

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

“SÍNTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA EMPLEANDO EXTRACTOS DE RAÍZ  
DE LA CAÑAGRIA (*Rumex hymenosepalus*) Y SUS EFECTOS ANTIMICROBIANOS”

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA CON OPCIÓN EN: BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

FRANCISCO JAVIER ALVAREZ CIREROL

Hermosillo, Sonora

Junio del 2015

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Francisco Javier Alvarez Cirerol la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciada en Biología con Opción en Biotecnología.

---

Dr. Ramón Alfonso Iñiguez Palomares

Director de Tesis

---

Dr. Marco Antonio López Torres

Sinodal Secretario

---

M.C. Gerardina Nubes Ortiz

Sinodal

---

M.C. Sergio Alfonso Cantúa Sesteaga

Suplente

## DEDICATORIA

A Dios, aun y cuando tengo la impresión de que tu no metes tus manos al menos que sea muy necesario, varias veces sentí la dirección de tu mano en la senda que recorría.

A mi familia, a mi madre Sandra Cirerol de quien no solo herede el apellido, si no la paciencia y perseverancia para conseguir las cosas, algo siempre que siempre admirare.

A mi padre Francisco Alvarez, de quien herede su carácter, el primero que confió en mi para embarcarme en esta carrera, apoyándome todo lo que pudo en vida y aun haciéndolo ausente, espero estés orgulloso de mi.

A mis hermanos Gibran, Giselle y Tanya que de una u otra manera están ahí y soportan al abusón de su hermano.

A Alesy Cordova, quien me levanto y apoyo durante todo el tiempo que duro la realización de este trabajo, dándome de sus fuerzas sin perder la esperanza en mí.

A demás familiares y amigos que siempre se preocuparon por mis avances y que gracias a ellos y más soy quien soy hoy en día.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a la Universidad de Sonora que me brindó la oportunidad de ingresar a una institución que me brindo formación humana y académica, lugar donde conocí y aprendí de todo.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por brindarme la carrera que tanto disfruto y que todo su personal me enseñó algo de una u otra forma.

Al Dr. Ramón Íñiguez quien me apoyo y guió durante todo este trabajo, gracias por sus consejos, su paciencia, por su buena disposición y adentrarme en el inicio de lo que es una investigación.

Al comité de tesis, Dr. Marco Antonio López Torres, M. C. Gerardina Nubes y al M. C. Sergio Alfonso Cantúa por guiarme y apoyarme en la formación de este trabajo de investigación.

Al Dr. Amir Maldonado por sus consejos, apoyo en cualquier situación que ameritara, y siempre tener la puerta abierta para mí.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo y especialmente a la Dra. Claudia Íñiguez por su invaluable ayuda en este trabajo, gracias por el apoyo

A la Dra. Ericka Rodríguez y al Dr. Heriberto Acuña quienes siempre estuvieron pendientes de mis avances y me motivaban a seguir adelante aun con los altibajos que se presentara.

Al Instituto Bicultural William Shakespeare donde labore como maestro mientras realizaba parte de este trabajo, principalmente por darme la oportunidad de darme cuenta que la enseñanza también es una de mis pasiones y confirmarme lo que siempre busque, estudiar algo que al momento de aplicarlo en algo laboral, no lo sintiera como un trabajo.

## CONTENIDO

|      |  |     |
|------|--|-----|
|      | DEDICATORIA  | i   |
|      | AGRADECIMIENTOS  | ii  |
|      | LISTA DE TABLAS  | iii |
|      | LISTA DE FIGURAS   | iv  |
|      | RESUMEN  | v   |
| I.   | INTRODUCCIÓN   | 1   |
| II.  | ANTECEDENTES   | 3   |
|      | II.1. Resistencia antibióticos   | 3   |
|      | II.1.1. Panorama mundial.  | 3   |
|      | II.1.2. Agentes antimicrobianos  | 6   |
|      | II.1.2.1 Desarrollo de resistencia en bacterias a antibióticos   | 6   |
|      | II.2. Descripción de las características de las bacterias Gram + y las Gram –  | 7   |
|      | II.2.1. Bacterias patógenas de importancia en humanos  | 10  |
|      | II.3. Plantas genero <i>Rumex</i>  | 11  |
|      | II.3.1 <i>Rumex hymenosepalus</i>  | 12  |
|      | II.4. Nanopartículas   | 15  |
|      | II.5 Síntesis de nanopartículas de plata usando extractos de plantas   | 16  |
| III. | JUSTIFICACIÓN  | 21  |
| IV.  | HIPOTESIS  | 22  |
| V.   | OBJETIVOS  | 23  |
|      | V.1. Objetivos específicos   | 23  |
| VI.  | METODOLOGÍA  | 24  |
|      | VI.1. Obtención de extracto de <i>Rumex hymenosepalus</i>  | 24  |
|      | VI.2. Caracterización de extracto por espectroscopía UV- visible   | 24  |
|      | VI.2.1. Espectros UV-VIS y curvas de calibración de EGCG y EC  | 24  |
|      | VI.2.2. Espectro UV-VIS del extracto, deconvolución y determinación de la concentración de las especies polifenólicas presentes en el extracto | 25  |
|      | VI.3. Obtención de las fracciones del extracto empleando Tetrahidrofurano como solvente de arrastre y caracterización por UV-VIS               | 26  |
|      | VI.4. Síntesis de Nanopartículas de Plata empleando extractos de <i>Rumex hymenosepalus</i> y caracterización de los productos.                | 27  |
|      | VI.4.1. Procedimiento para sintetizar las nanopartículas de plata  | 27  |
|      | VI.4.2. Caracterización de las nanopartículas por UV-VIS y por Microscopía Electrónica de Transmisión.   | 28  |
|      | VI.4.2.1. Espectroscopía UV-VIS  | 28  |
|      | VI.4.2.2. Microscopía Electrónica de Transmisión   | 29  |
|      | VI.5. Evaluación temporal del pH de la reacción de síntesis de las   | 31  |

|          |  |    |
|----------|--|----|
|          | nanopartículas de plata.   |    |
| VI.6.    | Cultivo de bacterias Gram + y Gram – y levadura  | 32 |
| VII.     | RESULTADOS   | 34 |
| VII.1    | Obtención de extracto de <i>Rumex hymenosepalus</i>  | 34 |
| VII.1.1  | Espectros UV-VIS y curvas de calibración de EGCG y EC  | 34 |
| VII.2.   | Espectro UV-VIS del extracto, deconvolución y determinación de concentraciones de moléculas polifenólicas del extracto     | 40 |
| VII.3.   | Obtención de las fracciones del extracto empleando Tetrahidrofurano como solvente de arrastre y caracterización por UV-VIS | 44 |
| VII.4.   | Nanopartículas sintetizadas  | 45 |
| VII.4.1. | Caracterización por espectroscopía UV-VIS  | 45 |
| VII.4.2  | Estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión y Espectroscopía EDS  | 46 |
| VII.5.   | Evaluación temporal del pH de la reacción de síntesis  | 53 |
| VII.6.   | Resultados inhibición microbiana   | 54 |
| VIII.    | DISCUSIONES  | 59 |
| VIII.1.  | Extracto de <i>Rumex hymenosapalus</i> y sus fracciones  | 59 |
| VIII.2.  | Síntesis de Nanopartículas de Plata con extracto de <i>Rumex hymenosepalus</i>   | 60 |
| VIII.3.  | Efectos antimicrobianos de las fracciones del extracto y las nanopartículas plata  | 63 |
| IX.      | CONCLUSIONES   | 65 |
| X.       | RECOMENDACIONES  | 66 |
| XI.      | LITERATURA CITADA  | 67 |

## LISTA DE TABLAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabla I    | Resistencia de Microorganismos a antibióticos.  | 5  |
| Tabla II   | Modo de acción de agentes antimicrobianos.  | 7  |
| Tabla III  | Comparación de capacidad de antioxidantes totales de 30 plantas silvestres de Nuevo México. | 14 |
| Tabla IV   | Comparación de origen, tamaño y forma de síntesis de nanopartículas con plantas.            | 17 |
| Tabla V    | Determinación de coeficiente de extinción molar para EGCG.                                  | 37 |
| Tabla VI   | Determinación del coeficiente de extinción molar para EC en agua a 25°C.                    | 39 |
| Tabla VII  | Comparación entre los coeficientes de extinción molar.                                      | 39 |
| Tabla VIII | Concentración de moléculas polifenólicas del extracto de <i>Rumex</i> .                     | 43 |
| Tabla IX   | Cuantificación de los elementos del espectro EDS.   | 48 |
| Tabla X    | Cuantificación de elementos del espectro EDS.   | 50 |
| Tabla XI   | Tabla general de datos de inhibición.   | 58 |
| Tabla XII  | Cuantificación de fenoles totales.  | 60 |



## LISTA DE FIGURAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1  | Estructura celular de las bacterias Gram positiva.                                       | 9  |
| Figura 2  | Estructura celular bacteria Gram negativa.   | 9  |
| Figura 3  | Morfología de bacterias.   | 11 |
| Figura 4  | Morfología <i>Rumex hymenosepalus</i> .  | 13 |
| Figura 5  | Estructuras químicas de las moléculas catequinas EC y EGCG.                              | 25 |
| Figura 6  | Microscopio Electrónico de Transmisión de la Universidad de Sonora.                      | 30 |
| Figura 7  | Rejilla de Cu para MET.  | 31 |
| Figura 8  | Sensor de pH marca PASCO.  | 31 |
| Figura 9  | Proceso de prueba de inhibición.   | 33 |
| Figura 10 | Rodajas de raíz deshidratada y extracto obtenido.  | 34 |
| Figura 11 | Espectro UV-VIS de calibración EGCG y EC.  | 35 |
| Figura 12 | Curva de calibración de EGCG.  | 36 |
| Figura 13 | Absorción de soluciones acuosas de EC a distintas concentraciones.                       | 38 |
| Figura 14 | Curva de calibración de EC en agua a 25 °C.  | 38 |
| Figura 15 | Espectro UV-VIS del extracto de <i>Rumex hymenosepalus</i> .                             | 40 |
| Figura 16 | Ajuste experimental del espectro UV-VIS del extracto.                                    | 42 |
| Figura 17 | Deconvolución del espectro UV-VIS del extracto de <i>R. hymenosepalus</i> .              | 42 |
| Figura 18 | Estructura química del Resveratrol glucosado.  | 43 |
| Figura 19 | Espectros UV-VIS de fracciones A y B.  | 44 |
| Figura 20 | Espectros UV-VIS de nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de <i>Rumex</i> . | 46 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 21 | Fotografía por MET de nanopartículas sin centrifugar.  | 47 |
| Figura 22 | Espectro EDS de Nanopartículas de plata sin centrifugar.   | 47 |
| Figura 23 | Fotografía TEM nanopartículas purificadas.   | 49 |
| Figura 24 | Espectro EDS NpAg después de centrifugación.   | 49 |
| Figura 25 | Población de nanopartículas de plata centrifugadas.  | 50 |
| Figura 26 | Distribución de tamaños de nanopartículas de plata.  | 51 |
| Figura 27 | Fotografía de alta resolución de nanopartículas de plata.  | 52 |
| Figura 28 | Fotografía de alta resolución de nanopartículas de plata.  | 53 |
| Figura 29 | Evolución temporal del pH de la reacción de síntesis de Nanopartículas de plata.   | 54 |
| Figura 30 | Pruebas de inhibición de nanopartículas de plata en bacterias Gram negativas.  | 55 |
| Figura 31 | Resultados de inhibición de nanopartículas de plata en bacterias Gram positivas.   | 55 |
| Figura 32 | Inhibición de nanopartículas de plata en levadura.   | 56 |
| Figura 33 | Evolución temporal del máximo de los espectros de absorción de las nanopartículas de plata sintetizadas con <i>Rumex hymenosepalus</i> . | 61 |
| Figura 34 | Mecanismo propuesto para la síntesis y estabilización de nanopartículas de plata empleando EGCG anclado a fibras de colágeno.            | 62 |
| Figura 35 | Prueba de difusión del disco con diferentes tamaños de nanopartículas de plata contra la <i>E. coli</i> .                                | 64 |

## RESUMEN

En el presente trabajo se empleó una planta de la región del estado de Sonora, *Rumex hymenosepalus* (Cañagria), para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de plata debido a su alto contenido de polifenoles, después de cada proceso de síntesis se llevó a cabo su caracterización por diversas metodologías, para tener certeza de que el producto obtenido era lo que se buscaba. Una vez comprobada la presencia de nanopartículas de plata, éstas fueron sometidas a pruebas para demostrar su capacidad inhibitoria a microorganismos, entre ellas están bacterias Gram positivas, Gram negativas y una levadura. Los resultados indican que las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de *Rumex hymenosepalus* presentan efectos inhibitorios en todos los microorganismos evaluados, siendo mayor el efecto sobre la levadura *Candida albicans*, siguiendo con la Gram positiva y la Gram negativa. Se obtuvo además que los extractos presentan efectos inhibitorios sobre las Gram positivas pero no en la levadura ni en las Gram negativas. Los resultados anteriores nos permiten asegurar que los extractos de raíz de la planta *Rumex hymenosepalus* permiten sintetizar nanopartículas de plata en un método sencillo de un solo paso y de bajo impacto ambiental que genera productos estabilizados por las mismas moléculas presentes en la planta y que dichos nanomateriales presentan las características apropiadas de tamaños que les confieren actividad inhibitoria sobre microorganismos diversos.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde que Anton Van Leeuwenhoek usando un microscopio de un lente simple observo pequeños organismos, se pensó que las enfermedades podían estar asociadas con estos diminutos seres.

Un día de los años veinte del siglo XX un joven escocés de nombre Alexander Fleming, trabajaba en un laboratorio del hospital Saint Mary de Londres y su intento por luchar contra enfermedades infecciosas, dejó una caja de Petri con *Staphylococcus aureus* y la guardó, dejándola olvidada por semanas, al volver a revisar la caja, observó que fue contaminada por hongos, pero notó que alrededor de los hongos no había colonias de bacterias, sospechó entonces que el hongo debía difundir alguna clase de sustancia inhibitoria contra el crecimiento de bacterias, nace con esto, el primer antibiótico, nombrando al hongo *Penicillium notatum*.

Con el descubrimiento de los antibióticos empezó, de cierta manera, una presión sobre los microorganismos, una presión que desde entonces ha hecho que se adapten y se fortalezcan ante los antibióticos, esto debido a que muchos antibióticos son compuestos sencillos y actúan bloqueando algo de una parte del metabolismo de los microorganismos (Amabile, 2010).

Con esto, hemos llegado a un punto en que no puede estarse al día con la producción de nuevos antibióticos contra bacterias con la velocidad que estas se adaptan y vuelven ineficiente el antibiótico.

Entre las opciones para enfrentarse a este reto se encuentra la nanotecnología, que se aprovecha de la materia en medida nano. La palabra nano se utiliza para indicar la milimillonésima parte de un metro o  $10^{-9}$ . Las nanopartículas son grupos de átomos y su tamaño de 1 a 100 nm. La nanobiotecnología puede usarse como alternativa para los métodos químicos y físicos de la síntesis de nanopartículas (Vadlapudi, 2013).

En estos tamaños las propiedades de las sustancias cambian y sus fenómenos también, el presente estudio está enfocado al uso de nanopartículas, y a la síntesis “verde” de éstas,

usando entre los precursores a una planta de la región Noroeste de México, la cañagria *Rumex hymenosepalus*.

En el estudio se pone a prueba si las nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de raíz de *Rumex hymenosepalus* tienen un efecto inhibitorio sobre diferentes microorganismos.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Resistencia a antibióticos

**II.1.1. Panorama mundial:** Desde el descubrimiento de la penicilina se han descubierto una docena de nuevos antibióticos y optimizado o sintetizado cerca de un centenar, sin embargo, el uso excesivo e incorrecto de estos mismos, provocaron la aparición de bacterias resistentes.

Actualmente podemos hacer frente a estos microorganismos, al contar con gran variedad de antibióticos comercialmente disponibles en cualquier lado, al primer síntoma de una enfermedad, rápidamente hacemos uso de este maravilloso avance de la ciencia. Pero, eso mismo nos está llevando a crear bacterias más resistentes a estos antibióticos. Al parecer no hemos sabido aplicar la teoría de la evolución a estos seres vivos, siempre debemos recordar que todo organismo que no se adapta, muere, incluyendo a las bacterias, quienes se han ido adaptando, han sobrevivido y se han reproducido, haciendo de nuestros esfuerzos de crear nuevos antibióticos, esfuerzos inútiles por la rápida manera en que se vuelven resistentes.

Los antibióticos son compuestos relativamente sencillos, producidos por bacterias u hongos que atacan específicamente a las bacterias. Interfieren en algún paso del metabolismo donde encuentran un blanco adecuado (de Rivas, 2006)

Durante los años de 1940 a 1970 fue la época dorada del descubrimiento de nuevos antibióticos, ya sean naturales o sintéticos, pasando esta época, se dio una desaceleración en la creación de nuevos antibióticos, el principal factor de esto es por la falta de inversión farmacéutica, desalentada por la rapidez con la cual cada nuevo antibiótico pierde su eficacia. En una entrevista realizada a Alexander Flemming por el diario New York Times en 1945, ya aconsejaba evitar el empleo abusivo del fármaco para contener el desarrollo de resistencia microbiana. En la actualidad, nos enfrentamos a un problema de escala mundial. La directora de la Organización Mundial de Salud (OMS) Margerite Chan en el 2013, lanzó en grito de alerta que nos acercamos a un periodo post-antibióticos, lo que significará el fin de la medicina moderna, donde una infección de garganta por estreptococos (bacterias en forma redondeada formadora de cadenas) o un raspón en la rodilla volverán a ser mortales.

Solamente en Estados Unidos, las especies de bacterias resistentes a antibióticos están cerca de superar a las muertes que causa el sida en ese país (Aníbal, 2010).

Aunque la amenaza de bacterias que crean resistencia ante antibióticos crece día a día, esta varía dependiendo de los tipos de países de los que se está hablando; existe una diferencia entre los países desarrollados a los que están en vías de desarrollo, dejando un poco de lado el abuso de antibióticos y la presión selectiva que conlleva el hacerlo en las bacterias, en países en desarrollo, existen características peculiares que pueden influir de alguna manera indirectamente a la creación de bacterias resistentes. Las ciudades de países en desarrollo no cuentan con una buena infraestructura urbana, que sumada a la falta de cultura por el manejo adecuado de la basura, los animales callejeros e higiene en general, convierte el polvo que respiramos y que cae sobre nuestra comida en un peligro para nuestra salud.

La problemática más grande de la resistencia de las bacterias a los antibióticos en todo el mundo es su abuso. En México, el uso de antibióticos no está regulado, no hay forma de buscar información en una base de datos y que nos arroje cuantas personas han tomado penicilina y que dosis en el periodo en un año. De igual manera las bacterias no solo afectan al ser humano, la industria agrícola también se ve afectada por las cepas cada vez más resistentes, y no hay manera de saber si el uso de antibióticos por la industria es poco, moderado o mucho en comparación a los Estados Unidos, en el sector de la agricultura, los herbicidas que se utilizan a nivel mundial, son probados rutinariamente para la toxicidad, pero no para los efectos subletales en los microbios. Muchos herbicidas se sabe que inducen un tipo de resistencia adaptativa a múltiples antibióticos, haciendo que las cepas de bacterias disminuyan su susceptibilidad a los antibióticos (Kurenbach et. al., 2015). También hay que considerar, en relación con salud humana, el actual uso de antibióticos genéricos, donde se desconoce si el componente presenta la misma actividad que los de patente.

En la tabla I publicada de un estudio realizado en la Ciudad de México, donde las enfermedades respiratorias son la principal causa de consulta médica (Fuentes, 2010), el patógeno bacteriano más comúnmente detectado en las personas fue *Streptococcus pneumoniae*, seguido de *Haemophilus influenzae*, etc. Aquí se puede apreciar el porcentaje de éxito de la aplicación de antibióticos ante la presencia de estos organismos.

Las bacterias tienen más tiempo de vida sobre la tierra que el ser humano y con el fin de sobrevivir han desarrollado diversos mecanismos que les permiten responder a presiones selectivas ejercidas tanto por el entorno, como por el hombre, principalmente hacia patógenas para él, mismo como para animales de su interés, con agentes anti-microbianos, y estos microorganismos han respondido creando mecanismos de resistencia contra antibióticos.

Tabla I. Resistencia de Microorganismos a antibióticos

| Organismo                        | Antibiótico                 | Resistencia (%) | Información adicional                   |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------|---|
| <b>Adquirida en la comunidad</b> |                             |                 |   |
| <i>S. pneumonia</i>              | Penicilina                  | 70              | No susceptibles (resistente intermedio) |
|                                  | claritromicina              | 49              |   |
| <i>Salmonella spp.</i>           | Ampicilina                  | 66              | 14% en 1994 - 1995                      |
|                                  | Co-trimoxazol               | 66              | 27% en 1994 - 1995                      |
|                                  | Cloranfenicol               | 20              | 20% en 1994 - 1995                      |
|                                  | Ceftriaxona                 | 12              |   |
| <i>Shigella spp.</i>             | Ampicilina                  | 81              | 63% en 1994 - 1995                      |
|                                  | Co-trimoxazol               | 81              | 59% en 1994 - 1995                      |
|                                  | Cloranfenicol               | 11              | 37% en 1994 - 1995                      |
| <i>E. coli (uropatogenico)</i>   | Ampicilina                  | 74              |   |
|                                  | Co trimoxazol               | 60              |   |
|                                  | Ciprofloxacina              | 33              |   |
|                                  | Ceftazidina                 | 8               |   |
| <i>M. tuberculosis</i>           |                             | 17              | Multi fármaco resistencia               |
| <b>Patógenos nosocomiales</b>    |                             |                 |   |
| <i>Klebsiella spp.</i>           |                             | 28              | BLEE                                    |
| <i>S. aureus</i>                 | Meticilina                  | 48              |   |
| <i>E. faecium</i>                | Vancomicina                 | 33              |   |
| <i>P. aeruginosa</i>             | Amikacina                   | 20              |   |
|                                  | ceftazidima                 | 39              |   |
|                                  | imipenem                    | 43              |   |
|                                  | levofloxacina               | 40              |   |
|                                  | Piperacilina/<br>tazobactam | 28              |   |
| <i>Acinetobacter spp.</i>        | Amikacin                    | 40              |   |
|                                  | Ceftazidima                 | 72              |   |
|                                  | Levofloxacina               | 51              |   |
|                                  | Piperacilina                | 51              |   |



**II.1.2. Agentes antimicrobianos:** Las bacterias pueden estar en contacto con diferentes tipos de antibióticos, estos medicamentos actúan inhibiendo vías específicas de la supervivencia de la bacteria y éstas a su vez, con el tiempo han encontrado formas alternativas para bloquear la acción de los antibióticos por diferentes mecanismos. En la Tabla II se muestran algunos grupos de antibióticos y la forma en que actúan sobre las bacterias (Byarugaba, 2010).

**II.1.2.1. Desarrollo de resistencia en bacterias a antibióticos:** La resistencia bacteriana se puede generar por 2 maneras principales:

- a) Intrínseca o natural mediante la cual los microorganismos naturalmente no poseen un blanco o destino para los medicamentos suministrados, por lo que el fármaco no les afecta a, también puede ser que tienen baja permeabilidad a los agentes antimicrobianos debido a las diferencias en la naturaleza química de la medicina aplicada.
- b) Resistencia adquirida en la cual no pueden ser afectados por el fármaco.

La resistencia adquirida funciona por varios mecanismos, estos pueden ser

- La presencia de una enzima que inactiva el agente antimicrobiano.
- La presencia de una enzima alternativa para la enzima que es inhibida por el agente antimicrobiano.
- Expulsión activa del agente antimicrobiano
- Sobreproducción de la diana/objetivo del agente antimicrobiano
- Expresión o supresión de un gen in vivo
- Mecanismos sin conocer y a estudiar.

Tabla II. Modo de acción de agentes antimicrobianos

| <b>Grupo de agentes antimicrobianos</b> | <b>Efectos en bacterias</b> | <b>Modo de acción en general</b>        |
|---|-----------------------------|---|
| <b>Penicilina</b>                       | Bactericida                 | Inhibición de síntesis de pared celular |
| <b>Cefalosporinas</b>                   | Bactericida                 | Inhibición de síntesis de pared celular |
| <b>Carbapenemas</b>                     | Bactericida                 | Inhibición de síntesis de pared celular |
| <b>Antibióticos polipéptidicos</b>      | Bactericida                 | Inhibición de síntesis de pared celular |
| <b>Quinolonas</b>                       | Bactericida                 | Inhibe síntesis de ADN                  |
| <b>Metronidazol</b>                     | Bactericida                 | Inhibe síntesis de ADN                  |
| <b>Rifamicinas</b>                      | Bactericida                 | Inhibe síntesis de ADN                  |
| <b>Lincosamidas</b>                     | Bactericida                 | Inhibición de síntesis de proteínas     |
| <b>Aminoglicosidos</b>                  | Bactericida                 | Inhibición de síntesis de proteínas     |
| <b>Macrolidos</b>                       | Bacteriostática             | Inhibición de síntesis de proteínas     |
| <b>Tetraciclinas</b>                    | Bacteriostática             | Inhibición de síntesis de proteínas     |
| <b>Cloramfenicol</b>                    | Bacteriostática             | Inhibición de síntesis de proteínas     |
| <b>Sulfonamidas</b>                     | Bacteriostática             | Inhibición competitiva                  |

## II.2. Descripción de las características de las bacterias Gram + y las Gram – y levadura.

En general las bacterias pueden ser en forma de cocos, espirales o en forma de bacilos, su tamaño varía entre 1  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ .

Las bacterias se clasifican en bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas en función a sus estructuras celulares, esta diferencia afecta la susceptibilidad ante antibióticos

específicos. La membrana celular de las bacterias está formada por una bicapa de fosfolípido en la cual están embebidas las proteínas de membrana. El espesor de la membrana es de 7nm. La principal diferencia estructural se presenta en la composición de la pared celular.

Las Bacterias Gram Positiva tienen una pared celular rígida debido a la capa de péptidoglicanos que la forman, y tiene un espesor de 25 nm; estas moléculas junto con las del ácido teicoico encontrado en la pared celular permiten la permeabilidad de la membrana al cristal violeta. En la figura 1 se presenta la estructura de una célula Gram Positiva, la pared celular contiene además cadenas de aminoácidos como la N-Acetilglucosamina y el Ácido N-Acilmurámico.

Las Bacterias Gram Negativas poseen una pared celular formada por una bicapa de fosfolípidos es una membrana externa que presenta un espacio de separación entre esta y la membrana celular conocido como periplasma. La estructura es menos rígida ya que contiene menor cantidad de peptidoglicanos colocados en una sola capa. La membrana externa que forma la pared celular (Figura 2) presenta además sobre su superficie lipopolisacáridos y porinas.

La diferenciación entre bacterias Gram Positivas y Negativas se realiza usando la tinción de Gram el cual consta de 4 etapas:

1. Utilizamos el colorante cristal violeta para teñir las bacterias (las bacterias Gram Positivas y las Gram Negativas se tiñen de color púrpura).
2. Se agrega una solución de yodo para permeabilizar la membrana (las bacterias presentan cambios en el color azul-púrpura en ambos casos).
3. Se agrega etanol al 95% o una mezcla de etanol-acetona (las bacterias Gram positivas permanecen azul-púrpura, mientras que las bacterias Gram negativas pierden el color).
4. Finalmente se aplica el colorante safranina y se observa cambios en el color (las bacterias Gram positiva permanece sin cambio en el color mientras que las Gram negativas se tiñen de color rojo-naranja).

La tinción Gram permite determinar la forma, el tamaño y el arreglo de las células.

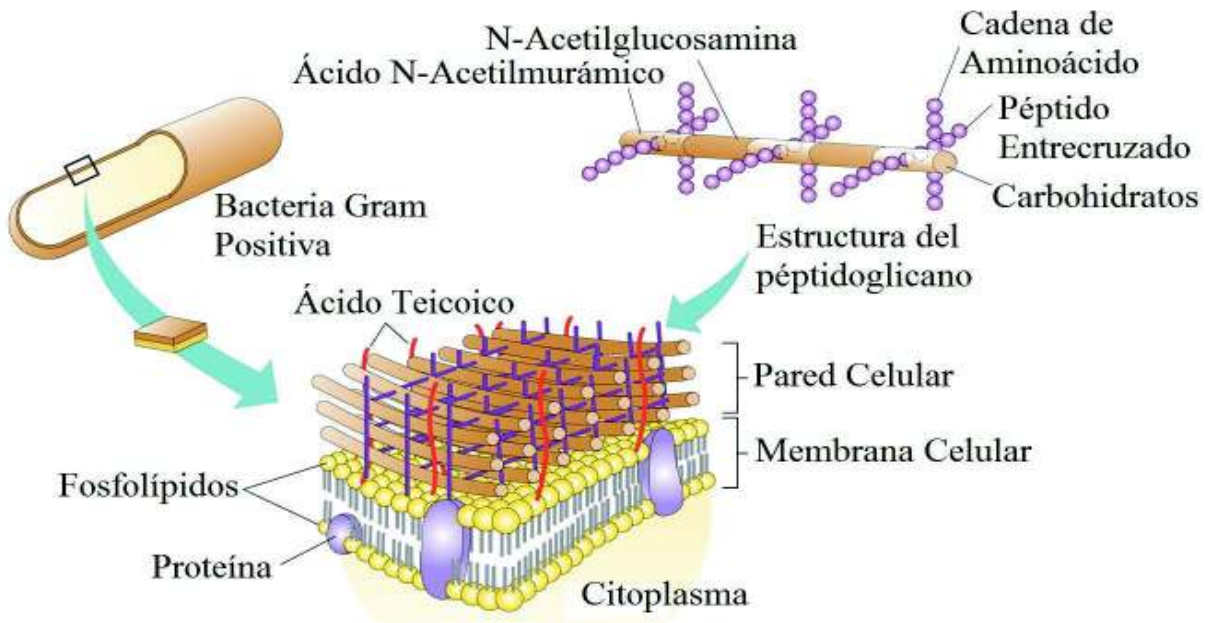


Figura 1. Estructura celular de las bacterias Gram Positivas (Pommerville et al., 2011)

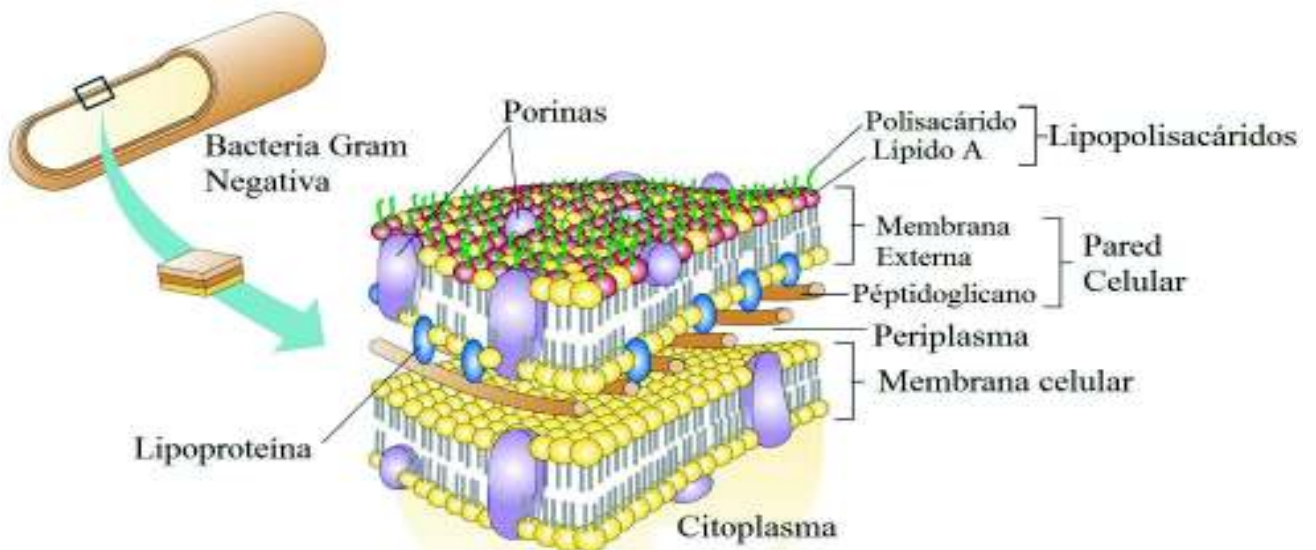


Figura 2. Estructura celular de las bacterias Gram Negativas. (Pommerville et al., 2011)

**II.2.1. Bacterias patógenas de importancia en humanos:** *Escherichia coli*: Es la principal representante de la flora intestinal normal del hombre y los animales, sin embargo, existen cepas productoras de diarreas que pueden dar lugar a cuadros clínicos leves, evolucionar hasta la diarrea persistente u originar complicaciones que pueden llegar hasta la muerte del paciente.

*Salmonella*: Es una de las enterobacterias que es causa importante de afectación en la salud del hombre. El primer microorganismo descrito en este género fue la *S. typhi* por Eberth en 1880 y Gaffky en 1884. La infección por *Salmonella* en el hombre puede presentarse de diversas formas clínicas, las cuales incluyen tanto las formas intestinales autolimitadas como las de localización; los cuadros más comunes son los de enterocolitis no complicadas, donde después de haber ingerido agua, alimentos contaminados o por medio de manos contaminadas entra *Salmonella* en el organismos y después de 8 a 48 horas de incubación aparecen los síntomas que son náuseas, vómitos, cólicos, diarreas y fiebre.

*Pseudomonas aeruginosa*: Es un patógeno oportunista que se presenta cuando los mecanismos de defensa del hospedero están alterados, suprimidos o comprometidos, siendo necesaria la presencia de factores predisponentes para que ocurra la infección; pueden ser quemaduras, diabetes, infusiones intravenosas de medicamento y líquidos. Produce infección de las heridas y quemaduras, en las cuales origina un pus de color azul verdoso y diversas infecciones.

*Staphylococcus aureus*: Son cocos Gram positivas con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , que se agrupan irregularmente en forma de racimos de uva. Provoca lesiones de piel e infecciones humanas como la foliculitis, celulitis, entre otras, puede extenderse a menudo desde una lesión hacia otras regiones de la piel.

*Candida albicans*: Forman parte de la flora normal de la piel, mucosas, tracto gastrointestinal y vagina. Producen enfermedad cuando las defensas del paciente son afectadas por algún factor predisponente, por lo cual se considera una levadura oportunista.

Los cuadros clínicos pueden ir desde una infección cutánea benigna hasta las formas diseminadas, generalmente fatales. Este microorganismo afecta a todas las edades y sexos

*Listeria monocytogenes*: Produce listeriosis, es una enfermedad que provoca septicemia, meningitis y encefalitis, habitualmente precedidas de síntomas parecidos a los de la gripe, incluida la fiebre. También se le asocia con problemas gastrointestinales (Liop et al, 2001).

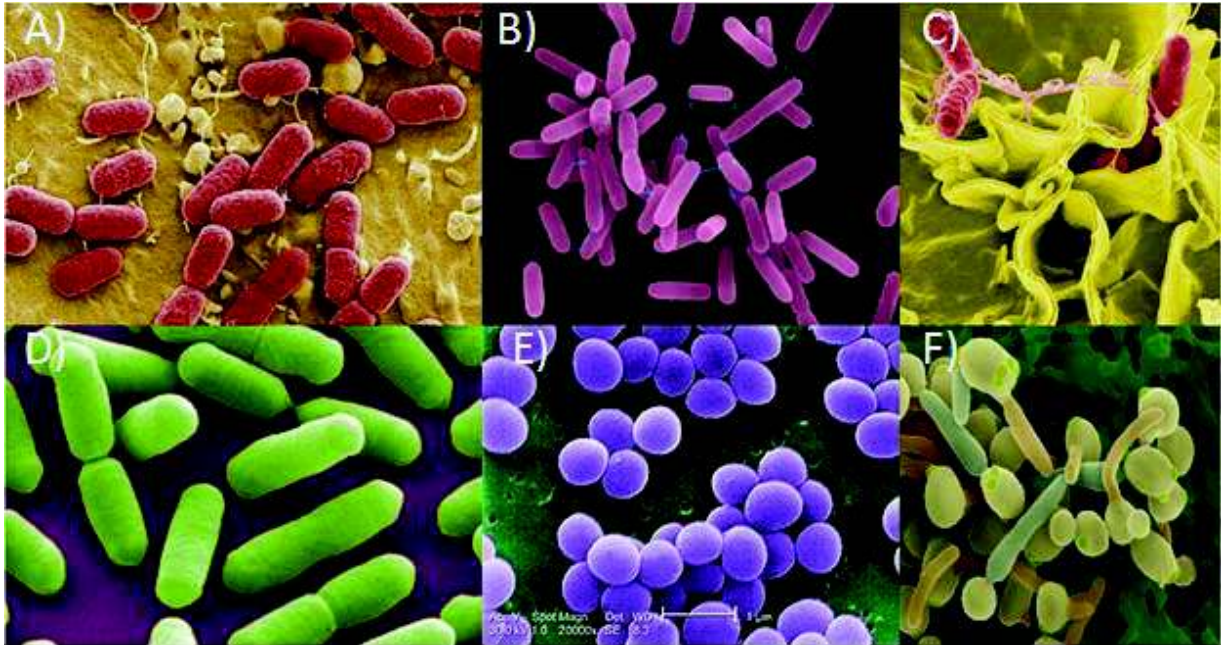


Figura.3 Morfología de los microorganismos A) *E. coli* B) *Pseudomonas aeruginosa*, C) *Salmonella*, D) *Listeria*, E) *S. aureus* y F) *Candida albicans* (Fuente: Internet) (<http://www.cbc.ca/news/health/understanding-e-coli-symptoms-spread-prevention-1.786624>), B) <http://ehp.niehs.nih.gov/120-a190/> C) (Rock Mountain Laboratories) D)([http://www.helmholtz.de/fileadmin/user\\_upload/01\\_forschung/Aktuelle\\_Einblicke/03\\_Gesundheit/Listeria\\_Monocytogenes\\_HZI\\_MRhode\\_300x200.jpg](http://www.helmholtz.de/fileadmin/user_upload/01_forschung/Aktuelle_Einblicke/03_Gesundheit/Listeria_Monocytogenes_HZI_MRhode_300x200.jpg)), E)(Centers for Disease Control and Prevention's Public Health) y F)(<http://thotinstitut.info/wp-content/uploads/2012/12/candida-albicans.jpg>)

### II.3. Plantas genero *Rumex*

El género *Rumex* comprende varias especies, de los cuales las hojas y las raíces se han utilizado en la medicina tradicional, actualmente existe un creciente interés en muchas de las

especies de *Rumex* debido a sus efectos biológicos como lo son de manera purgativa, psicofarmacológica, agentes antioxidantes, anti-flamatorios, antidiarreico, etc. (Ferrerres et. al., 2006).

**II.3.1: *Rumex hymenosepalus*.** Esta planta es conocida en México como la Hierba colorada, cañagria. La *Rumex hymenosepalus* ha tenido durante mucho tiempo una reputación muy positiva y la gran capacidad de su extracto tánico para curtir pieles y producir cuero de gran calidad.

Es una planta perenne (Figura 4), con flores que presentan los dos aparatos reproductores, siendo bisexual y sus flores son de color rojo-rosado, produce gran cantidad de semillas y son reunidos en pequeños grupos sobre los pedicelos. Cuando la planta madura se torna en un color brillante marrón y se asemeja al trigo.

El primer estudio reportado de esta planta fue en 1876, cuando se realizó el primer análisis de sus raíces y se reportó contenía 23.2% de taninos (Voelcker, 1886). En 1891 el Laboratorio de Investigación de cuero de Vienna reportó que en sus pruebas, la piel quedaba bien bronceada y manejable. La planta *R. hymenosepalus* se encuentra por el suroeste de Estados Unidos en Nuevo México, Texas, Arizona, Nevada y California, en el noroeste de México principalmente en Chihuahua, Sonora y en partes de Coahuila y Baja California.

Desde hace mucho tiempo la *R. hymenosepalus* ha sido utilizada como una planta medicinal y de especial interés en la etnobotánica. En un estudio donde se comparaba la cantidad de antioxidantes de 30 especies de plantas medicinales, se observó que la *R.hymenosepalus* presenta una cantidad importante de capacidad antioxidante por gramo (Tabla III).

Se ha reportado en la cañagria un alto contenido de taninos (Krochmal, 1951), considerando su utilidad para tratar gingivitis (VanderJagt et. al., 2001). Sus hojas son usadas como alimento, para aliviar fiebres y afecciones gastrointestinales. La cocción de sus raíces es ingerida se le atribuyen propiedades para purificar la sangre y para tratar quemaduras e irritaciones de la piel (Rivero et. al. 2005).

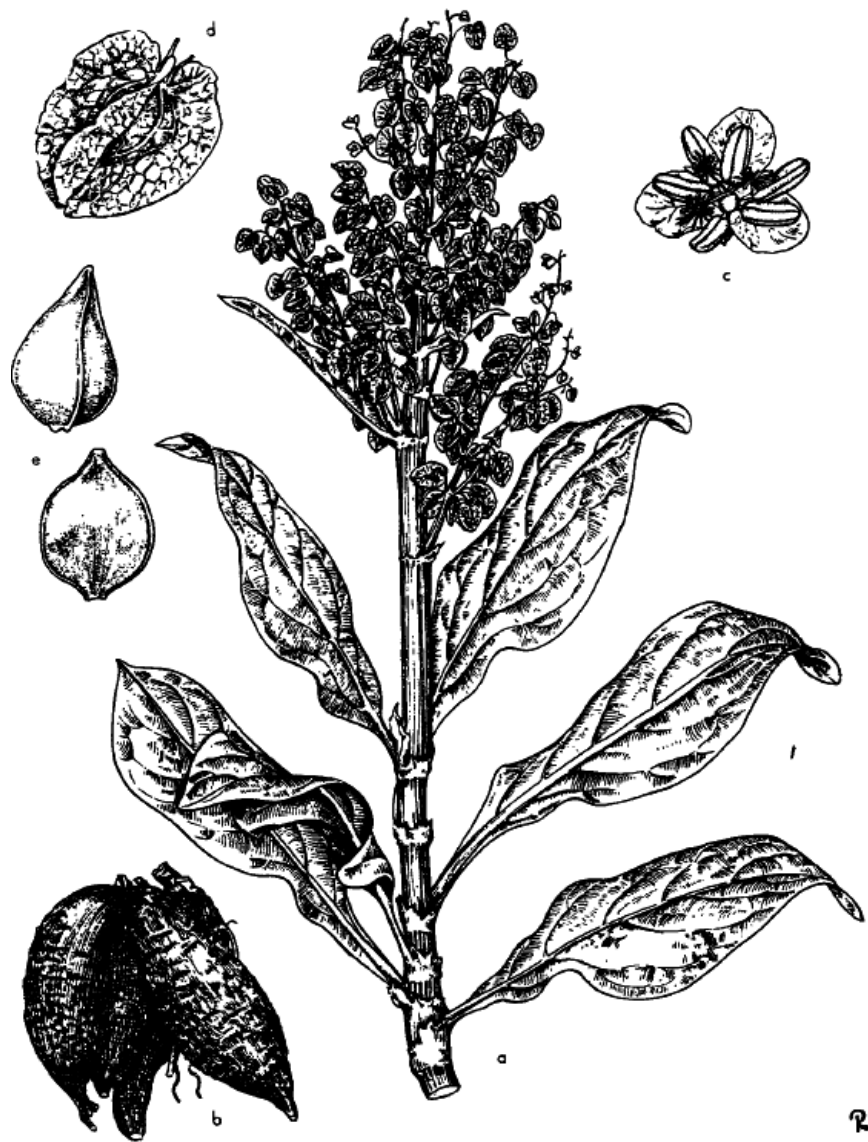


Figura 4. Detalles botánicos de *Rumex hymenosepalus*. a) Toda la planta en flor, b) Raíces, c) Flor, d) Fruto y e) aquenio. (Krochmal, 1951)



Tabla III. Comparación de capacidad de antioxidantes totales de 30 plantas silvestres de Nuevo México.

| Nombre de planta               | Capacidad antioxidante<br>( $\mu\text{mol Trolox equivalente/ g p seco}$ ) |
|--------------------------------|--|
| <i>Ilex paraguensis</i>        | 972  |
| <i>Rosa sp.</i>                | 804  |
| <i>Cinchona sp.</i>            | 692  |
| <i>Rumex hymenosepalus</i>     | 672  |
| <i>Marrubium vulgare</i>       | 560  |
| <i>Rosmarinus officinalis</i>  | 476  |
| <i>Juglans sp.</i>             | 470  |
| <i>Salvia officinalis</i>      | 442  |
| <i>Anemopsis californica</i>   | 418  |
| <i>Poleo de Olor</i>           | 382  |
| <i>Mentha aruensis</i>         | 364  |
| <i>Lavandula sp.</i>           | 310  |
| <i>Arnica montana</i>          | 227  |
| <i>Meliilotus alba</i>         | 215  |
| <i>Verbascum thapsus</i>       | 195  |
| <i>Ephedra viridis</i>         | 192  |
| <i>Flor Azar</i>               | 188  |
| <i>Mentha Spicata</i>          | 169  |
| <i>Laurel nobilis</i>          | 168  |
| <i>Ocimum basilicum</i>        | 60   |
| <i>Thelesperma gracile</i>     | 158  |
| <i>Tunera diffusa</i>          | 145  |
| <i>Hibiscus sp.</i>            | 140  |
| <i>Carthamus tinctorius</i>    | 136  |
| <i>Artemisia franserioides</i> | 111  |
| <i>Ameranthus paniculatus</i>  | 70   |
| <i>Chenopodium ambros.</i>     | 52   |
| <i>Prunus melanocarpa</i>      | 50   |
| <i>Linum lewissi</i>           | 29   |
| <i>Yucca sp.</i>               | 27   |

## II.4. Nanopartículas

La palabra nano se utiliza para indicar la milimillonésima parte de un metro o  $10^{-9}$ . Las nanopartículas son grupos de átomos y su tamaño de 1 a 100 nm. Se ha descubierto que a esta escala los materiales nanométricos presentan propiedades físicas y químicas nuevas, distintas a los mismo materiales en su presentación de bulto (Shan y Tokeer, 2010). Por ejemplo, el oro es de color amarillo en su presentación macroscópica o de bulto y en cambio, en su presentación de nanopartículas muestra una gama de distintos colores que van desde el azul índigo hasta el rojo dependiendo del tamaño, forma y solvente donde se encuentre disperso.

La nanobiotecnología puede usarse como alternativa para sustituir los métodos químicos y físicos de la síntesis de nanopartículas. El término nanotecnología, fue acuñado por el profesor Norio Taniguchi de la Universidad de ciencias de Tokio en el año 1974. Las nanopartículas atraen mayor atención debido a sus diversas aplicaciones en diferentes campos, incluyendo la “nanomedicina”. Las nanopartículas se agrupan en 2 vertientes: las nanopartículas orgánicas que incluyen carbono y las nanopartículas inorgánicas, que incluyen partículas magnéticas, nanopartículas de metales nobles como el oro y plata y nanopartículas de semiconductores. Las nanopartículas metálicas son los agentes biomédicos más prometedores y notables. Plata, aluminio, oro, zinc, carbono, titanio, paladio, hierro y cobre se han utilizado de forma rutinaria para la síntesis de nanopartículas. Las nanopartículas metálicas son empleadas en diversas áreas como catálisis, electrónica, biología y aplicaciones biomédicas, ciencias de los materiales, la física y los campos de remediación ambiental. Se debe tener en cuenta que las nanopartículas son comunes en la naturaleza, por ejemplo, la vida depende de muchos objetos a nanoescala, incluyendo proteínas, enzimas y ADN, asimismo, las partículas de tamaño nanométrico se producen de forma natural en la atmósfera (Vadlapudi, 2013).

Los usos de la nanotecnología son sorprendentes: tienen aplicación en remediación de la contaminación ambiental, en la administración de fármacos eficaces y seguros con menos efectos secundarios; en tecnología de la información generando componentes nanoelectrónicos orientados a la transmisión de datos, en las telas "inteligentes" que se ajustan para adaptarse a la temperatura y otros. Los científicos están buscando aplicaciones de más largo plazo,

incluyendo el diseño de materiales "inteligentes" tales como el envasado de alimentos que cambia de color cuando la fecha de caducidad de su contenido expira. La nanotecnología es importante en el desarrollo de tecnologías sostenibles para el futuro, para la humanidad y el medio ambiente. Hay una creciente necesidad de desarrollar procesos respetuosos con el medio ambiente a través de la síntesis "verde" o biosustentable y otros métodos biológicos (Vadlapudi, 2013).

## **II.5 Síntesis de nanopartículas de plata usando extractos de plantas**

La síntesis de nanopartículas de plata usando extractos vegetales es un campo de investigación interesante, con muchas aplicaciones prometedoras. Numerosos extractos de plantas han sido seleccionados para la producción de las nanopartículas con diversas formas y tamaños. En la tabla IV se puede apreciar una lista de plantas que han sido empleadas para la producción de las nanopartículas de plata y en ella se muestran las formas y tamaños de los nanomateriales obtenidos en cada caso.

Los tamaños de las nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de plantas van desde 2nm hasta 4000 nm, mientras que las formas varían entre esférica, en forma de varilla y con geometría hexagonal o poliedral. Las plantas de la familia *Euphorbiaceae* son bien conocidas por su relación planta-insecto, la producción de látex y actividades farmacológicas. Las nanopartículas de plata sintetizadas por el extracto de planta de esta familia son en su mayoría de forma esférica con un tamaño pequeño y tienen buenas propiedades antibacterianas e insecticida. Otras familias como la *Rutaceae*, *Poaceae*, *Myrtaceae*, *Solanáceas* y *Asteraceae* también parecen ser buenas candidatas para la síntesis de nanopartículas de plata. Las nanopartículas sintetizadas a partir de las plantas de la familia *Apocynaceae* son reportadas de útil contra Plasmodium y los mosquitos que actúan como vectores para muchas enfermedades humanas y animales.

Para la síntesis de nanopartículas. Los extractos de plantas no requieren agentes reductores tóxicos, medios de radiación y alta temperatura como en el caso de los métodos químicos de síntesis de nanopartículas. Tampoco se necesitan cepas microbianas y un costoso medio de

cultivo para el crecimiento microbiano como es en el caso de la síntesis microbiana de nanopartículas, donde existe la posibilidad de infección y contaminación durante la síntesis, o bien al momento de aplicar los nanomateriales sintetizados por esta ruta. La síntesis microbiana requiere de mucho tiempo, además de muchos cuidados para el mantenimiento del cultivo de los microorganismos.

Tabla IV. Síntesis de nanopartículas con diversas plantas (Narayan, 2011).

| <b>Nombre común</b> | <b>Nombre científico</b>       | <b>Parte</b>       | <b>Partícula</b> | <b>Morfología</b>   | <b>Tamaño</b> |
|---------------------|--------------------------------|--------------------|------------------|---|---------------|
| Neem                | <i>Azadirachta indica</i>      | Hoja               | Ag               | Esférica  | 5 – 35 nm     |
| Aloe vera           | <i>Aloe barbadensis</i>        | Hoja               | Ag               | Esférica  | 15.2 ± 4.2 nm |
| Planta del té       | <i>Camellia sinensis</i>       | Hoja               | Ag               | Nanotriángulos  | ~40 nm        |
| Clavo               | <i>Syzygium aromaticum</i>     | Capullo de la flor | Ag               | Esférica, triangular                                      |               |
| Caucho natural      | <i>Hevea brasiliensis</i>      | Látex              | Ag               | Esférica, ovala   | 90 – 400 nm   |
| Papaya              | <i>Carica papaya</i>           | Callo              | Ag               | Esférica  | 60 – 80 nm    |
| Gliricidia          | <i>Gliricida sepium</i>        | Hoja               | Ag               | Esférica  | 10 – 50 nm    |
| Pimiento morrón     | <i>Capsicum annum</i>          | Fruto              | Ag               | Esférica  | 10± 2 nm      |
| Ortiga india        | <i>Acalypha indica</i>         | Hoja               | Ag               | Esférica  | 20 – 30 nm    |
| Árbol ranúnculo     | <i>Cochlospermum gossypium</i> | Exudado            | Ag               | Nanoesfera, nanotriángulo, hexagonal, prismas poligonales |               |
| Aceite de palma     | <i>Elaeis guineensis</i>       | Biosólido          | Ag               | Esférica  | 5 – 50 nm     |
| Limón               | <i>Citrus limón</i>            | Fruta              | Ag               | Esférica  | <50 nm        |
| Alfalfa             | <i>Medicago sativa</i>         | Semilla            | Ag               | Esférica, triangular                                      | 5 – 108 nm    |
| Mango               | <i>Magnifera indica</i>        | Hoja               | Ag               | Triangular, hexagonal y esférica                          | 20nm          |
| Margarita           | <i>Eclipta</i>                 | Hoja               | Ag               | Esférica  | 2 – 6 nm      |

Las plantas están libres de estos inconvenientes y tienen una mayor tasa de síntesis de nanopartículas.

Los extractos de plantas parecen ser entonces la mejor alternativa a los métodos tradicionales físico-químicos y microbianos, ya que pueden ser efectuados a gran escala y se pueden purificar metabolitos vegetales responsables de la nanosíntesis en pasos sencillos, o aún más, se puede hacer uso de herramientas de ingeniería genética para la producción mejorada de agentes reductores y estabilizantes que generen nanopartículas estables a bajos costos de producción similares a los alcanzados con la síntesis química (Borase, 2014).

Se ha demostrado que las nanopartículas sintetizadas usando extracto de plantas requieren menos tiempo (Song y Kim, 2009). Se ha encontrado que la tasa de reducción de iones metálicos por el extracto de hoja de Neem es mucho más rápido en comparación con la de los microorganismos utilizados. Las nanopartículas de plata formadas por el extracto de plantas se mantienen estables durante tiempos más largos y son adecuados para su uso en el campo biomédico. Podemos conseguir síntesis a gran escala de nanopartículas con diferentes formas y tamaños cambiando diferentes parámetros de la reacción tales como temperatura, pH, tiempo de reacción, relación de concentración de extracto de planta y precursor ( $\text{AgNO}_3$ ), lo cual resulta muy tedioso o no es posible en síntesis microbiana.

La disponibilidad de la materia prima también es un punto a favor en la utilización de los extractos para la síntesis de nanomateriales; además de esto, los métodos de preparación del extracto son baratos y simples. El material vegetal no es infeccioso, pero se debe tener cuidado de no seleccionar las plantas que contienen compuestos tóxicos. En este sentido, existe menos preocupación cuando los nanomateriales son sintetizados con extractos de plantas para ser usados en la salud humana, debido a que los agentes reductores y estabilizantes son metabolitos secundarios o proteínas de plantas que tienen propiedades medicinales.

La agregación de nanopartículas de plata es un problema significativo ya que disminuye el área de superficie en relación a volumen, afectando la respuesta activa de estos materiales como antimicrobianos y como catalizadores, entre otros, de tal forma que no solo es importante la presencia de agentes reductores que faciliten la síntesis de los nanomateriales

sino que también es fundamental que se logre obtener nanopartículas estables en el tiempo. Una vez que se tenga éxito en encontrar el principio activo responsable de la reducción y los agentes que intervienen en la estabilización de las nanopartículas, posteriormente y usando herramientas de ingeniería genética, se puede manipular el genoma de la planta para mejorar la producción de las moléculas reductoras responsables de la síntesis fitoquímica de nanopartículas. Actualmente, los métodos químicos de síntesis son ampliamente utilizados para la fabricación de nanopartículas a gran escala. Estos métodos han conducido a un aumento en el costo de la síntesis y diversos peligros ambientales. Por lo tanto, es una prioridad establecer métodos alternativos para la síntesis de nanopartículas, evitando el uso de productos químicos peligrosos. La fito-nanosíntesis es una de las alternativas más potentes en el escenario actual de nanosíntesis.

La resistencia microbiana a los antibióticos es un problema grave en la medicina. Las nanopartículas de plata tienen la gran ventaja de incidir por múltiples caminos sobre los microorganismos provocando efectos biocidas, tales como daño estructural, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), interferir con la replicación del ADN, reaccionar con el grupo tiol de enzimas, entre otras. Este no es el caso con antibióticos que tienen como objetivo un solo mecanismo de inhibición microbiana. La plata, en comparación con otros metales, exhibe mayor toxicidad a microorganismos y baja toxicidad para los mamíferos. Los estudios antibacterianos de nanopartículas se llevan a cabo principalmente en medios sólidos o cultivo líquido de microorganismos *in vitro*. Aún se requieren muchos estudios *in vivo* para dilucidar el mecanismo de acción antibacteriana de nanopartículas y sus efectos sobre organismos más complejos como los mamíferos. La acción antimicrobiana de nanopartículas sintetizadas de extracto de planta es bien documentada, pero el mecanismo exacto no se conoce, tal vez debido a la complejidad y abundancia de los componentes químicos presentes en el extracto de la planta.

El aumento de la resistencia de los microorganismos patógenos a los antibióticos y el aumento de los casos de infección hospitalaria centra la atención hacia el uso de nanopartículas en la terapia antimicrobiana y la limpieza de las habitaciones de hospital. Así mismo, varios trabajos han reportado efectos sinérgicos de nanopartículas de plata sintetizadas por plantas en

combinación con los antibióticos comerciales (Ghosh, 2012). Esta acción sinérgica puede resultar una alternativa valiosa para el tratamiento de infecciones por bacterias resistentes a fármacos.

### III. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antibióticos desarrollada por los microorganismos ha alcanzado niveles alarmantes a escala mundial. Las propuestas para atacar este problema han sido diversas y una de ellas consiste en el empleo de nanopartículas de metales nobles sintetizadas con compuestos biocompatibles para ser usadas como microbicidas. En este sentido, el empleo de extractos de plantas ha sido uno de los recursos implementados en los últimos años en la síntesis de nanopartículas metálicas. Al emplear extractos se busca que los compuestos presentes en el mismo actúen como agentes bio-reductores (donadores de electrones a los iones metálicos para transformarlos en átomos metálicos) y que una vez formadas las nanopartículas estas moléculas bio-reductoras actúen también como agentes estabilizantes, envolviendo a las nanopartículas y evitando que se agreguen entre sí. Esto último es de suma importancia al evaluar la bioactividad de los nanomateriales pues se ha establecido que los tamaños y la morfología juegan un papel crítico en la efectividad de la actividad microbicida. Particularmente, tamaños menores a 10nm y nanopartículas con geometría triangular han resultado las más efectivas al momento de evaluar su actividad microbicida. Teniendo en cuenta lo anterior se seleccionó una planta de la región sonoreense que reúne los requisitos de contar con una gran cantidad de compuestos antioxidantes de fácil extracción y que permite la síntesis de nanopartículas de plata en un proceso sencillo, barato y de bajo impacto ecológico.



#### **IV. HIPÓTESIS**

Los compuestos presentes en los extractos de la raíz de la cañagria (*Rumex hymenosepalus*) actúan como agentes reductores permitiendo la síntesis y estabilización de nano partículas de plata con propiedades microbidas en bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras.

## V. OBJETIVOS

Sintetizar nanopartículas de plata empleando una solución de nitrato de plata y extractos de la raíz de la cañagria (*Rumex hymenosepalus*) como agente bio-reductor y evaluar el efecto microbicida de los productos obtenidos.

### V.1. Objetivos específicos

1. Obtener un extracto a partir de la raíz de la cañagria (*R. hymenosepalus*) empleando una mezcla de etanol/agua.
2. Caracterizar por espectroscopia UV-visible el extracto de *Rumex hymenosepalus* obtenido y determinar la concentración de los distintos compuestos polifenólicos del extracto.
- 3.- Fraccionar una porción de sólidos del extracto empleando tetrahidrofurano (THF) como solvente de arrastre y caracterizar por UV- VIS las fracciones obtenidas: fracción soluble en THF y fracción insoluble en THF.
4. Sintetizar nanopartículas de plata a temperatura ambiente a partir de soluciones de nitrato de plata y extractos de cañagria y caracterizarlas mediante diferentes técnicas experimentales: espectroscopía de UV-VIS, microscopía electrónica de transmisión (MET) y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS).
5. Caracterizar la reacción de síntesis de las nanopartículas de plata en función del tiempo mediante la medición del pH de la reacción.
6. Evaluar midiendo el halo de inhibición mediante el método del pocillo, los efectos bactericidas de las fracciones obtenidas del extracto de *Rumex hymenosepalus*, así como de las nanopartículas de plata en bacterias Gram negativas, Gram positiva y en una levadura.

## VI. METODOLOGÍA

### VI.1. Obtención del Extracto de *Rumex hymenosepalus*

La raíz de la planta *Rumex hymenosepalus* se adquirió comercialmente cortada y deshidratada en una tienda de autoservicios, de Hermosillo, Sonora. Las rodajas de raíz fueron de aproximadamente 0.5cm de espesor aproximadamente con diámetros entre 1 y 2cm con aspecto de color rojizo en su parte interna y una cubierta en la parte exterior de color café oscuro. Para obtener el extracto de *Rumex hymenosepalus* se utilizó una mezcla de etanol/agua en una proporción 70/30 vol/vol. El etanol empleado fue alcohol etílico absoluto ACS, marca Fermont. En un frasco transparente de cultivo con tapón de rosca hermética se colocaron 100 ml de la mezcla de solventes, se sumergieron 15 g de rodajas deshidratadas del tubérculo de la planta tapando el frasco herméticamente para evitar evaporación de los componentes dejándose reposar durante 3 semana para que se llevara a cabo la extracción de los compuestos presentes en la raíz de la *Rumex hymenosepalus*. El frasco con su contenido se cubrió con papel aluminio y se colocó en un lugar cerrado lejos del contacto de la luz para evitar la foto-oxidación de los compuestos obtenidos en el extracto. Mediante decantación se separó la parte líquida y posteriormente, se filtró la solución empleando papel filtro Whatman grado 40 (retiene partículas de 8µm) y después por un filtro Acrodisc de 200 nm acoplado a una jeringa

### VI.2- Caracterización de extracto por espectroscopía UV- visible

**VI.2.1- Espectros UV-VIS y curvas de calibración de EGCG y EC:** Para determinar la concentración de las distintas moléculas polifenólicas presentes en los extractos de *Rumex hymenosepalus* se procedió primeramente a la determinación de las curvas de calibración por espectroscopía UV-VIS de dos moléculas del grupo de las catequinas como son la epicatequina (EC) y la epigalocatequina galato (EGCG) cuyas fórmulas químicas se muestran en la figura 5 y con pesos moleculares son 290.27g/mol y 458.37 g/mol, respectivamente.

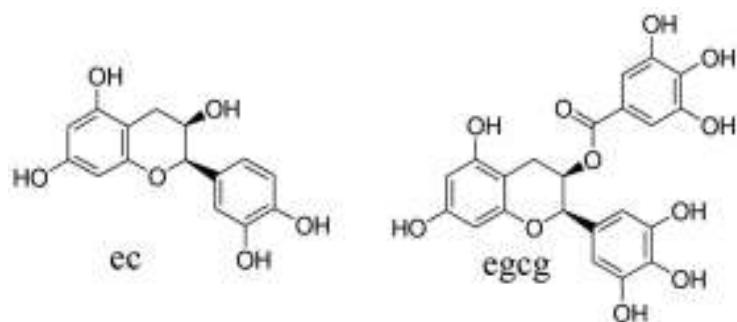


Figura 5. Estructuras químicas de las moléculas catequinas EC y EGCG

Se prepararon soluciones acuosas de las moléculas catequinas EC y EGCG, obtenidas comercialmente como reactivo químico de alta pureza (Sigma aldrich >99%) en un rango de concentraciones definido: 39.9 $\mu$ M-279.1 $\mu$ M para la EGCG y 83.8 $\mu$ M-818.6 $\mu$ M para la EC. Posteriormente se obtuvieron los espectros UV-vis a 25°C de las soluciones preparadas a distintas concentraciones de EGCG y de EC. Con los valores de las absorbancias máximas asociadas a las respectivas concentraciones se construyeron curvas de calibración para la EGCG y la EC. Empleando un ajuste lineal a los datos anteriores fue posible determinar las pendientes de las rectas de ajuste mediante el software Origin 7.0. Estas pendientes determinadas experimentalmente corresponden al valor del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de la EGCG y de la EC. Este coeficiente es una medida relacionada con la fuerza con que absorbe la luz una especie absorbidora a una longitud de onda dada y suele expresarse en unidades de  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$  o  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ . La importancia de la determinación de  $\epsilon$ , radica en el hecho de que a partir del espectro de absorción UV-VIS es posible conocer la concentración de una solución dada haciendo uso de la ley de Beer-Lambert.

**VI.2.2. Espectro UV-VIS del extracto, deconvolución y determinación de la concentración de las especies polifenólicas presentes en el extracto:** Para la obtención del espectro UV-VIS del extracto de *Rumex hymenosepalus*, se emplearon 20 $\mu$ L del extracto disueltos en 2800 $\mu$ L de agua ultrapura en la celda de cuarzo correspondiente a la muestra. En la celda de cuarzo empleada como referencia se agregaron 3ml de agua ultra pura y se corrió como la señal blanco de referencia que es sustraída de la señal UV-VIS correspondiente a la

muestra. El espectro UV-VIS del extracto se corrió en el rango de 900nm-200nm a una velocidad de 240nm/min y a una temperatura de 25°C. Una vez obtenido el espectro UV-VIS del extracto se delimitó su estudio a la región de la banda de absorción comprendida entre 250nm-400nm. Se procedió a deconvolucionar la señal UV-VIS obtenida experimentalmente del extracto. La deconvolución del espectro consiste en reconstruir el espectro experimental obtenido mediante la suma de varias curvas Gaussianas, cada una correspondiente a la absorción de distintas moléculas asociadas al extracto. Para la deconvolución se empleó el programa Origin 7.0, el cual es un software especializado en el análisis y tratamiento matemático de datos. El punto de partida para proponer las Gaussianas de ajuste fue la ubicación de las bandas de absorción conocidas para la EGCG y la EC (274nm y 278nm respectivamente). El ajuste óptimo se determinó para un factor de correlación  $R^2 > 0.995$ .

Una vez determinadas las curvas Gaussianas que mejor reconstruyen a la curva de absorción del extracto fue posible conocer los valores máximos de las absorbancias correspondientes a cada curva Gaussiana, de tal forma que haciendo uso de la ley de Beer-Lambert y conociendo los valores de los coeficientes de extinción molar de la especie asociada a cada curva Gaussiana se pudo determinar la concentración de las distintas moléculas polifenólicas que están presentes en el extracto de *Rumex hymenosepalus*.

### **VI.3. Obtención de las fracciones del extracto empleando Tetrahidrofurano como solvente de arrastre y caracterización por UV-VIS**

De acuerdo a (Sun et al. 2008), quienes se enfocaron a estudiar la solubilidad del transresveratrol en varios solventes como alcoholes lineales de cadena corta (1 a 6 carbonos), tetrahidrofurano, agua, acetona y acetato de etilo, obtuvieron que la mejor solubilidad del transresveratrol se consigue con el tetrahidrofurano (THF) a 25°C ( $16.48 \pm 0.56 \text{ mol} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ). Teniendo en cuenta esta referencia, se procedió a fraccionar el extracto con el propósito de recuperar la porción rica en transresveratrol y comparar la capacidad antimicrobiana de las fracciones del extracto. Para tal propósito, una parte del extracto inicial (50ml) se concentró eliminando el solvente con un rotavapor. El concentrado se colocó por 48

horas en un desecador acoplado a bomba de extracción para eliminar completamente todo rastro de solvente y recuperar los sólidos presentes del extracto. La masa neta recuperada se colocó en un filtro de vidrio y se lavó por goteo con 20ml de tetrahidrofurano, recuperándose el material arrastrado por el solvente en un vaso de precipitado. La operación de lavado se repitió 3 veces y el contenido del material arrastrado en el solvente se sometió al rotovapor para su secado. La parte del extracto no solubilizado remanente en el filtro de vidrio fue secado también con bomba de extracción en desecador. La parte insoluble en THF del extracto se etiquetó como fracción A; la parte soluble en THF se etiquetó como fracción B. De ambas fracciones se prepararon soluciones acuosas de concentraciones de 0.01g/ml de donde se tomaron muestras para la espectroscopía UV-vis, empleando agua ultrapura como “blanco” en la celda de referencia y para la evaluación de las pruebas antimicrobianas.

#### **VI.4. Síntesis de Nanopartículas de Plata empleando extractos de *Rumex hymenosepalus* y caracterización de los productos.**

**VI.4.1. Procedimiento para sintetizar las nanopartículas de plata:** Como reactivo aportador de los iones de plata se utilizó Nitrato de Plata de alta pureza (99.9%) de Sigma Aldrich. Se preparó 100ml de una solución 0.01M de  $\text{AgNO}_3$  empleando agua ultrapura (18.2M $\Omega$ ) a 25°C, agitando suavemente por 1 hora con magneto y manteniendo el matraz cubierto con papel aluminio para evitar el contacto con la luz. Para preparar las nanopartículas de plata, en un frasco de vidrio transparente de 100ml con tapón de rosca se agregan 4ml del extracto de *Rumex*, 2ml de la solución de Nitrato de Plata 0.1M y 16 ml de agua ultrapura. El frasco se colocó a 20cm de una lámpara de luz blanca halógena de 10W de potencia durante 24 horas. El frasco se rotó parcialmente sobre su eje cada 2 horas para que la iluminación sea lo más homogénea posible sobre la muestra. Después de las 24 horas, la muestra se retiró de la fuente de iluminación y el contenido se colocó por partes iguales en dos tubos Falcon de 15ml para su posterior centrifugación. Antes de centrifugar, se retiran 0.5ml de cada tubo para la caracterización de las nanopartículas por UV-VIS. El proceso de la centrifugación tiene como propósito “limpiar” las nanopartículas del material excedente proveniente del extracto y de la

solución. Previo a la centrifugación, el contenido en los tubos Falcon es sonicado durante 10 minutos para homogenizar completamente la muestra, posteriormente se centrifugó por 30 minutos a 6,000 rpm. El sobrenadante se retiró y los sólidos precipitados se resuspendieron en 10mL de alcohol. Se sonicó el contenido de los tubos por 10 minutos para volver a centrifugarse en las mismas condiciones. Los sólidos se recuperaron y se dejaron secar por 24 horas en un desecador conectado a una bomba de vacío. Los polvos se pesaron y se resuspendieron en 1ml de agua ultrapura para su posterior uso en las pruebas de actividad microbiciada.

#### **VI.4.2. Caracterización de las nanopartículas por UV-VIS y por Microscopía Electrónica de Transmisión.**

**VI.4.2.1 Espectroscopía UV-VIS:** La espectroscopía UV-VIS permite seguir el crecimiento de nanopartículas en solución. Esto es debido a que las propiedades electrónicas cambian drásticamente como una consecuencia de la reducción del tamaño y las dimensiones del material (Link, 2003). La interacción de un campo electromagnético con nanopartículas de metales nobles (cobre, oro y plata) genera una oscilación coherente de la banda de conducción de electrones. Esta resonancia es conocida como plasmones de superficie. La resonancia de estos plasmones de superficie en el caso de las nanopartículas de metales nobles es muy intensa y ocurre en la parte visible del espectro electromagnético. Esto hace posible detectarlas con ayuda de un espectrofotómetro. La absorción de los plasmones de superficie es responsable de los colores rojo y amarillo del oro y la plata, respectivamente. La absorción se recorre a longitudes de onda mayores cuando se incrementa el tamaño de las nanopartículas. Las nanopartículas de plata, de tamaños del orden de 2-100 nm tienen un pico de absorción en el intervalo de 390 a 450 nm. En este caso se utilizó la espectroscopia de absorción UV-VIS como un primer método para verificar el crecimiento de nanocristales de plata en nuestros sistemas. Para ello, se monitoreó la absorción de las soluciones con nanopartículas de plata, antes y después del proceso de limpieza por centrifugación, en el intervalo de 200nm-800nm con ayuda de un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 de doble haz del Departamento

de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora. Como “blanco” se utilizó agua ultrapura agregando 3ml en la celda de referencia. De la muestra a estudiar se agregan 100  $\mu$ L en la otra celda y se completó con 2.9ml de agua ultra pura. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (25°C).

**VI.4.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión:** Para la caracterización estructural se empleo el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) de emisión de campo, marca JEOL (modelo JEM 2010-F), del Departamento de Física de la Universidad de Sonora (ver figura 6), las imágenes se registraron mediante la cámara CCD acoplada al microscopio electrónico con tratamiento de datos mediante el software Digital Micrograph de la compañía GATAN. Con estas técnicas es posible la determinación de las distribuciones de tamaños de las partículas obtenidas y mediante el análisis de alta resolución (HRTEM) es posible conocer la estructura cristalina de nanopartículas individuales apoyándose en sus respectivos patrones de difracción generados por la Transformada de Fourier de la imagen. Para la cuantificación de tamaños de nanopartículas se analizó la imagen capturada por la cámara CCD en formato JPG con el software IMAGE J, el cual es un programa diseñado para el análisis de imágenes. Con el programa calibramos la imagen empleando la barra de referencia de tamaño y se midieron los tamaños de aproximadamente 500 partículas. El programa generó un archivo de datos con los tamaños medidos y su análisis estadístico se realizó con el programa Origin 7.0.

El equipo del TEM está también equipado con un detector de análisis de energías dispersivas de rayos x (EDS), de la compañía Bruker, modelo QUANTAX, que permitió conocer cuantitativamente el contenido de elementos químicos presentes en la región de interés. La técnica de EDS permite caracterizar la composición química de una muestra analizada en un microscopio electrónico. Para ello se aprovecha el hecho de que cuando los electrones atraviesan la muestra e interaccionan con ella, se generan rayos X. La energía de la radiación es medida por el detector; esta energía dispersiva de rayos X es específica para cada elemento, lo cual permite identificar su presencia en una muestra y cuantificar su concentración. El análisis cuantitativo se realiza con la medición de la intensidad de las líneas espectrales para cada elemento en la muestra; comparando los resultados obtenidos con los estándares tabulados para concentraciones conocidas se puede determinar la concentración



relativa de cada elemento en la muestra (Alshatwi, 2015). En nuestro caso, utilizamos este tipo de espectroscopía para verificar que las nanopartículas producidas son efectivamente de plata y para determinar elementos residuales en la síntesis.

Para el estudio de las muestras de nanopartículas por microscopía de trasmisión se depositaron 10 microlitros de la solución con nanopartículas sintetizadas en una rejilla de Cu recubierta con película de C (figura 7). La muestra depositada en la rejilla se dejó secar al ambiente por 1 hora y posteriormente se colocó en una cámara de vacío durante 24 horas para eliminar completamente el solvente y estar en condiciones de observarse en el microscopio de transmisión a un voltaje de operación de 200KV.



Figura 6. Microscopio Electrónico de Transmisión de la Universidad de Sonora

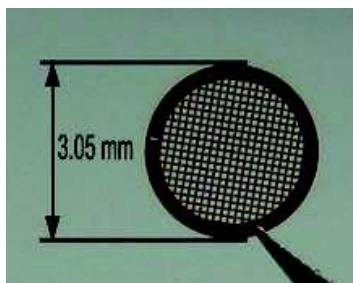


Figura 7. Rejilla de Cu para TEM

### **VI.5. Evaluación temporal del pH de la reacción de síntesis de las nanopartículas de plata.**

Para este estudio se empleó un sensor de pH CI-6507A, marca PASCO conectado a una interface PASCO (para computadora) *Science Workshop 700* (Figura 8). La medición se efectuó en una muestra preparada en idénticas condiciones que las descritas en el apartado 3.1 de la sección de Metodología. Antes de iniciar la medición y una vez introducido el sensor se esperó por 1 minuto para asegurar un equilibrio térmico entre sensor y muestra. Cada medición duró 5 minutos para obtener una lectura promedio del intervalo con su respectiva desviación estándar. El conductímetro se calibró previamente a 25°C con soluciones buffer de pH=7 y de pH=4.



Figura 8. Sensor de pH marca PASCO

## VI.6. Cultivo de bacterias Gram + y Gram – y levadura

Para el cultivo de las bacterias se realizó la inoculación de los microorganismos en el medio agar Mueller Hinton, debido a que es el agar más apropiado para la prueba, ya que contiene los requerimientos nutricionales adecuados para los microorganismos usados. Para la preparación del medio se suspendieron 37g en un litro de agua purificada y se calentó bajo agitación con magneto frecuente hasta ebullición. Se esterilizó por 15 min a 121°C. Después de esto se dejó enfriar a 45°C y se distribuyeron, en condiciones estériles, volúmenes de 15 mL en placas Petri. Posteriormente en cada placa se perforaron cuatro pocillos de 6mm de diámetro y se inocularon 250 µL de una suspensión bacteriana en concentración  $10^8$  UFC. La distribución del inóculo se realizó de forma homogénea con un hisopo estéril por toda la superficie del agar incluyendo en los pocillos. Después en cada pocillo se colocaron 30 µL de cada antimicrobiano a probar, y las placas se incubaron a 35°C por 24 horas. Después de este tiempo se midieron los halos de inhibición (Figura 9). Los organismos usados fueron *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* 0157 ATCC 43895, *Salmonella tiphy* ATCC 6539, *Pseudomona aeruginosa* ATCC15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Candida albicans* ATCC 90028.

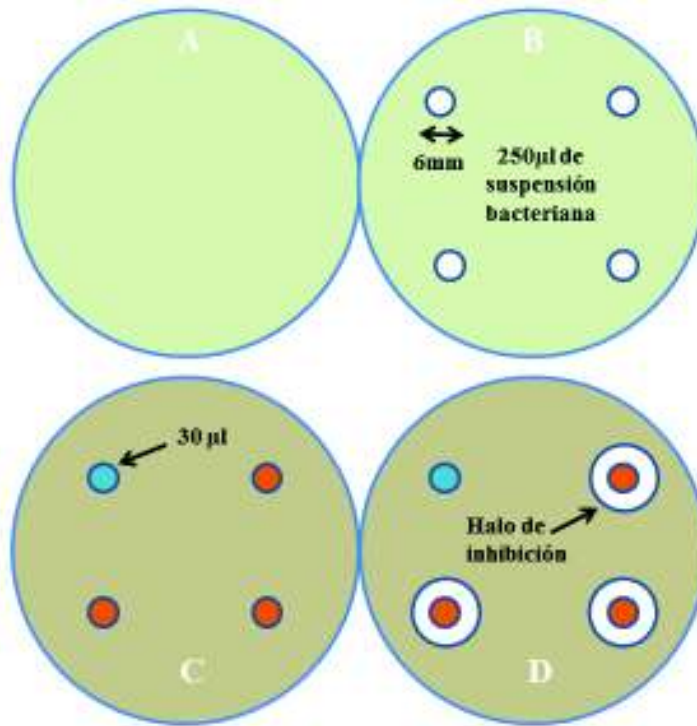


Figura 9. Esquema de cultivo y prueba de microorganismos. A) Placa Petri con 15mL de agar Mueller Hinton, B) Una vez listo el agar se hizo perforaciones de 6mm y se inocularon 250µl de una suspensión bacteriana en concentración 8 Log/ml. C) Después de 24 horas y con el cultivo bacteriano listo, se depositaron 30µl de cada antimicrobiano que se probó y las placas se incubaron a 35°C por 24 horas. D) Se midieron los halos de inhibición, en mm, presentados en las placas.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Obtención de extracto de *Rumex hymenosepalus*

El extracto obtenido es de un color rojo intenso y de la extracción se recuperaron 82 ml de los 100ml de solvente agregados al inicio. Después de rotovaporar y secar completamente el extracto, la masa de los sólidos recuperados fue de 4.212g lo que nos da un rendimiento de extracción del 28% a partir de los 15g de rodajas de *Rumex hymenosepalus*.

El contenido (Fig.10 B) se guardó nuevamente protegiéndolo de la luz.



Figura 10. A) Rodajas de raíz deshidratada de la planta *Rumex hymenosepalus*; B) Extracto obtenido a partir de la raíz de *Rumex hymenosepalus*.

**VII.1.1. Espectros UV-VIS y curvas de calibración de EGCG y EC:** Los espectros UV-VIS obtenidos a 25 °C para el compuesto de epigallocatequina-galato (EGCG) en agua pueden observarse en la figura 11, donde se aprecia una banda de absorción bien definida que abarca de 250nm a 340nm aproximadamente. El máximo de la banda se ubica en 274nm y esta absorción coincide con las absorciones asociadas a compuestos polifenólicos (Bark et. al., 2011).

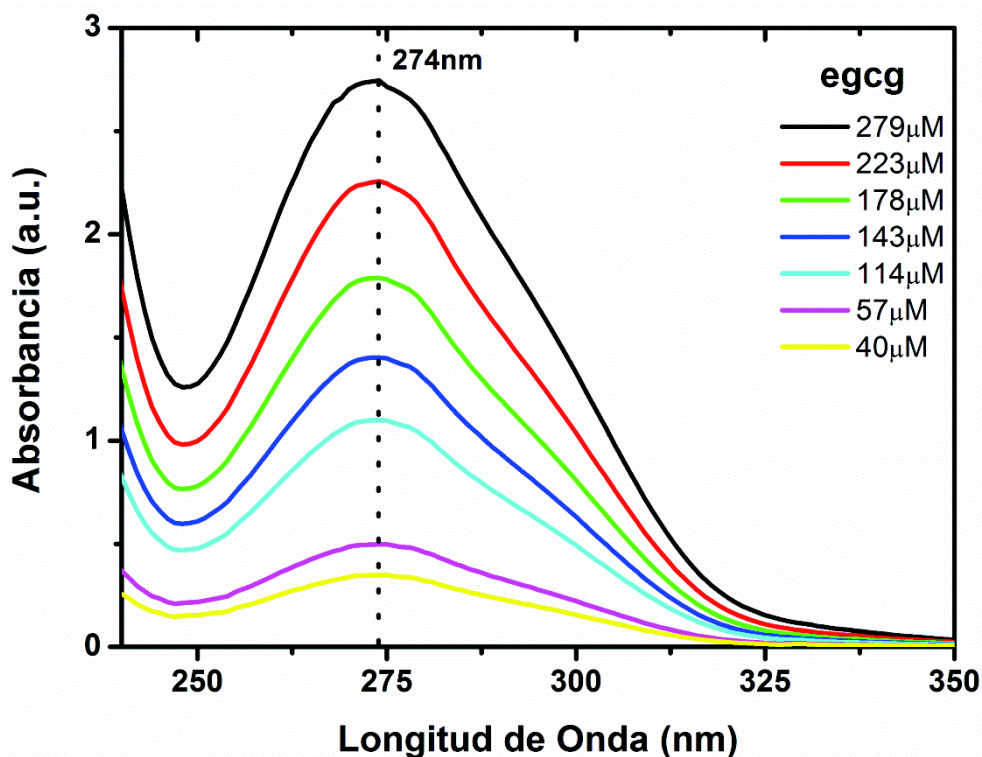


Figura 11. Absorción de soluciones acuosas de EGCG a distintas concentraciones.

En la figura se muestran los máximos de las intensidades de las bandas de absorción del compuesto EGCG a 274nm en función a la concentración de la solución. Como se observa en la figura, en el rango de concentraciones de las soluciones preparadas con EGCG (40μM a 279μM) la gráfica tiene un comportamiento lineal de tal forma que la pendiente está relacionada a través de la ley de Beer-Lambert con el coeficiente de extinción molar del centro absorbente (EGCG) mediante la siguiente expresión:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

donde  $A$  es la magnitud adimensional conocida como absorbancia,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar de la especie en cuestión y tiene unidades de  $M^{-1}cm^{-1}$ ;  $l$  es el camino óptico y corresponde al espesor de la celda donde se coloca la muestra expresado en cm. Finalmente,  $c$  es la concentración de la especie responsable de la absorción y está dada en M.

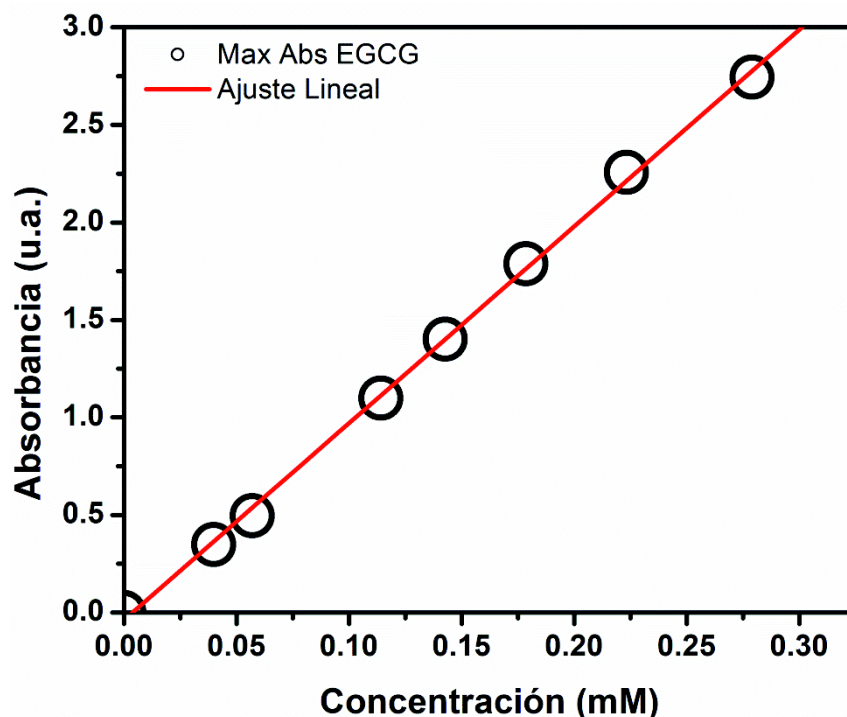


Figura 12. Curva de calibración para la EGCG en agua a 25 °C.

Como se observa en la figura 12, el eje Y corresponde a la absorbancia  $A$  y el eje X a la concentración  $c$  de la EGCG. Así, al calcular la pendiente de la recta que ajusta a los datos en esta gráfica, de acuerdo a la ecuación 1 se obtiene  $\epsilon \cdot l = A/c$ . Particularmente en estos experimentos de espectroscopía UV-VIS las celdas de cuarzo empleadas son de 1cm de espesor por lo que la pendiente obtenida corresponde directamente a la magnitud del coeficiente de extinción.

En la tabla V se presentan los datos numéricos de las absorbancias a 274nm (máxima absorción) correspondientes a las distintas concentraciones de EGCG. El ajuste lineal se efectuó con este conjunto de datos utilizando el programa Origin 7.0. En la misma tabla se incluye el valor del coeficiente de extinción molar correspondiente a la EGCG en agua determinado experimentalmente en este trabajo, el cual está expresado en unidades de  $L/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ . También se incluyen el coeficiente de correlación lineal y la varianza porcentual. Ambos valores indican que el ajuste lineal es aceptable.

Tabla V. Determinación del coeficiente de extinción molar para la EGCG en agua a 25°C.

| Conc. EGCG ( $\mu\text{M}$ )  | Abs. 274nm (EGCG)                  |
|---|------------------------------------|
| 39.9  | <b>0.3479</b>                      |
| 57.1  | <b>0.4966</b>                      |
| 114.2   | <b>1.0989</b>                      |
| 142.8   | <b>1.4021</b>                      |
| 178.6   | <b>1.7886</b>                      |
| 223.3   | <b>2.2561</b>                      |
| 279.1   | <b>2.7448</b>                      |
| Coef. de extinción molar $\epsilon \left( \frac{L}{\text{mol}\cdot\text{cm}} \right)$ | <b>10,088 <math>\pm</math> 136</b> |
| $R^2$   | <b>0.99946</b>                     |
| Varianza Porcentual   | <b>1.34</b>                        |

Para el caso de la EC en la figura 14 se muestran los espectros UV-VIS a temperatura ambiente (25 °C) del compuesto disuelto en agua para un rango de concentraciones que abarca de 84 $\mu\text{M}$  a 818 $\mu\text{M}$ . En la figura se observa que la absorción de la EC comprende una región de 250nm a 300nm aproximadamente, con un máximo de absorción ubicado a 278nm.

En la figura 13 se muestra la gráfica de las absorciones máximas a 278nm para las correspondientes concentraciones de EC. Con la pendiente de la recta obtenida del ajuste lineal y empleando la relación de Beer-Lambert se determinó el coeficiente de extinción molar. En la tabla VI se presentan los datos numéricos de las absorbancias a 278nm (máxima absorción) correspondientes a las distintas concentraciones de EC. El ajuste lineal se efectuó con este conjunto de datos utilizando el programa Origin 7.0. En la misma tabla se incluye el valor del coeficiente de extinción molar correspondiente a la EC en agua determinado experimentalmente, el cual está expresado en unidades de  $L/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ . Se incluyen el coeficiente de correlación lineal así como la varianza porcentual. Ambos valores indican que el ajuste lineal es aceptable.



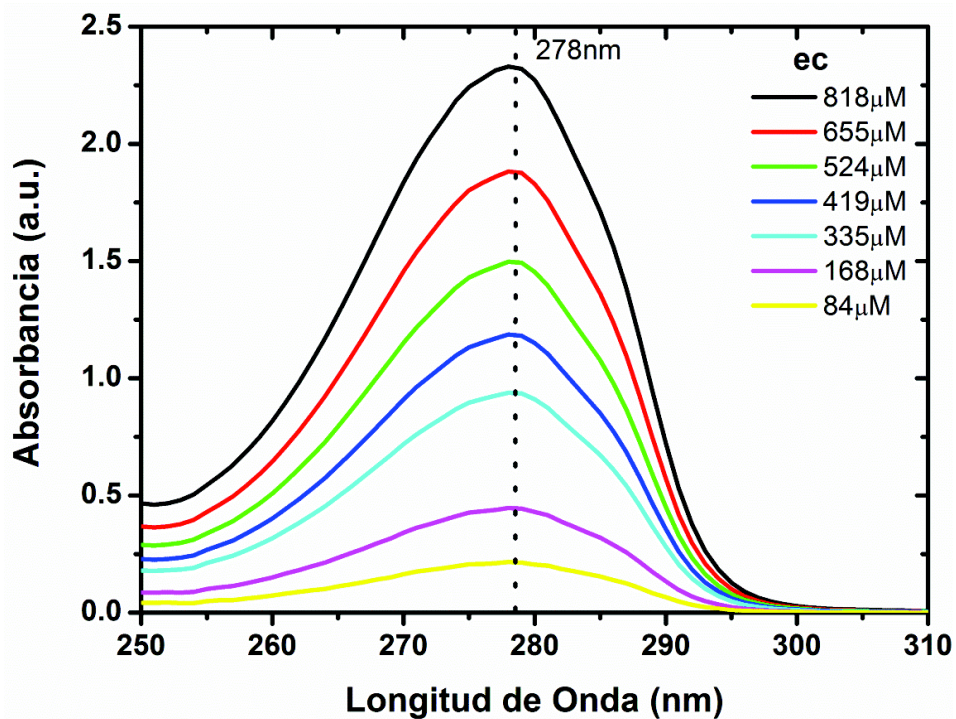


Figura 13. Absorción de soluciones acuosas de EC a distintas concentraciones.

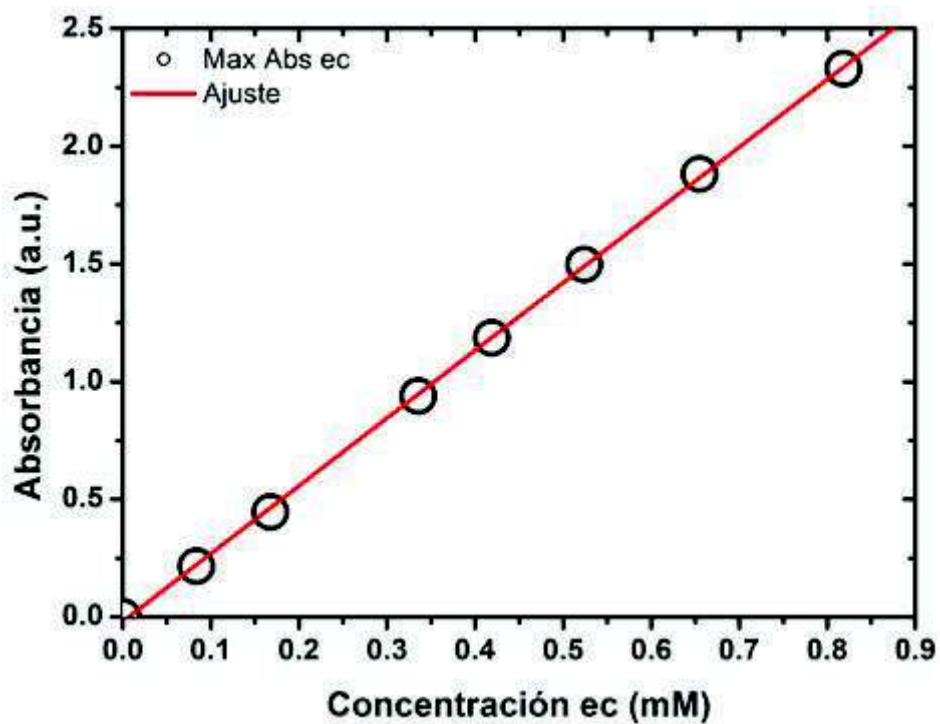


Figura 14. Curva de calibración para la EC en agua a 25 °C.

Tabla VI: Determinación del coeficiente de extinción molar para la EC en agua a 25°C.

| <b>Conc. EC (μM)</b>  | <b>Abs. 278nm (EC)</b> |
|---|------------------------|
| 83.8  | <b>0.2153</b>          |
| 167.6   | <b>0.4457</b>          |
| 335.3   | <b>0.9383</b>          |
| 419.1   | <b>1.1859</b>          |
| 523.9   | <b>1.4969</b>          |
| 654.9   | <b>1.8813</b>          |
| 818.6   | <b>2.3301</b>          |
| Coef. de extinción molar $\epsilon \left( \frac{L}{mol \cdot cm} \right)$ | <b>2880.3 ± 18.2</b>   |
| R <sup>2</sup>  | <b>0.9998</b>          |
| Varianza Porcentual   | <b>0.63</b>            |

Los valores de los coeficientes de extinción molar determinados experimentalmente en este trabajo para los compuestos EGCG y EC coinciden con los reportados recientemente por (Atomssa y Ghalop, 2015) tal como se muestra en la tabla VII.

Tabla VII. Comparación entre los coeficientes de extinción molar de este trabajo y los reportados por (Atomssa y Ghalop, 2015) que aparecen con asteriscos.

| <b>Compuesto</b> | <b><math>\lambda_{Max}</math> (nm)</b> | <b><math>\epsilon \left( \frac{L}{mol \cdot cm} \right)</math></b> | <b>Temperatura (°C)</b> |
|------------------|--|--|-------------------------|
| EGCG             | 274                                    | 10,088 ± 136   | 25                      |
| EGCG**           | 273.6                                  | 10,840 ± 39.2  | -                       |
| EC               | 278                                    | 2880.3 ± 18.2  | 25                      |
| EC**             | 278.4                                  | 3110 ± 103.9   | -                       |

Las discrepancias en los valores de la Tabla VII puede deberse a la asignación de la longitud de onda de máxima absorción y también al hecho de que los autores de la referencia citada reportaron que sus experimentos se efectuaron a temperatura ambiente sin precisar el valor de la misma, lo cual pudo haber generado diferencias.

## VII.2. Espectro UV-VIS del extracto, deconvolución y determinación de concentraciones de moléculas polifenólicas del extracto

El espectro UV-visible del extracto de *Rumex hymenosepalus* obtenido a 25 °C se muestra en la figura 15. El espectro completo comprende el intervalo de 200nm-900nm. Se observa una banda bien definida entre 350nm-250nm con un máximo de absorbancia en 280nm y otra banda irregular que va de 250nm a 200nm. La irregularidad de esta segunda banda de absorción indica que la señal ha saturado al fotodetector del equipo UV-VIS, sin embargo la presencia de las dos bandas de absorción obtenidas señalan la existencia de compuestos aromáticos en el extracto.

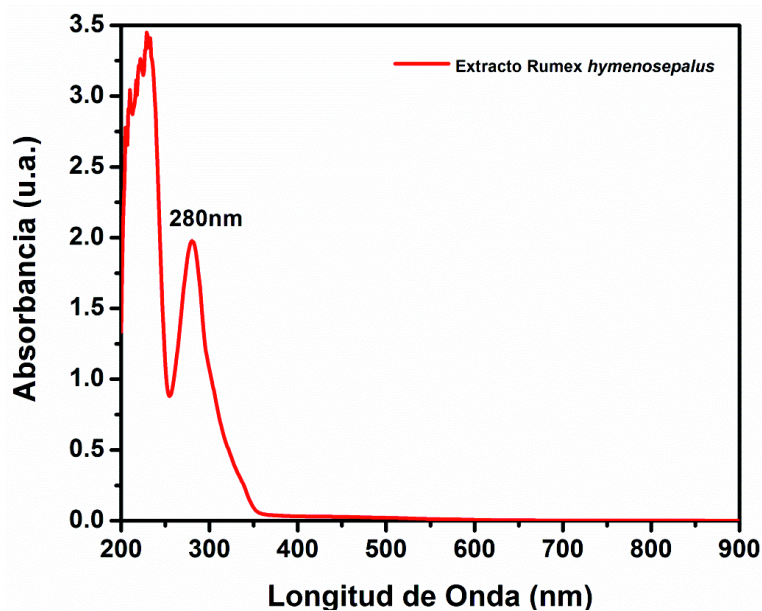


Figura 15. Espectro UV-VIS del extracto de *Rumex hymenosepalus* en etanol.

A continuación se delimito el estudio del espectro de absorción del extracto en la región comprendida entre los 255nm-400nm y se trató de reconstruir el espectro del extracto como la suma de la absorción de la EGCG y de la EC, tal como se muestra en la figura 16. De la figura se desprende que la suma de las absorciones de la EGCG y EC no reproduce la banda de absorción del extracto, más sin embargo, nos sugiere la necesidad de incluir una banda de absorción cercana a los 300nm. Teniendo en cuenta la observación anterior se procedió a efectuar la deconvolución del espectro experimental UV-Vis del extracto de *Rumex* haciendo uso del software Origin 7.0. Como datos de entrada al programa de ajuste se introdujeron el número de curvas Gaussianas que ajustarán al espectro así como las longitudes de onda (en nm) en las cuales se ubican los centros de las curvas Gaussianas. En este caso se propusieron 3 curvas Gaussianas ubicadas en 274nm, 278nm y 300nm. El programa arrojó como datos de salida las 3 curvas Gaussianas que mejor ajustan a la curva experimental. Los resultados del ajuste se muestran en la figura 17. La curva negra corresponde al espectro UV-VIS del extracto, mientras que las curvas en color verde son las 3 Gaussianas teóricas generadas por la deconvolución del software. La curva roja discontinua corresponde a la suma de las 3 Gaussianas obtenidas la cual se ajusta de forma aceptable al espectro experimental.

Cada una de las bandas de absorción obtenidas de la deconvolución se asignó a la EGCG, EC y trans-resveratrol glucosado, cuya estructura química se muestra en la figura 18 y con peso molecular de 390.384g/mol.

Este compuesto ha sido reportado previamente como el componente mayoritario de los compuestos derivados del resveratrol en los jugos de uva (Romero-Pérez, 1999) y en la raíz de la planta *Polygonum Cuspidatum* (Jayatilake, 1993).

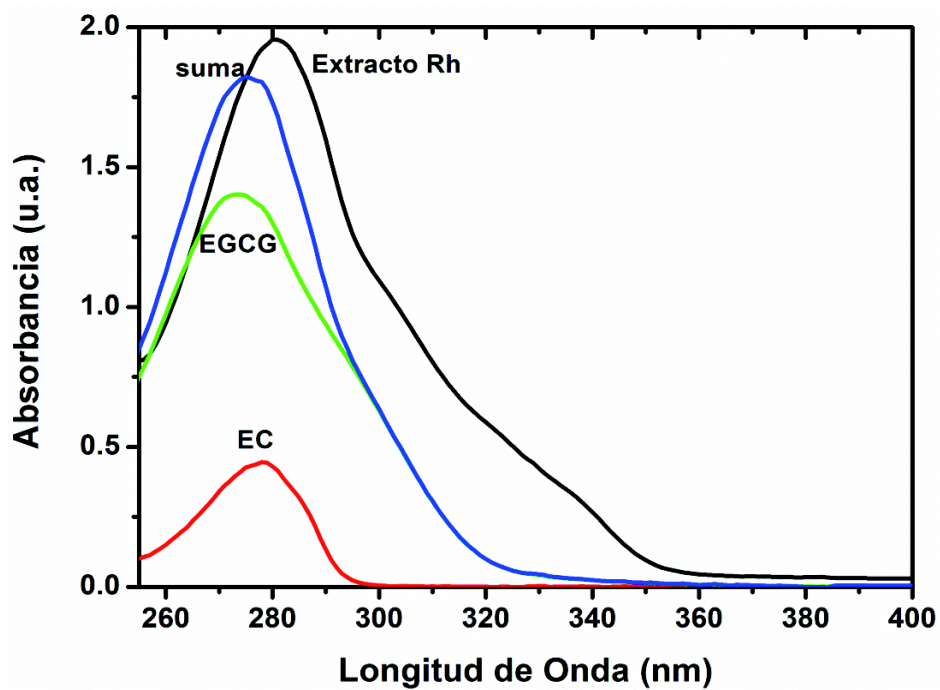


Figura 16. Ajuste experimental del espectro UV-VIS del extracto

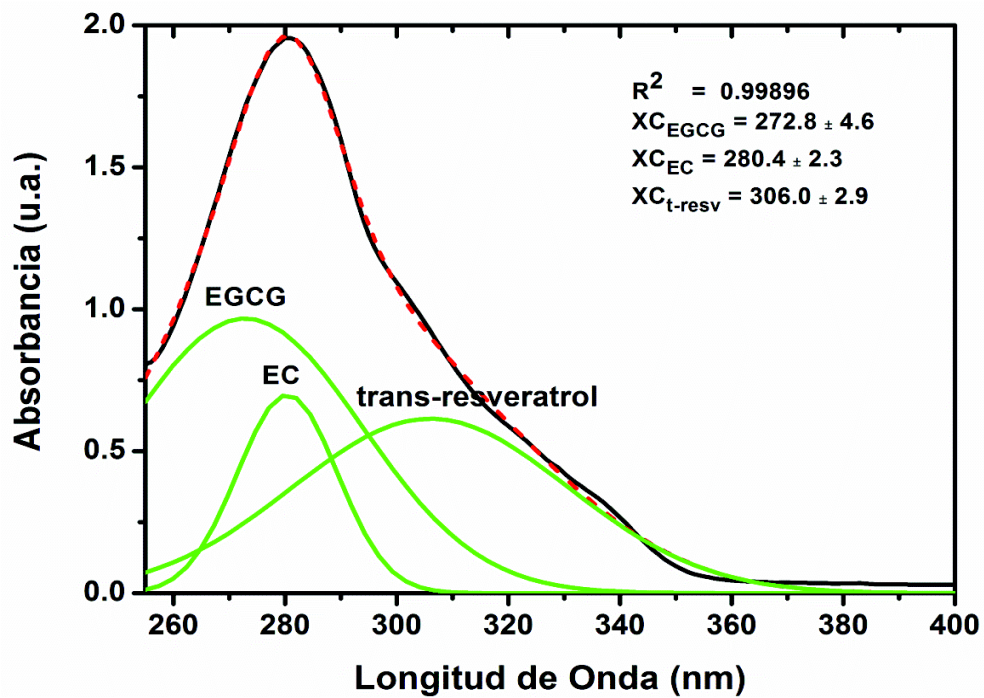


Figura 17. Deconvolución del espectro UV-VIS del extracto.

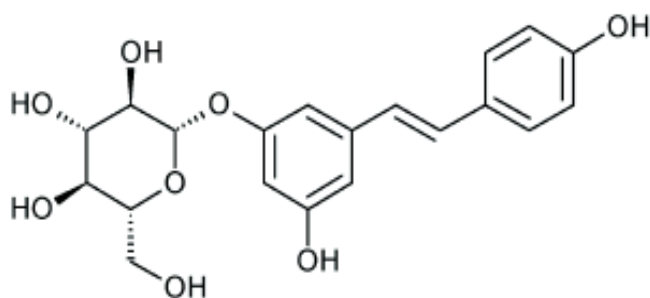


Figura 18. Estructura química del Resveratrol glucosado.

Se ha reportado un valor del coeficiente de extinción molar para el resveratrol glucosado de 16,200 L/(mol·cm) (Trela et al. 1996). Tomando este valor como referencia, se puede calcular a partir de la ley de Beer-Lambert la concentración de las 3 especies polifenólicas mediante la expresión  $c = A / \epsilon \cdot l$ , donde la concentración se expresa en mol/L y la longitud óptica  $l$  es igual a 1cm. En la tabla VIII se muestran los datos condensados que nos permiten determinar la concentración de las moléculas polifenólicas presentes en el extracto de *Rumex hymenosepalus*.

Tabla VIII. Concentración de las moléculas polifenólicas del extracto de *Rumex*.

| Compuesto         | $\epsilon \left( \frac{L}{mol \cdot cm} \right)$ | $\lambda$ en $A_{Max}$<br>(experimento) | $\lambda$ en $A_{Max}$<br>(Deconvolución) | $A_{Max}$ | $c$ ( $\mu M$ ) |
|-------------------|--|---|---|-----------|-----------------|
| EGCG              | $10,088 \pm 136$<br>(experimento)                | 274                                     | 273                                       | 0.964     | 95.559          |
| EC                | $2880.3 \pm 18.2$<br>(experimento)               | 278                                     | 280                                       | 0.694     | 240.947         |
| t-resveratrol (g) | 16,200 (ref 20)                                  | 306 (ref. 20)                           | 306                                       | 0.615     | 37.962          |

### VII.3. Obtención de las fracciones del extracto empleando Tetrahidrofurano como solvente de arrastre y caracterización por UV-VIS

La parte del extracto insoluble en THF fue etiquetada como fracción A y la parte soluble como fracción B. Para las pruebas de inhibición microbiana se prepararon soluciones con 0.01g de cada extracto en 1ml de agua ultrapura. De aquí se tomaron alícuotas de 50 $\mu$ L y diluidas en 2950 $\mu$ L de agua ultrapura para obtener los espectros UV-VIS de cada fracción empleando como referencia al agua ultrapura. En la figura 19 se observan los espectros obtenidos para las fracciones A y B en la región comprendida de 250nm a 450nm. En el interior de la figura se insertan fotos de las dos fracciones en polvo en las cuales se aprecia que el aspecto de ambas fracciones difiere entre sí sugiriendo la presencia de distintos compuestos presentes en cada una de ellas.

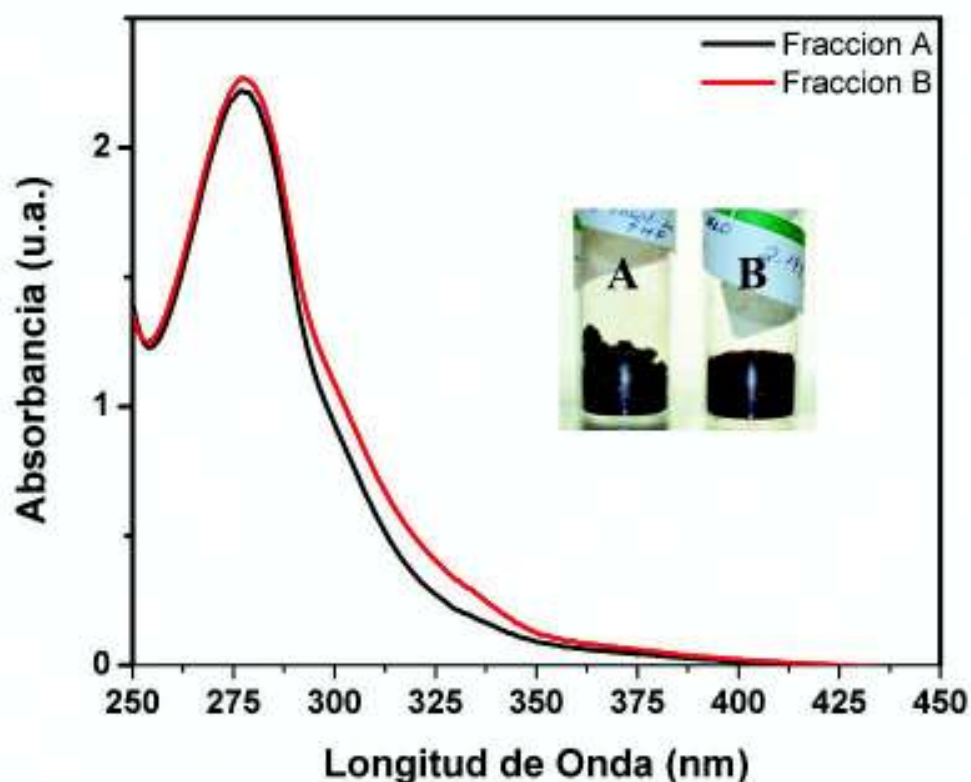


Figura 19. Espectros UV-VIS de fracciones A y B.

## VII.4. Nanopartículas sintetizadas

**VII.4.1. Caracterización por espectroscopía UV-VIS:** En la figura 20 se muestra el espectro UV-VIS de las nanopartículas de plata obtenidas de la síntesis con extractos de *Rumex hymenosepalus*. Como se observa en el espectro de la muestra antes de centrifugar, la banda de absorción característica de las nanopartículas de plata aparece en la región de 350nm-750nm con máximo ubicado en 445nm; se aprecia la banda de absorción característica de los polifenoles en el extracto (350nm-250nm) centrada en 280nm. Después de la última centrifugación se observó que el espectro del sobrenadante se compone exclusivamente de la señal del extracto sin indicios de nanopartículas de plata en el mismo. Por su parte, el espectro del precipitado indica que las nanopartículas aún coexisten con el extracto, lo cual habría de esperarse si la estabilidad del sistema de nanopartículas es atribuible a la presencia de las moléculas polifenólicas quienes además de reducir a los iones de plata participan estabilizando a las nanopartículas (Borase, 2014). Si se compara la relación del máximo de absorción del extracto en 280nm respecto al máximo de absorción de las nanopartículas de plata (445nm) se tiene que el cociente transita de un valor de 4.3 a 2.7, lo cual indica que el proceso de centrifugación acompañado de la sonicación permite deshacerse del excedente de extracto presente en los productos generados.



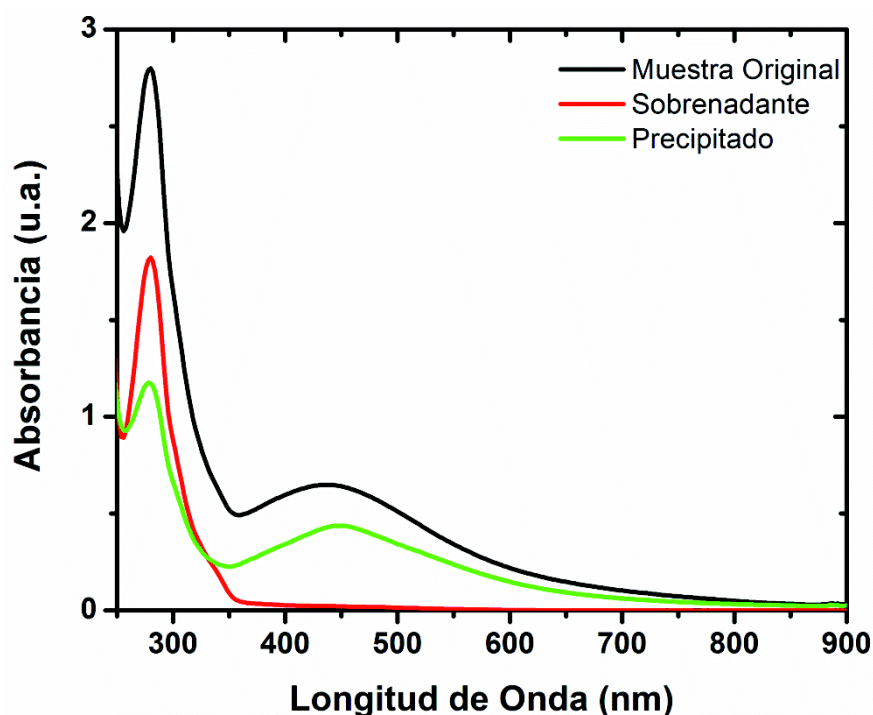


Figura 20. Espectros UV-VIS de nanopartículas de plata sintetizadas con extractos.

**VII.4.2. Estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión y Espectroscopía EDS:** La figura 21 corresponde a una micrografía de la muestra de la solución de nanopartículas de plata sin centrifugar amplificada 40,000 veces en el microscopio electrónico de transmisión. Se observan estructuras cuasiesféricas que corresponden a las nanopartículas, aparentemente embebidas en una matriz que presumiblemente corresponde al extracto. El análisis efectuado por energías dispersivas de rayos X (EDS) en la región que comprende la imagen se muestra en la figura 22 y tabla IX, donde se observa que la plata está presente de forma mayoritaria, pero además aparecen los elementos O, S y Cl provenientes del extracto. En el espectro EDS de la figura 20 se observa también la señal del Cu, C y Si, los cuales se descartan para la cuantificación porque la rejilla y el detector contribuyen sustancialmente en la presencia de estos elementos. La relación atómica Ag:O es de 2.47, lo que puede indicar que la plata esté en forma de óxido,  $Ag_2O$ .

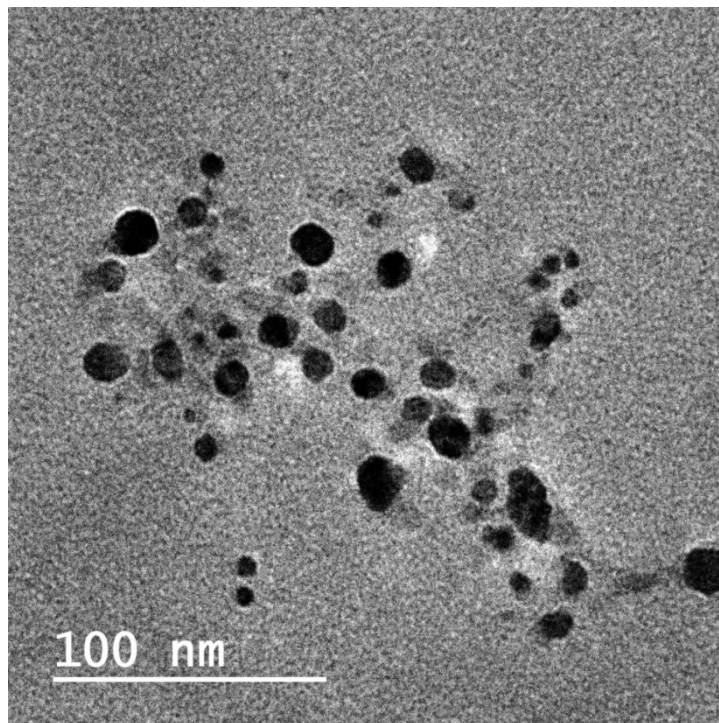


Figura 21. Micrografías por TEM de muestra de nanopartículas sin centrifugar.

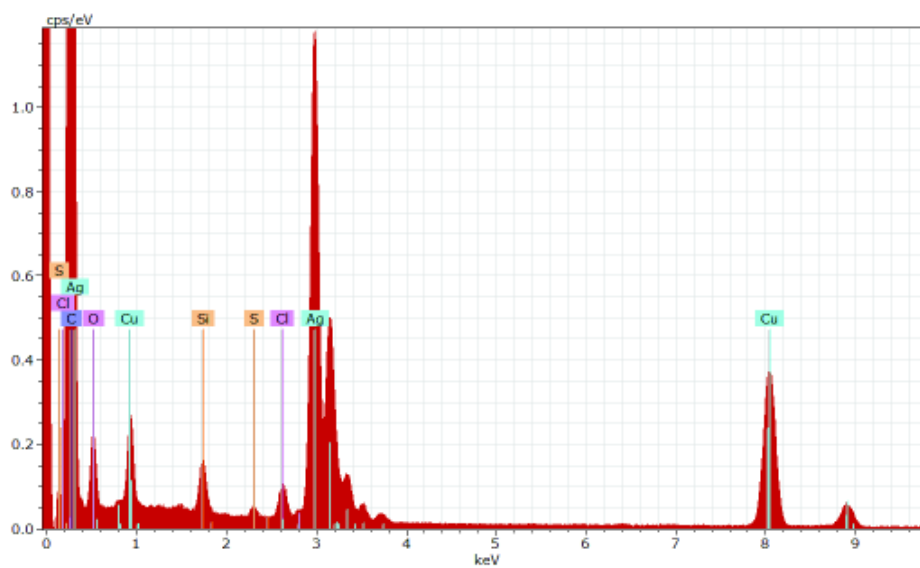


Figura 22. Espectro EDS de la región mostrada en la Fig.20

Tabla IX. Cuantificación de los elementos del espectro EDS de Fig.12

| <b>Elemento</b> | <b>NA</b> | <b>series</b> | <b>[% peso]</b> | <b>[%atómico]</b> | <b>[error %peso]</b> |
|-----------------|-----------|---------------|-----------------|-------------------|----------------------|
| <b>Plata</b>    | 47        | L-series      | 93.20           | 69.16             | 9.35                 |
| <b>Oxigeno</b>  | 8         | K-series      | 5.59            | 27.98             | 0.20                 |
| <b>Azufre</b>   | 16        | K-series      | 0.59            | 1.48              | 0.05                 |
| <b>Cloro</b>    | 17        | K-series      | 0.62            | 1.38              | 0.05                 |
| Sum:            |           |               | 100             | 100               |                      |

La figura 23 corresponde a una micrografía de la solución final de nanopartículas de plata tal como se empleó en el estudio de inhibición de microorganismos. En la imagen se observan los nanomateriales bien definidos y embebidos en una matriz claramente delimitada y translúcida al haz de electrones, a diferencia de la micrografía correspondiente a las nanopartículas sin centrifugar (Fig. 20).

La matriz donde se encuentran embebidas las nanopartículas corresponden al extracto de *Rumex hymenosepalus* de tal forma que después del proceso de limpieza se espera que la presencia del mismo sea menos significativa que al inicio. Esto queda confirmado en la cuantificación de los elementos químicos presentes en la muestra mediante el análisis EDS cuyo espectro se presenta en la figura 24. La tabla X resume los valores porcentuales atómicos de los elementos químicos presentes en la muestra. Se observa que el contenido de plata se incrementó significativamente y ahora la relación atómica Ag:O es de 18.12 lo cual nos permite asegurar que la plata presente está mayoritariamente en forma metálica y no en forma de óxido de plata, por lo que la presencia del oxígeno y azufre cuantificados por EDS provienen de los compuestos presentes en el extracto de *Rumex hymenosepalus* que aún queda en la muestra.

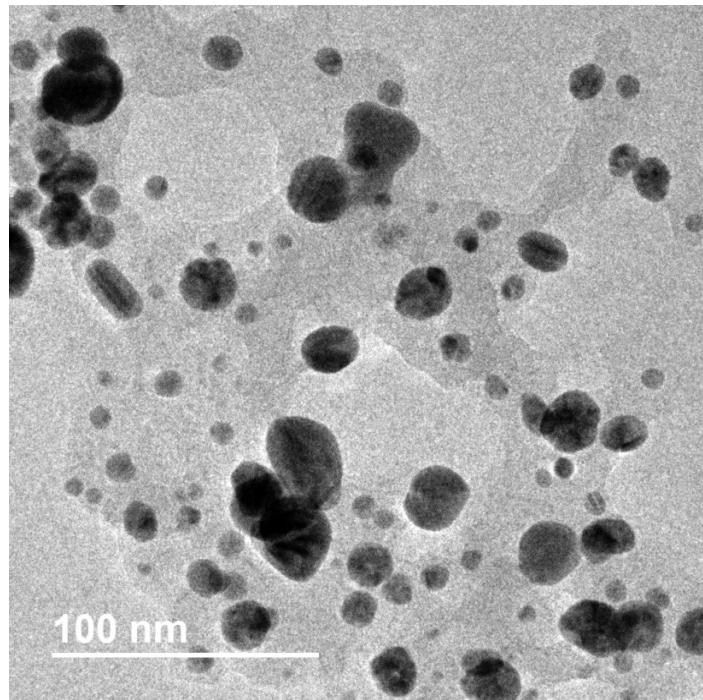


Figura 23. Micrografía por TEM de muestra de nanopartículas después de proceso de limpieza.

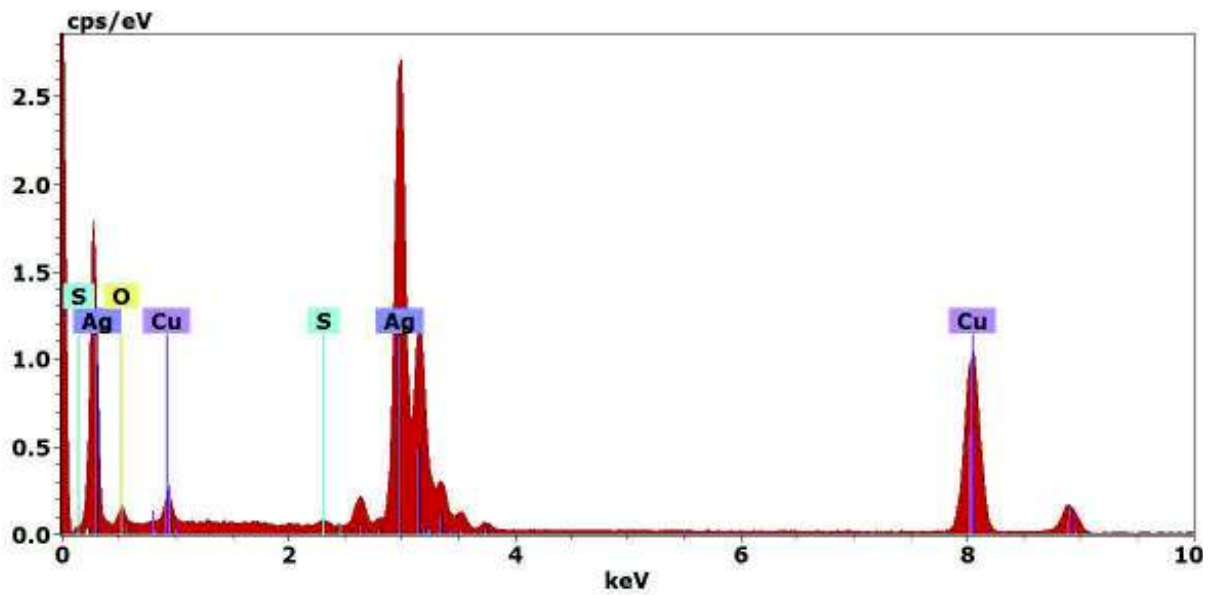


Figura 24. Espectro EDS de la región mostrada en la Fig.22 (nanopartículas de plata después del proceso de centrifugación-sonicación).

Tabla X. Cuantificación de los elementos del espectro EDS de Fig.13 (nanopartículas de plata después del proceso de centrifugación-sonicación).

| Elemento       | NA | series   | [% peso] | [%atómico] | [error %peso] |
|----------------|----|----------|----------|------------|---------------|
| <b>Plata</b>   | 47 | L-series | 98.72    | 93.35      | 3.18          |
| <b>Oxigeno</b> | 8  | K-series | 0.81     | 5.15       | 0.06          |
| <b>Azufre</b>  | 16 | K-series | 0.47     | 1.50       | 0.05          |
|                |    | Sum:     | 100      | 100        |               |

En la figura 25 se muestra un mosaico de 4 micrografías representativas que muestran la población de las nanopartículas presentes en la muestra después del proceso de limpieza. La mayor parte de la población presenta morfología cuasiesférica.

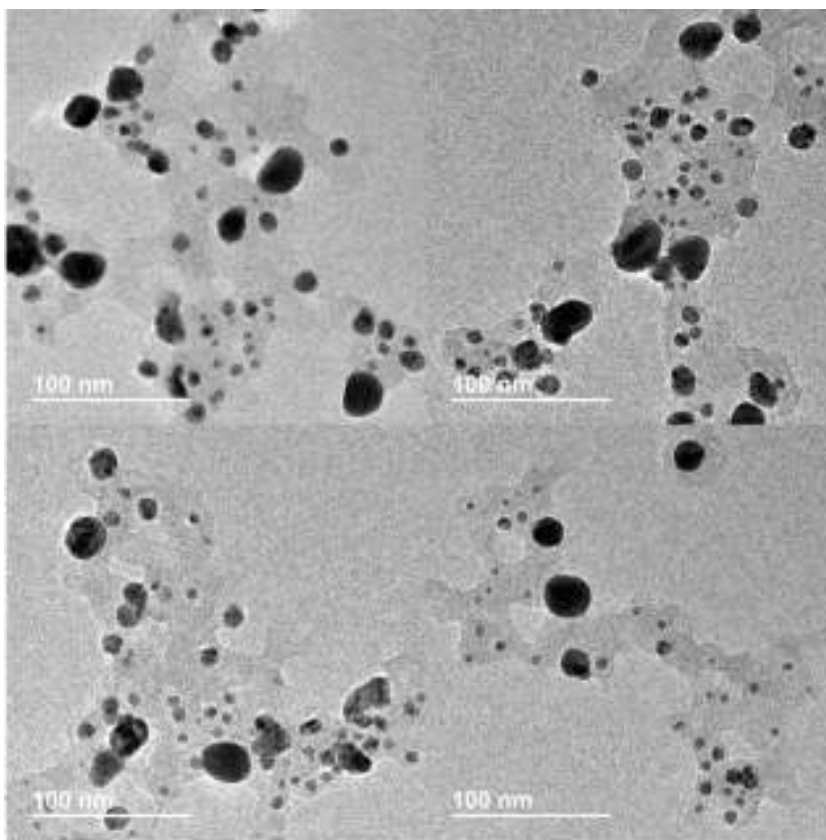


Figura 25. Micrografía de población de nanopartículas de Plata centrifugadas.

Para obtener la estadística de los tamaños de las nanopartículas centrifugadas se efectuaron las mediciones de aproximadamente 500 partículas. En el caso de las nanopartículas que presentan geometría irregular su tamaño se definió por su eje mayor. La distribución de los tamaños se muestra en la figura 26, donde se observa que el rango de tamaños está entre 3nm y 30nm, con el 50% de la población ubicada por debajo de los 10nm.

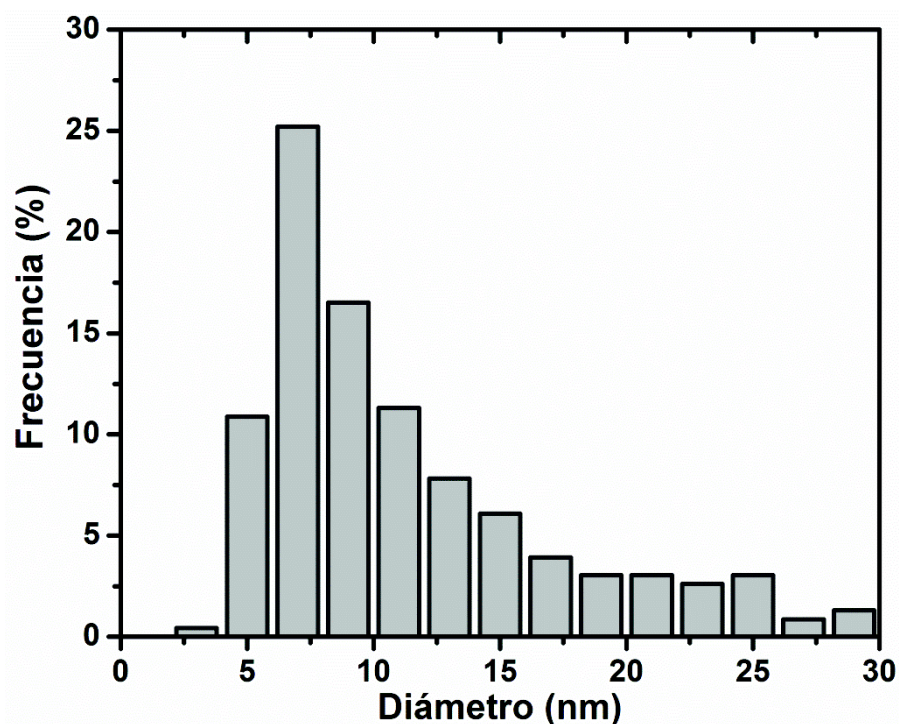


Figura 26. Distribución de tamaños de las nanopartículas de Plata centrifugadas.

El estudio por microscopía electrónica de alta resolución revela sin lugar a dudas la naturaleza cristalina de las nanopartículas obtenidas en la síntesis. En la figura 27 se muestra una imagen compuesta por 3 figuras donde la imagen A corresponde a una micrografía de alta resolución de una nanopartícula amplificada 400,000 veces y en donde se aprecia claramente la estructura cristalina del nanomaterial. Se seleccionó una región para análisis (recuadro rojo) y mediante análisis por transformada de Fourier fue posible reconstruir la región cristalina de la zona seleccionada (imagen B) cuyos planos cristalinos arrojan distancias características de 2.43nm y 2.24nm. En C se muestra el patrón de difracción de electrones obtenido para la imagen 27-

A, donde los números entre paréntesis corresponden a los índices de Miller de las distintas familias de planos cristalinos relacionados a una estructura cristalina cúbica centrada en las caras. De acuerdo a la ficha cristalográfica de la plata correspondiente a esta estructura, los índices de Miller (101), (1-12), (008) y (203) se asocian a las distancias cristalográficas de 2.425 Å, 2.236 Å, 1.25 Å y 1.17 Å, lo cual coincide con las distancias obtenidas en 27-B.

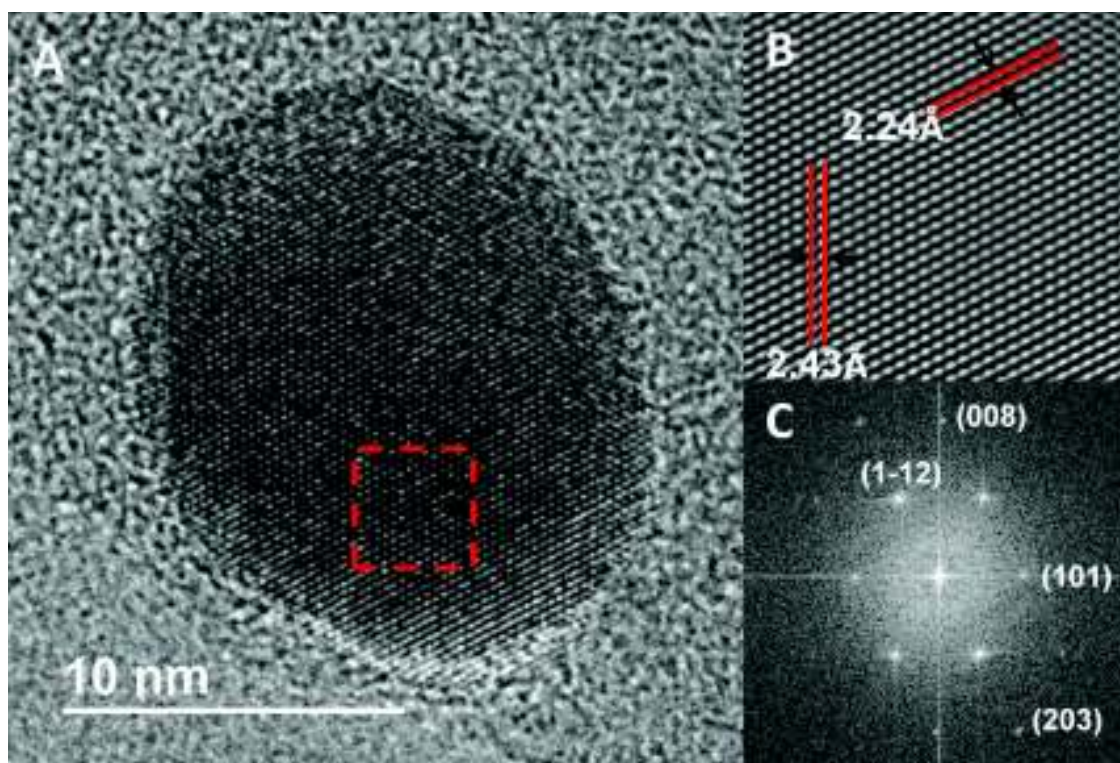


Figura 27. A) Micrografía de alta resolución (HRTEM) de nanopartícula de plata con estructura cristalina hexagonal. B) Distancias de planos cristalinos del recuadro rojo. C) Patrón de difracción electrónica de la nanopartícula.

Procediendo de la misma forma que en el caso anterior, en la Figura 28-A se tiene una nanopartícula que muestra con claridad sus planos cristalinos. Particularmente se ha seleccionado una región que muestra planos con distintas orientaciones. La figura 28-B señala que las distancias interplanares son las mismas (2.33 Å) de tal forma que se tratan de los mismos planos cristalinos pero con orientaciones diferentes. Los índices de Miller (111) y

(311) de la figura 28-C corresponden a las distancias cristalográficas de  $2.359\text{\AA}$  y  $1.231\text{\AA}$  para la estructura cristalina cúbica centrada en las caras (fcc) de la plata según la ficha cristalográfica.

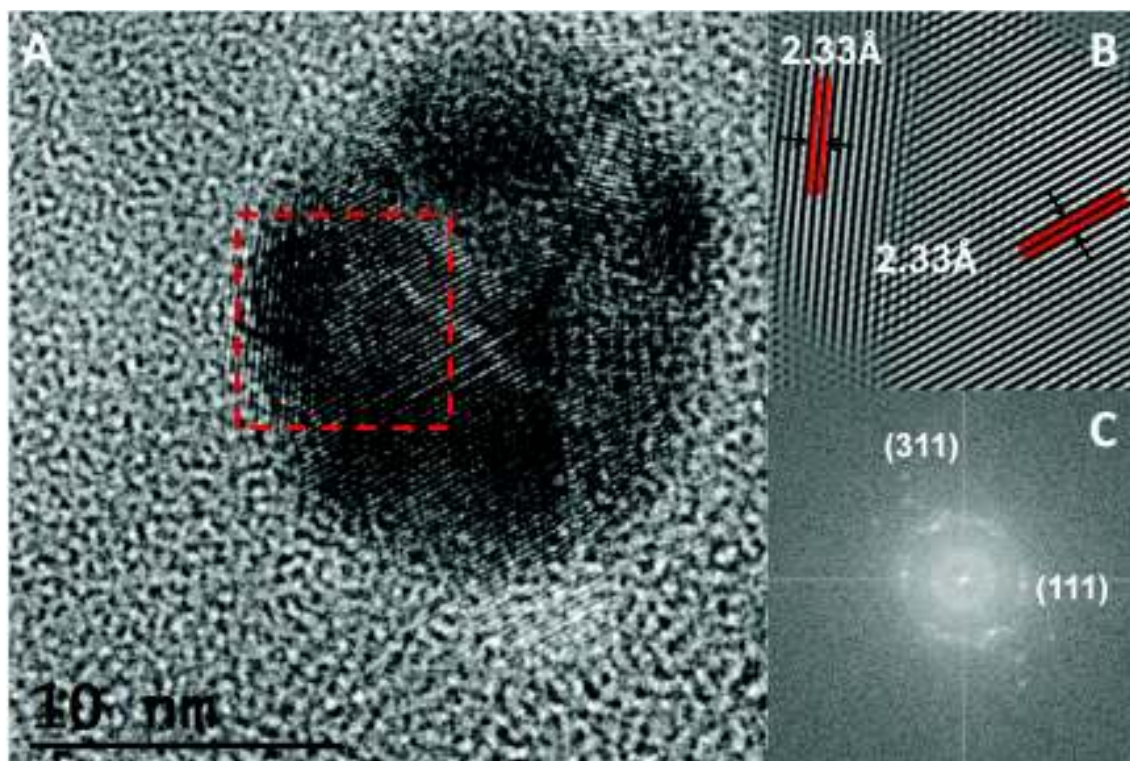


Figura 28. Micrografía de alta resolución (HRTEM) de nanopartícula de plata con estructura cristalina cúbica centrada en las caras. B) Distancias de planos cristalinos del recuadro rojo. C) Patrón de difracción electrónica de la nanopartícula.

De los resultados de Microscopía electrónica de alta resolución podemos establecer que las nanopartículas son de carácter cristalino donde coexisten poblaciones con estructura cristalina hexagonal y cúbica centrada en la cara (fcc).

### VII.5. Evaluación temporal del pH de la reacción de síntesis

El estudio de la evolución del pH de la solución de nanopartículas a medida que se lleva a cabo la reacción, muestra claramente que existe un proceso de acidificación mientras se está llevando a cabo la síntesis de los nanomateriales. La caída más pronunciada en el valor del pH



se da en la primera hora variando de 4.5 a 4. A las cinco horas después de iniciada la síntesis el valor está cerca de 3.2, alcanzando un valor constante en 2.5 cerca de las 16 horas después de iniciar la síntesis.(Figura 29)

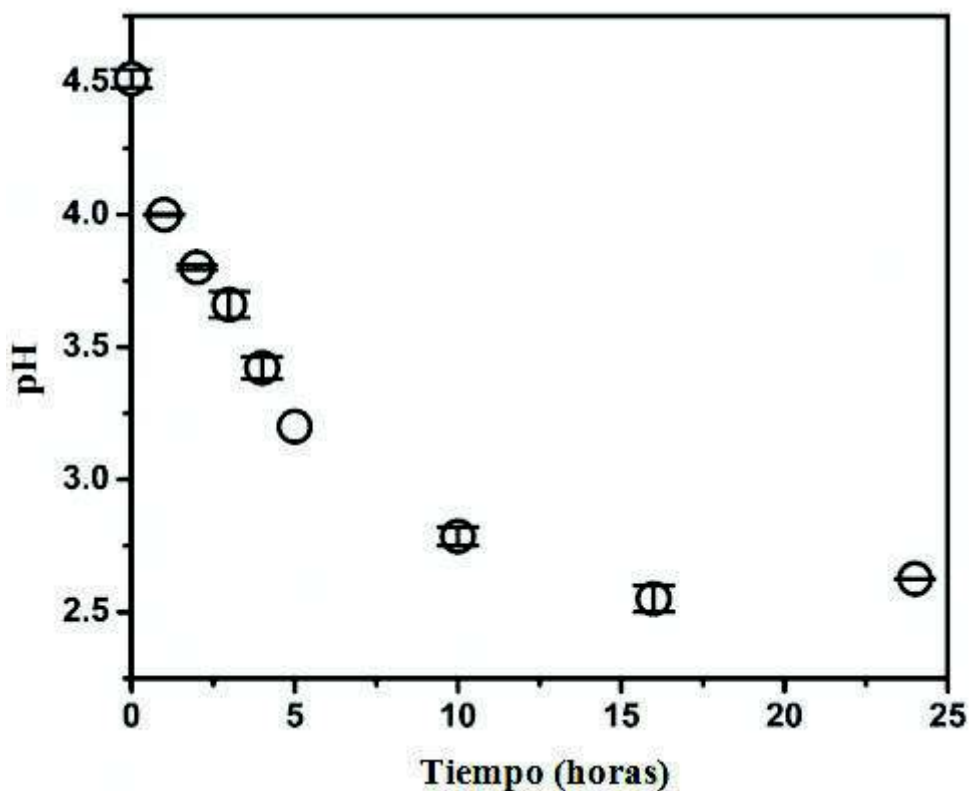


Figura 29. Evolución temporal del pH de la reacción de síntesis de Nanopartículas de plata.

#### VII.4 Resultados inhibición microbiana

De todo el proceso de centrifugación y recuperación de sólidos de los nanomateriales se obtuvo una masa neta de 0.01g la cual se resuspendió en 1ml de agua ultrapura sonicando durante 1 hora para homogenizar la suspensión. La densidad de la solución de nanopartículas de plata determinada experimentalmente fue  $\rho=1.0085\text{g/cm}^3$ . De igual forma se procedió con las soluciones acuosas con los polvos de las fracciones A y B del extracto de *Rumex*. La concentración final de la solución de nanopartículas fue de  $10,000\mu\text{g/ml}$ , de tal forma que en cada pocillo se colocó para las pruebas  $300\mu\text{g}$  de material inhibitorio.

Con relación al efecto inhibitoria de los extractos probados, al transcurrir las 24 horas de depositadas los agentes inhibitorios, se observó que en bacterias Gram negativas (Figura 30), bacterias Gram positivas (Figura 31) y levadura (Figura 32) presentaron inhibición por parte de las nanopartículas y en algunos casos, por el extracto.

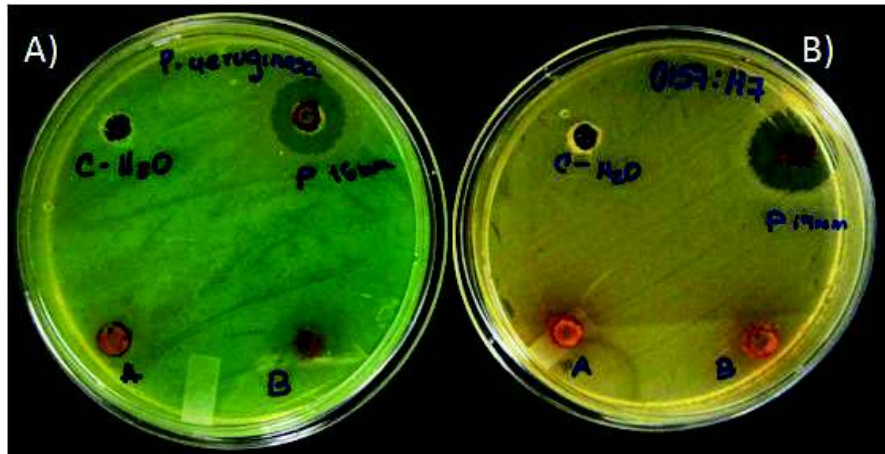


Figura 30. Inhibición del crecimiento por nanopartículas de plata en bacterias Gram negativas. A) *Pseudomonas aeruginosa*, B) *E. coli* O157:H7.

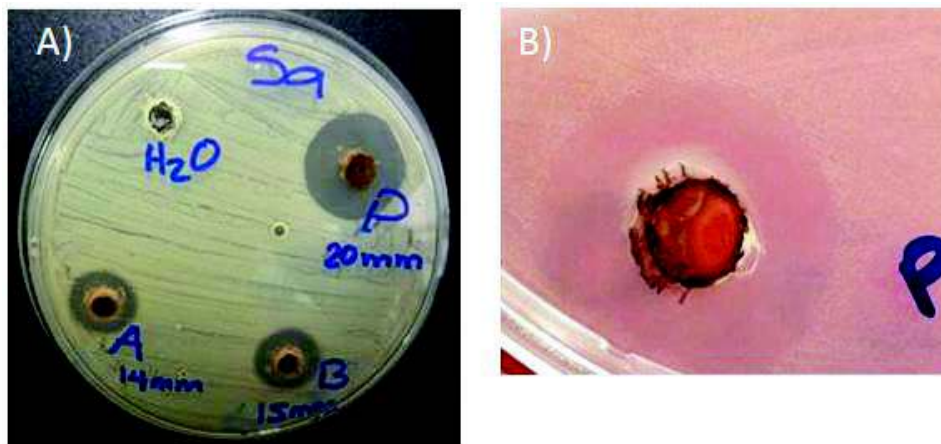


Figura 31. Resultados de inhibición de nanopartículas de plata en bacterias Gram positivas: A) *Staphylococcus aureus* y B) *Listeria monocytogenes*.

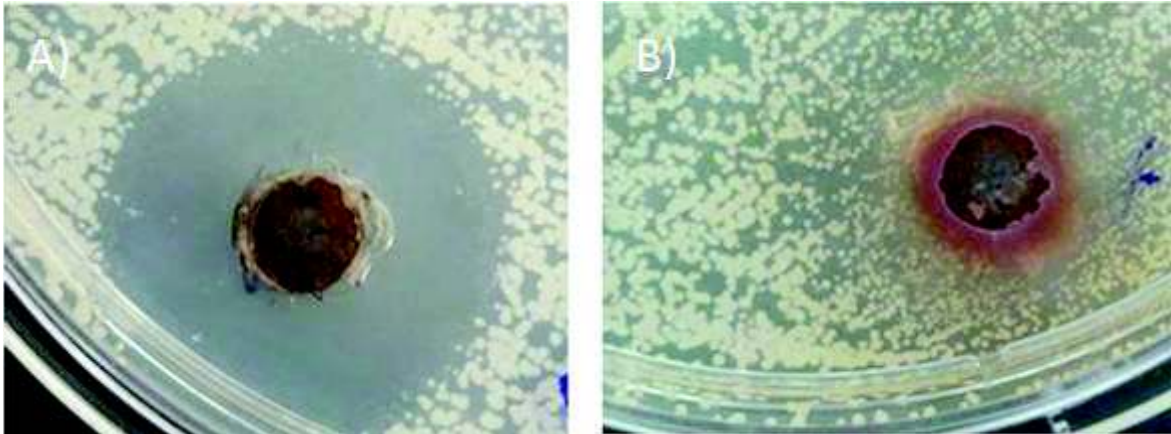


Figura 32. Inhibición de A) nanopartículas de plata y B) extracto A en levadura.

De la tabla XI se puede apreciar lo siguiente:

1. En *E.coli* (ATCC 11229) se presentó el menor efecto inhibitorio de las nanopartículas de plata estadísticamente, comparado con los otros microorganismos.
2. En *E.coli* 0157:H7 (ATCC 6539) fue mayor el efecto inhibitorio de las nanopartículas de plata comparada con la cepa de *E.coli* (ATCC 11229), pero menor comparado con *S. aureus* (ATCC 25923) y *C. albicans* (ATCC 90028).
3. Para *Salmonella tiphy* el efecto inhibitorio de las nano Ag fue mayor comparado con *E.coli* (ATCC 11229), pero menor comparado con relación a *S. aureus* (ATCC 25923) y *C. albicans* (ATCC 90028).
4. Para *P. aeruginosa* el efecto de las nano Ag fue mayor comparado con la *E. coli* (ATCC 11229) pero menor comparado con *S. aureus* (ATCC 25923) y *C. albicans*.
5. *S. aureus* (ATCC 25923) fue más susceptible a las nano Ag, que en *E. coli* (ATCC 11229), *E. coli* 0157:H7, *Salmonella tiphy* y *P. aeruginosa*, pero menos que *C. albicans* (ATCC 90028).
6. En *C. albicans* (ATCC 90028) las nano Ag tuvieron mayor efecto que en todos los demás microorganismos.

7. En *L. monocytogenes* (ATCC 7644) tienen las nanopartículas de plata tuvieron mayor efecto inhibitorio que en *E.coli* (ATCC 11229) pero menor que en *C.albicans* (ATCC 90028).

8.- Las fracciones del extracto A y B presentaron efectos inhibitorios para las bacterias Gram positivas, *S. aureus* (ATCC 25923) y *L. monocytogenes* (ATCC 7644) y sin afectar a las Gram negativas ni a la levadura *C. albicans* (ATCC 90028). No se encontraron diferencias significativas entre los halos de inhibición obtenidos por las distintas fracciones del extracto con respecto a las Gram positivas.

9.- Las inhibiciones de los extractos A y B sobre las Gram positivas no superan a las inhibiciones mostradas por las nanopartículas.

Tabla XI. Tabla general de datos de inhibición

| Cepas utilizadas                         | Sustancias utilizadas y sus halos de inhibición |    |    |          |    |       |    |    |                |    |            |    |    |          |    |            |    |    |                  |  |
|--|---|----|----|----------|----|-------|----|----|----------------|----|------------|----|----|----------|----|------------|----|----|------------------|--|
|  | Agua  |    |    |          |    | NP Ag |    |    |                |    | Extracto A |    |    |          |    | Extracto B |    |    |                  |  |
|  | 1   | 2  | 3  | Promedio |    | 1     | 2  | 3  | Promedio       |    | 1          | 2  | 3  | Promedio |    | 1          | 2  | 3  | Promedio         |  |
| <i>E. coli</i> ATCC 11229                | NP  | NP | NP | 0        | mm | 12    | 10 | 12 | 11.3 mm ± 1.2  | mm | 0          | 0  | 0  | 0 mm     | mm | 0          | mm | 0  | 0 mm             |  |
| <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895        | NP  | NP | NP | 0        | mm | 17    | 17 | 19 | 17.7 mm ± 1.2  | mm | 0          | 0  | 0  | 0 mm     | mm | 0          | 0  | 0  | 0 mm             |  |
| <i>Salmonella serovar tify</i> ATCC 6539 | NP  | NP | NP | 0        | mm | 17    | 17 | 18 | 17.3 mm ± 0.57 | mm | 0          | 0  | 0  | 0 mm     | mm | 0          | 0  | 0  | 0 mm             |  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 | NP  | NP | NP | 0        | mm | 16    | 16 | 17 | 16.3 mm ± 0.5  | mm | 0          | 0  | 0  | 0 mm     | mm | 0          | 0  | 0  | 0 mm             |  |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923  | NP  | NP | NP | 0        | mm | 20    | 21 | 20 | 20.4 mm ± 0.6  | mm | 14         | 14 | 14 | 14 mm    | mm | 15         | 11 | 10 | 12 mm ± 2.7 mm   |  |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644  | NP  | NP | NP | 0        | mm | 20    | 17 | 18 | 18.4 mm ± 1.5  | mm | 14         | 14 | 14 | 14 mm    | mm | 12         | 14 | 12 | 12.7 mm ± 1.2 mm |  |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 90028       | NP  | NP | NP | 0        | mm | 24    | 24 | 23 | 23.7 mm ± 0.6  | mm | 0          | 0  | 0  | 0 mm     | mm | 0          | 0  | 0  | 0 mm             |  |

## VIII. DISCUSIONES

### VIII.1. Extracto de *Rumex hymenosepalus* y sus fracciones

Los resultados de espectrometría UV-VIS mostraron que en los extractos de *Rumex hymenosepalus* coexisten compuestos de la familia de las catequinas (EC y EGCG) y de los estilbenoides (transresveratrol). Dichos resultados coinciden con los reportados en trabajos previos (Rodríguez et al, 2013) y (Rivero et al, 2005), quienes llegaron a la misma conclusión mediante las técnicas experimentales de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y HPLC respectivamente para extractos de *Rumex hymenosepalus*. Los espectros UV-VIS de las fracciones A y B del extracto (Fig.19) no mostraron diferencias cualitativas importantes, sin embargo, la intensidad de la absorbancia en 280nm es ligeramente mayor para la fracción soluble en THF (fracción B) sucediendo lo mismo en la región comprendida entre 320nm-350nm, lo cual se asocia a la presencia del resveratrol. Este resultado indica una mayor presencia de compuestos polifenólicos en la fracción soluble en THF. Para confirmar lo anterior se realizaron análisis para la determinación de polifenoles totales en las muestras del extracto original de *Rumex hymenosepalus* y sus fracciones A y B, por el método colorimétrico basado en el reactivo Folin-Ciocalteu (Crozier, 2011). La cuantificación se efectuó empleando como estándar una curva de calibración de ácido gálico. Los resultados se observan en la tabla XII. De la tabla se desprende que la fracción A tiene un contenido menor de polifenoles que el extracto original de *Rumex*, mientras que la fracción B es más rica en polifenoles que el extracto original lo cual confirma la idea de que el solvente THF arrastra o solubiliza una porción de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto, aunque aún quedaría por comprobar si esta porción arrastrada corresponde al trans-resveratrol. Para ello se sugieren como trabajos a futuro la ejecución de experimentos que involucren la caracterización de las fracciones A y B del extracto por técnicas de mayor sensibilidad como pueden ser la Resonancia Nuclear (RMN) o Espectroscopía de Masas, e incluso explorar la separación y recuperación de los distintos compuestos polifenólicos del extracto mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

Tabla XII: Cuantificación de fenoles totales.

| <b>Extracto</b>            | <b>Fenoles Totales (mg/g*)</b> |
|----------------------------|--------------------------------|
| <i>Rumex hymenosepalus</i> | 496 ± 23                       |
| <b>Fracción A</b>          | 484 ± 12                       |
| <b>Fracción B</b>          | 576 ± 21                       |

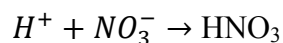
### **VIII.2. Síntesis de Nanopartículas de Plata con extracto de *Rumex hymenosepalus*.**

Los resultados de la síntesis de las nanopartículas de plata empleando extractos de *Rumex hymenosepalus* indican que con los compuestos presentes en el extracto es posible generar nanomateriales sin oxidar, embebidos en una matriz del mismo extracto que permiten la estabilización de los productos generados evitando la coalescencia entre las nanopartículas.

La morfología de los nanomateriales es mayoritariamente cuasi-esférica y los tamaños varían en un rango comprendido entre 3nm y 30nm, lo cual los ubica en un tamaño apropiado para los efectos con actividad biológica que se desean obtener. Un aspecto interesante a destacar es el hecho relacionado con el tipo de estructura cristalina que presentan las nanopartículas de plata obtenidas pues además de la fase cristalina o cúbica centrada en las caras (fig.27) la cual es la presentación más común en que se encuentra la plata metálica, también se detectó la fase cristalina hexagonal (fig.26) que es reportada con menor frecuencia. Este es un resultado consistente con otros reportes de nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de otras plantas (Sathishkumar, 2009) y deja abierta la posibilidad para investigar el papel que juega el tipo de cristalinidad de estas nanopartículas de plata en los efectos bioactivos (inhibición microbiana y apoptosis celular).

La curva de la evolución temporal del pH (fig.28) durante la síntesis de las nanopartículas revela que el medio se acidifica. Esto puede explicarse en términos de un proceso de desprotonación del grupo hidroxilo de las moléculas polifenólicas que reacciona con el ión

nitrate proveniente del precursor metálico para dar lugar al ácido nítrico como subproducto mediante la reacción:



El valor del pH de la reacción alcanzó su equilibrio 16 horas después de iniciada la síntesis, lo cual fue confirmado al monitorear el máximo de la absorción asociado a las nanopartículas de plata (430nm) mientras se efectuaba la reacción de síntesis tal como se muestra en la figura 33.

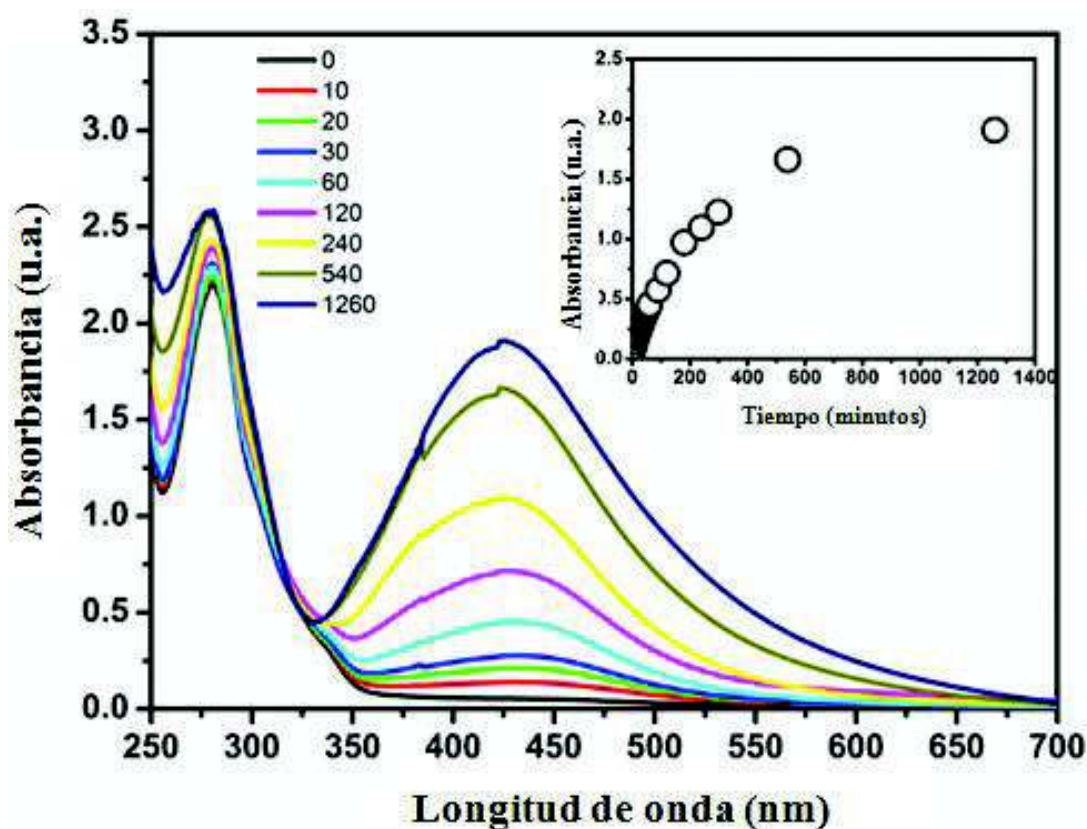


Fig. 33: Evolución temporal del máximo de los espectros de absorción de las nanopartículas de plata sintetizadas con *Rumex hymenosepalus*.

En el interior de la figura 33 se muestra la absorción en 430nm conforme avanza la reacción de síntesis. Al igual que en el caso de la medición del pH, se tiene que el equilibrio se alcanzó cerca de las 18 horas de iniciada la reacción lo cual apoya la idea de que el mecanismo de



reacción está asociada a un proceso de desprotonación de los polifenoles presentes en el extracto de *Rumex hymenosepalus* tal y como lo proponen (Wu et al, 2011) quienes estudiaron la síntesis de nanopartículas de plata empleando fibras de colágeno a las cuales se les adhirió el compuesto de Epigallocatequina galato (EGCG) como agente reductor de los iones de plata. Los autores proponen un mecanismo donde la molécula polifenólica EGCG se desprotona en dos grupos hidroxilos (OH) por cada grupo galato de tal forma que cada molécula de EGCG acompleja a dos iones de plata como se muestra en la figura 34. Posteriormente se da la reacción óxido/reducción donde cada ión de plata recibe el electrón proveniente del oxígeno y los grupos que inicialmente eran hidroxilo se transforman en grupos carbonilos por lo que la molécula de EGCG pasa a su forma oxidada de Quinona. Por su parte los iones de plata pasan a su forma metálica ( $Ag^{+1} \rightarrow Ag^0$ ) agregándose para formar las nanopartículas. Una vez formada las nanopartículas, los mismos grupos polifenólicos, ahora en su forma oxidada o de Quinona serán los responsables de acomplejar a las nanopartículas metálicas de plata estabilizándolas y evitando la agregación de las mismas. Es decir, el compuesto de EGCG cumple con una doble función al participar como agente reductor y como agente estabilizante una vez formadas las nanopartículas. Basándonos en la descripción anterior, en nuestro trabajo se propone este mismo mecanismo de síntesis de las nanopartículas de plata y estabilización de las mismas, con la diferencia de que en el extracto de *Rumex hymenosepalus* se tienen mayor variedad de moléculas polifenólicas como son la EC, EGCG y el trans-resveratrol glucosado (fig. 5 y fig. 18).

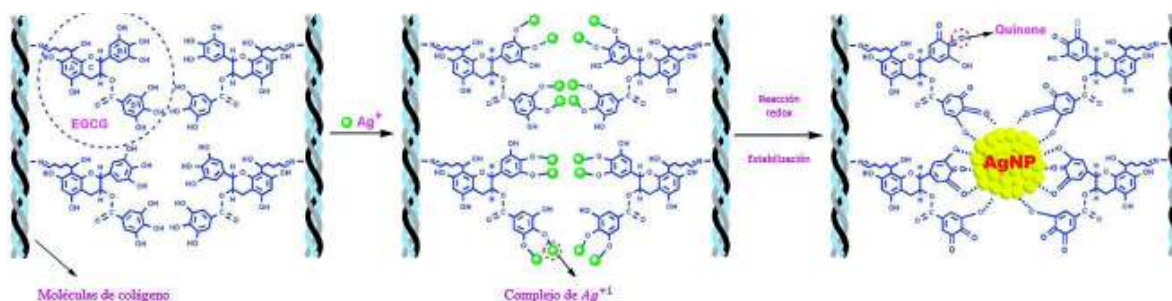


Fig.34: Mecanismo propuesto para la síntesis y estabilización de nanopartículas de plata empleando EGCG anclado a fibras de colágeno (Wu, H. et al, 2011).

### VIII.3. Efectos antimicrobianos de las fracciones del extracto y las nanopartículas plata

Las nanopartículas de plata resultaron ser efectivos agentes antibacterianos capaces de inhibir el crecimiento de diversas bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, además de la levadura *Cándida albicans*, por lo que se puede considerar que estas nanopartículas sintetizadas con extractos de *Rumex hymenosepalus* son de amplio espectro.

El mecanismo de acción reside en su capacidad de interactuar con proteínas presentes en cualquiera de estos microorganismos, inhibiendo así algún proceso y actividad esencial para que la infección se lleve a cabo. Particularmente, algunos trabajos sugieren que las nanopartículas de plata interfieren con su crecimiento al unirse a proteínas que participan en el proceso de síntesis de la pared celular de los microorganismos (Lara, 2010; Ayala, 2010).

Las bacterias Gram positivas son más susceptibles a moléculas polifenólicas que las bacterias Gram negativas debido a que estas moléculas tienden a unirse al peptidoglicano presentes en las bacterias. En el caso de las bacterias Gram negativas el peptidoglicano está blindado por una membrana externa que está compuesta principalmente por lipopolisacáridos cargados negativamente. Por este motivo, la carga negativa de las moléculas polifenólicas, debido a procesos de desprotonación, dan lugar a una interacción repulsiva con la barrera de los lipopolisacáridos lo cual explica que los diferentes extractos no inhibieron a las bacterias Gram negativas pero si a las Gram positivas, donde no existe dicha frontera electrostática. De igual forma, explicaría el hecho de que las nanopartículas de plata (cargadas positivamente) presentaron inhibición en ambos grupos bacterianos debido a la interacción de los lipopolisacáridos promoviendo un efecto bioactivo de las nanopartículas.

Un aspecto importante a resaltar sobre los nanomateriales obtenidos en la síntesis con extractos de *Rumex hymenosepalus* y la respuesta antimicrobiana de los mismos, es el hecho de que las condiciones de síntesis de las nanopartículas en este trabajo generaron una población de nanopartículas donde el 60% de los tamaños están por debajo de 15nm. El tamaño de las nanopartículas de plata empleadas como agentes antimicrobianos juegan un rol crítico en la

capacidad para inhibir el crecimiento de la bacteria *E. coli*, tal como se muestra en la figura 35 (Agnihotri, S. et al, 2014). De tal forma, como propuesta a desarrollar a futuro habría que implementar un método de síntesis que nos permita reducir el total de la población de las nanopartículas a tamaños cercanos a los 5nm para incrementar la capacidad inhibitoria de los productos generados.

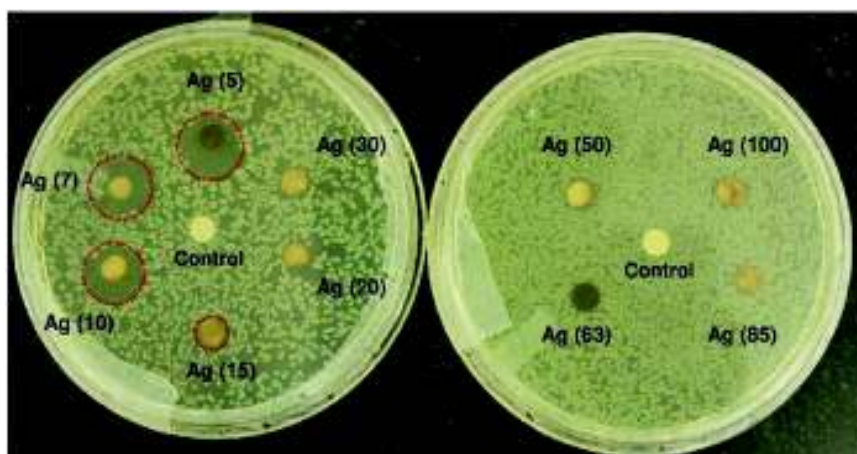


Fig.35: Prueba de difusión del disco con diferentes tamaños de nanopartículas de plata contra la *E. coli*. (Agnihotri, et al., 2014)

## IX. CONCLUSIONES

Los extractos de la cañagria obtenidos con una mezcla de etanol/agua son capaces de reducir a los iones de plata presentes en una solución de Nitrato de plata favoreciendo la síntesis de nanopartículas de plata a temperatura ambiente.

Las nanopartículas obtenidas están embebidas en una matriz formada por los compuestos presentes en el extracto, lo que permite la estabilización de las nanopartículas de plata.

Las dos fracciones del extracto obtenidas (A y B) tienen efecto inhibitorio en bacterias Gram positivas, pero no en las Gram negativas. El tamaño de los halos de inhibición de los extractos, en las bacterias Gram positivas, no supera el tamaño del halo producido por las nanopartículas de Ag.

Las nanopartículas de plata inhibieron el crecimiento de ambos grupos bacterianos. En el caso de la levadura *Candida albicans* las nanopartículas generaron la mayor inhibición de los microorganismos evaluados.

Por su capacidad para inhibir el crecimiento de todos los microorganismos evaluados (bacterias Gram positivas, negativas y levadura) se puede decir que las nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de *Rumex hymenosepalus* presentaron un amplio espectro de inhibición.

## **X. RECOMENDACIONES**

- 1.- Caracterizar ampliamente los distintos compuestos presentes en el extracto mediante técnicas de mayor sensibilidad como HPLC.
- 2.- Sintetizar nanopartículas con las distintas fracciones obtenidas en el paso anterior y probar su capacidad inhibitoria.
- 3.- Realizar estudios para determinar la concentración mínima inhibitoria.
- 4.- Extender el estudio hacia Virus.
- 5.- Realizar estudios por microscopia confocal de barrido laser para entender el mecanismo de acción de los nanomateriales en microorganismos.
- 6.- Extender el estudio de la bioactividad de nanomateriales por síntesis verde aplicado a líneas celulares cancerosas (efectos apoptóticos) y líneas celulares sanas (citotoxicidad).

## XI. LITERATURA CITADA

- Alcamo, I. E., & Alcamo, I. E. (1994). *Fundamentals of microbiology*. Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Agnihotri, S., Mukherji, S., y Mukherji, S. 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4:3974-3983.
- Alshatwi, A. A., Athinarayanan, J., y Periasamy, V. S. 2015. Green synthesis of bimetallic Au@Pt nanostructures and their application for proliferation inhibition and apoptosis induction in human cervical cancer cell. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26:1-9.
- Amabile-Cuevas, C. 2010. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4:126-131.
- Anibal de J. Sosa , D. K. Byarugaba, C. F. Amábile, P. Hsueh, S. Kariuki, I. N. Okeke. *Antimicrobial Resistance in Developing Countries – 2010*.
- Atomssa, T. y Gholap, A. V. 2015. Characterization and determination of catechins in green tea leaves using UV-visible spectrometer. *Journal of Engineering and Technology Research*. 7:22-31.
- Bark, K. M., Yeom, J. E., Yang, J. I., Yang, I. J., Park, C. H., y Park, H. R. 2011). Spectroscopic studies on the oxidation of catechin in aqueous solution. *B Korean Chem Soc*, 32:3443-3447.
- Borase, H. P., Salunke, B. K., Salunkhe, R. B., Patil, C. D., Hallsworth, J. E., Kim, B. S., y Patil, S. V. 2014. Plant extract: a promising biomatrix for ecofriendly, controlled synthesis of silver nanoparticles. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173:1-29.
- Byarugaba, D. K., Amabile-Cuevas, C. F., Hsueh, P. R., Kariuki, S., y Okeke, I. N. 2010. *Antimicrobial resistance in developing countries*. Springer.

Crozier, S. J., Preston, A. G., Hurst, J. W., Payne, M. J., Mann, J., Hainly, L., y Miller, D. L. 2011. Cacao seeds are a “Super Fruit”: A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chemistry Central Journal*, 5:1-6.

Cui, Y., Oh, Y. J., Lim, J., Youn, M., Lee, I., Pak, H. K., ... y Park, S. 2012. AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Food microbiology*, 29:80-87.

De Rivas, C. S. (2006). ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...?. *Revista Química Viva*, 5(2).

El-Hawary, S. A., Sokkar, N. M., Ali, Z. Y., y Yehia, M. M. 2011. A profile of bioactive compounds of *Rumex vesicarius* L. *Journal of food science*, 76:C1195-C1202.

Ferreres, F., V. Ribeiro, A. Gil, M. A. Rodrigues, R. M. Seabra, P. B. Andrade, y P. Valentao. 2006. *Rumex induratus* Leaves: Interesting Dietary Source of Potential Bioactive Compounds. *J. Agric. Food Chem.*54:5782-5789.

Ghosh, S., Patil, S., Ahire, M., Kitture, R., Kale, S., Pardesi, K., y Chopade, B. A. (2012). Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *International journal of nanomedicine*, 7, 483.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:SalmonellaNIAID.jpg#/media/File:SalmonellaNIAID.jpg>.

<http://ehp.niehs.nih.gov/120-a190>

<http://thotinstitut.info/wp-content/uploads/2012/12/candida-albicans.jpg>

<http://www.cbc.ca/news/health/understanding-e-coli-symptoms-spread-prevention-1.786624>

[://www.helmholtz.de/fileadmin/user\\_upload/01\\_forschung/Aktuelle\\_Einblicke/03\\_Gesundheit/Listeria\\_Monocytogenes\\_HZI\\_MRhode\\_300x200.jpg](http://www.helmholtz.de/fileadmin/user_upload/01_forschung/Aktuelle_Einblicke/03_Gesundheit/Listeria_Monocytogenes_HZI_MRhode_300x200.jpg)

- Jayatilake, G. S., Jayasuriya, H., Lee, E. S., Koonchanok, N. M., Geahlen, R. L., Ashendel, C. L., y Chang, C. J. (1993). Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum*. *Journal of natural products*, 56:1805-1810.
- Krochmal, A., y Paur, S. 1951. Canaigre—A desert source of tannin. *Economic Botany*, 5:367-377.
- Kurenbach, B., Marjoshi, D., Amábile-Cuevas, C. F., Ferguson, G. C., Godsoe, W., Gibson, P., y Heinemann, J. A. 2015. Sublethal Exposure to Commercial Formulations of the Herbicides Dicamba, 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid, and Glyphosate Cause Changes in Antibiotic Susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *mBio*, 6: e00009-15.
- Link, S., y El-Sayed, M. A. 2003. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annual review of physical chemistry*, 54:331-366.
- Liu, C., Yang, X., Yuan, H., Zhou, Z., y Xiao, D. 2007. Preparation of Silver Nanoparticle and Its Application to the Determination of ct-DNA. *Sensors*, 7(5), 708-718.
- Llop, A., Valdés-Dapena, M. M., & Zuazo, J. L. 2001. Microbiología y parasitología médicas. *La Habana: Ciencias Médicas*, 141-150.
- Lu, X., Rycenga, M., Skrabalak, S. E., Wiley, B., y Xia, Y. 2009. Chemical synthesis of novel plasmonic nanoparticles. *Annual review of physical chemistry*, 60:167-192.
- Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Yaminsky, S. M. I., Taliany, M. E., y Kalinina, N. O. 2014. “Green” Nanotechnologies: Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Acta naturae*, 6:35.
- Medina-Ramirez, I., Bashir, S., Luo, Z., y Liu, J. L. 2009. Green synthesis and characterization of polymer-stabilized silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73:185-191.
- Moore, R. J., Jackson, K. G., y Minihane, A. M. 2009. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *British journal of nutrition*, 102:1790-1802.



- Petrov, E. P., Bläul, C., y Schwille, P. (2009). Memory in blinking dynamics of silver nanoparticles. In *Physics, Chemistry and Application of Nanostructures: Proceedings of the International Conference, Nanomeeting--2009: Reviews and Short Notes: Minsk, Belarus, 26-29 May 2009* (p. 172). World Scientific Publishing Company Incorporated.
- Pommerville, J. (2012). *Alcamo's Fundamentals of Microbiology: Body Systems*. Jones y Bartlett Publishers.
- Rai, M., Yadav, A., y Gade, A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27 : 76-83.
- Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Guerrero, J. A., Martínez, S., Pereda-Miranda, R., Mata, R., ... y Timmermann, B. N. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 57:1117-1126.
- Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C., y Maldonado, A. 2013. Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). *Nanoscale research letters*, 8:1-9.
- Romero-Pérez, A. I., Ibern-Gómez, M., Lamuela-Raventós, R. M., y de la Torre-Boronat, M. C. (1999). Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:1533-1536.
- Rycenga, M., Cogley, C. M., Zeng, J., Li, W., Moran, C. H., Zhang, Q., ... y Xia, Y. 2011. Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chemical reviews*, 111:3669-3712.
- Sathishkumar, M., Sneha, K., Won, S. W., Cho, C. W., Kim, S., y Yun, Y. S. 2009. Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73:332-338.

- Shah, M. y TA. Tokeer. 2010. Principles of Nanoscience and Nanotechnology. New Delhi: Naroosa Publishing House.
- Song, J. Y., y Kim, B. S. 2009. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32:79-84.
- Spencer, P., Sivakumaran, S., Fraser, K., Foo, L. Y., Lane, G. A., Edwards, P. J., y Meagher, L. P. 2007. Isolation and characterisation of procyanidins from *Rumex obtusifolius*. *Phytochemical analysis*, 18:193-203.
- Sun, X., Peng, B., y Yan, W. 2008. Measurement and correlation of solubility of trans-resveratrol in 11 solvents at T=(278.2, 288.2, 298.2, 308.2, and 318.2) K. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 40:735-738.
- Th.E. Weirich, M. Winterer, S. Seifried, H. Hahn, H. Fuess. Rietveld. 2000. analysis of electron powder diffraction data from nanocrystalline anatase, TiO<sub>2</sub>. *Ultramicroscopy*, 81:263-270.
- Trela, B. C. y Waterhouse, A. L. 1996. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:1253-1257.
- Vadlapudi, V., Kaladhar, D. S. V. G. K., Behara, M., Sujatha, B., & Naidu, G. K. 2014. Synthesis of Green Metallic Nanoparticles (NPs) and Applications. *Oriental Journal of Chemistry*, 29:1589-1595.
- VanderJagt, T. J., Ghattas, R., VanderJagt, D. J., Crossey, M., & Glew, R. H. 2002. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sciences*, 70:1035-1040.
- Voelcker, R. F. G. Raíz del Indica. *Am. Jour. Pharmacy* 58: 115. 1886.
- Wang, C. C., Luconi, M. O., Masi, A. N., & Fernández, L. P. 2009. Derivatized silver nanoparticles as sensor for ultra-trace nitrate determination based on light scattering phenomenon. *Talanta*, 77:1238-1243.

- Wiley, B. J., Im, S. H., Li, Z. Y., McLellan, J., Siekkinen, A., & Xia, Y. (2006). Maneuvering the surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110:15666-15675.
- Williams D B, Carter CB. Chapter 9: The Instrument. *Transmission Electron Microscopy*. 2nd ed. 2009, Springer-Science. 760p.
- Wu, H., Huang, X., Gao, M., Liao, X., y Shi, B. 2011. Polyphenol-grafted collagen fiber as reductant and stabilizer for one-step synthesis of size-controlled gold nanoparticles and their catalytic application to 4-nitrophenol reduction. *Green Chemistry*, 13:651-658.
- Yamanaka, M., Hara, K., & Kudo, J. 2005. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Applied and environmental microbiology*, 71:7589-7593.