fecha de publicación internacional  
11 de agosto de 2022 (11.08.2022)

## Información del Radicado del proyecto

<b>Título del Proyecto:</b>	Fito-síntesis de nanopartículas de plata y su potencial actividad como agente funcionalizador de catéteres: caracterización y bioactividad en biopelículas formadas por patógenos implicados en infecciones asociadas a dispositivo medico
<b>Número del registro:</b>	104188
<b>Fecha de radicación:</b>	29/05/2023 01:37 PM
<b>Código de Verificación:</b>	07DAE520BA36382FE1356AA4D44EBF3D
<b>Estado:</b>	RADICADO

 Imprimir

