

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



“Síntesis de Nano partículas de Plata (AgNPs), mediada por metabolitos secundarios presentes en el fermento Moringa oleífera. Estudio de actividad antimicrobiana”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

ERIC CRISTINA ARRIETA PEREZ

DIRECTOR

DR. BENJAMÍN VALDEZ SALAS

CO-DIRECTORA

DRA. MÓNICA CARRILLO BELTRÁN

Mexicali, B.C.

Julio, 2017

DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABLAS.....	X
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
CAPÍTULO 1	13
INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES	14
1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS NANOMATERIALES	15
1.2.1. NANOCOMPUESTOS.....	16
1.2.2. NANOTUBOS	16
1.2.3. NANOPARTÍCULAS	16
1.3. NANOPARTÍCULAS DE PLATA	17
1.3.1. RELEVANCIA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO BACTERICIDAS.....	18
1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
1.4.1. OBJETIVO GENERAL	19
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
1.5 JUSTIFICACIÓN	20
CAPÍTULO 2	23
MÉTODO DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA: REDUCCIÓN QUÍMICA	23
2.1. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	23
2.1.1. SPRAY PIROLISIS	24
2.1.2. DEPOSICIÓN QUÍMICA DE VAPOR (CVD).....	25
2.1.3. MOLIENDA DE PARTÍCULAS	25
2.1.4. MÉTODO SOL-GEL.....	25
2.2. REDUCCIÓN QUÍMICA.....	26
2.2.1. QUÍMICA VERDE.....	27
2.2.2. SOLVENTES NATURALES	28

2.2.3. MORINGA OLEÍFERA	28
2.2.3.1 Hoja de Moringa oleífera.....	30
2.2.3.2 Tallo y raíz de Moringa oleífera.....	32
2.2.4. MICROORGANISMOS ENDÓFITOS	32
2.2.4.1. Nigrospora sp.....	33
2.3. METABOLISMO Y METABOLITOS.	34
2.3.1. METABOLITOS PRIMARIOS	35
2.3.2. METABOLITOS SECUNDARIOS	36
 CAPÍTULO 3	 ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
 TÉCNICAS FÍSICOQUÍMICAS DE CARACTERIZACIÓN	 37
 3.1 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA.....	 38
3.1.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN DE LUZ ULTRAVIOLETA Y VISIBLE (UV-VISIBLE)	39
3.1.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)	39
3.1.3. ESPECTROSCOPIA POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS-X (EDX).....	40
3.1.4. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS).....	41
3.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	41
3.2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) ACOPLADA CON EDS.....	42
3.3 MEDICIÓN DEL POTENCIAL ZETA Y DLS	44
 CAPÍTULO 4	 46
 MICROORGANISMOS Y CULTIVOS EMPLEADOS	 46
 4.1. MICROORGANISMOS PATÓGENOS.....	 46
4.2 MEDIOS DE CULTIVO	46
4.2.1. ESCHERICHIA COLI.....	48
4.2.2. ENTEROBACTER CLOACAE	48
4.2.3. STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS	49
4.2.4. CANDIDA ALBICANS	50
4.3 MÉTODO DE DIFUSIÓN POR DISCO	52
 CAPÍTULO 5	 55
 METODOLOGÍA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA.....	 55
 5.1 MATERIALES Y EQUIPOS EMPLEADOS	 56
5.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	56
5.2.1 LAVADO DE LA MUESTRA.....	57

5.2.2. PREPARACIÓN DEL FERMENTO	58
5.4. CONDICIONES PARA CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA	60
5.4.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS.	60
5.4.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADAS DE FOURIER (FTIR)	60
5.4.3. ESPECTROSCOPIA POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS-X (EDX).....	61
5.4.4. .DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)	62
5.5. CONDICIONES PARA CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	62
5.5.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	62
5.6. MEDICIÓN ANTIBACTERIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS	63
 CAPITULO 6	66
 ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	66
 6.1 NANOPARTICULAS OBTENIDAS	66
6.2. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	66
6.2.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS.	66
6.2.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (FTIR)	68
6.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	69
6.3.1. ESPECTROSCOPIA POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS-X (EDS) Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	70
6.4 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)	73
6.4.1. POTENCIAL ZETA	74
6.5 MECANISMO PROPUESTO INVOLUCRADO EN LA SÍNTESIS DE AGNPs	74
6.6. MEDICIÓN ANTIBACTERIAL Y ANTIFUNGICA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MICROORGANISMOS PATÓGENOS	76
	78
 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	78
 ANEXOS	80
 PRODUCTOS OBTENIDOS DURANTE LA FORMACION	84
 REFERENCIAS	88

DEDICATORIA

- ❖ A Dios por ser mi guiador en todo momento en quien deposito mi absoluta confianza y renueva su gracia para conmigo cada mañana.

- ❖ A mis padres, Neris María y Julián Alberto por ser mi aliciente y brindarme el empuje, denuedo y las ganas de no dejarme vencer; por ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Por ello les dedico estas páginas con mi corazón.

- ❖ A mis 7 hermanos y sobrinos que tanto quiero en especial a Mayra y Darlis por su apoyo incondicional, motivación e infinito amor demostrado en cada una de las etapas de mi vida.

- ❖ A ti, Francisco
Por ser el hombre que ha estado allí hasta hoy, porque no has escatimado nada para mí, antes me has demostrado tu amor y capacidad de sacrificio. Espero en Dios seguir junto a ti y aportar valor a tu vida en este viaje que se llama vida. Te amo

- ❖ A mí persona.
Porque sencillamente creo que no se nos otorga la facultad de soñar sin dárse nos la posibilidad de convertir esos sueños en realidad. Un peldaño más alcanzado derribando obstáculos, internos muchos de ellos y convenciéndome a mí misma que lo que se obtiene con sacrificio, dedicación es lo que más se valora.

“La gota no perfora la roca por su fuerza; si no por su constancia”.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mi Director, el Dr. Benjamín Valdez por la confianza, apoyo y aceptación para la realización de este proyecto, el aporte de conocimientos que forjaron mi crecimiento en profesional. De usted me llevo la disciplina y la exigencia a uno mismo que sin lugar a dudas conducen a la excelencia y el mejoramiento continuo. A mi Co-directora la Dra. Mónica Carrillo por su apoyo incondicional en el proceso. He sido muy afortunada al tenerlos como directores.

- ❖ Al Dr. Tito Herrera por su calidad humana y consejos brindados desde mí llegada a México.

- ❖ Agradezco especialmente a, Dra. Gisela Montero, Dr. Rogelio Ramos, Dr. Miguel Schorr, Dr. Nicola Radnev, Dra. Margarita Stilianova, Dr. Roumen Zlatev, Dr. Mario Curiel Dr. José María Bastidas quienes fueron soporte importante durante mi formación.

- ❖ Mis Agradecimientos a Marissa, Kenia Rodríguez, Norma, y María de la Cruz por su asistencia administrativa y académica, y a todo el personal en general del Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California (II-UABC) y mi alma mater Universidad de Cartagena-Colombia.

- ❖ Al Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California por ser el medio para materializar este proyecto en mi vida, mediante la oportunidad brindada para estudiar en el programa de posgrado de calidad: Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MyDCI), dentro de la modalidad Maestría.

- ❖ A todas las personas que trabajan en el laboratorio de Materiales y Corrosión, Biopelículas, Semiconductores, Microelectrónica y Nanotecnología (LSMN) y

Biocombustibles del II-UABC; en especial mi amigo, Ricardo Salinas, Dr David Mateos Diana Albañil, Abigail Moreno y Marcos Flores por los gratos momentos compartidos.

- ❖ A los chicos impulso en especial a Gerardo, Aida, Rosi, Yared, Shava, y Heber amigos de gran valor que hicieron de mi paso por tierras aztecas algo memorable, a Maria Francis por estar allí y ser mi amiga y roomie por dos años aprecio su compañía, a mis queridos compatriotas Ricardo y Mary Triny por su jovial apoyo y disposición al llegar aquí; a las Familias Quintero, Calderón, Medina en quienes encontré familiaridad y adopción. Agradecida estaré siempre por todas las personas que se me ha dado la oportunidad de conocer a todas ellas mil y mil gracias, siempre estarán en mi corazón.

- ❖ Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por financiar este proyecto de investigación.

LISTA DE FIGURAS

<i>Fig. 1- 1: Áreas de aplicación de la nanotecnología.</i>	15
<i>Fig. 1- 2: Nanotubo de carbono de pared múltiple [1].</i>	16
<i>Fig. .1- 3: Nanopartículas de ZnO producidas por método sol-gel.</i>	17
<i>Fig. 2- 1: Rutas de fabricación de nanopartículas [2].</i>	24
<i>Fig. 2- 2: Pirólisis de pulverización ultrasónica.</i>	24
<i>Fig. 2- 3: Sistema CVD</i>	25
<i>Fig. 2- 4: Esquema del proceso Sol-Gel.</i>	26
<i>Fig. 2- 5: Reacción de síntesis de nanopartículas por reducción química [3].</i>	27
<i>Fig. 2- 6: Áreas de impacto de la química verde.</i>	28
<i>Fig. 2- 7: (a) Aspecto físico de la planta. (b) Distribución geográfica de cultivo de Moringa oleífera [4].</i>	30
<i>Fig. 2- 8: Aspecto físico del tallo y raíz de la Moringa oleífera</i>	32
<i>Fig. 2- 9: Curva del comportamiento del metabolito primario y secundario [5].</i>	37
<i>Fig. 2-10: Espectro electromagnético</i>	38
<i>Fig. 2-11: Fundamento de espectroscopia UV-Vis.</i>	39
<i>Fig. 2-12: Etapas de nucleación y crecimiento de AgNPs</i>	36
<i>Fig. 2-13: Fundamentos de un Microscopio Electrónico de Barrido.</i>	43
<i>Fig. 2-14: Partes que componen un microscopio electrónico de barrido.</i>	44
<i>Fig. 3- 1: Medios de cultivos utilizados en la industria.</i>	47
<i>Fig. 3- 2: Patógenos de interés en el presente estudio.</i>	52
<i>Fig. 3- 3: Fundamento de la difusión por disco.</i>	53
<i>Fig. 4- 1: Diagrama de metodología diseñada en el presente estudio.</i>	55
<i>Fig. 4- 2: Muestras de Moringa oleífera una vez son maceradas y secadas se almacenan por separado y se rotulan.</i>	58

<i>Fig. 4- 3: Esquema de preparación del extracto de hoja de Moringa oleífera por infusión...</i>	59
<i>Fig. 4- 4: Muestras en ultrasonido.....</i>	60
<i>Fig. 4- 5: Equipo de UV-Vis Lambda 25 spectrophotometer.....</i>	60
<i>Fig. 4- 6: Equipo de espectroscopia infrarroja (FTIR) Perkin Elmer Spectrum One.</i>	61
<i>Fig. 4- 7: Equipo Shimadzu EDX-7000/8000.....</i>	62
<i>Fig. 4- 8: Equipo Nanotra Wave</i>	62
<i>Fig. 4- 9: Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6010LA.</i>	63
<i>Fig. 4- 10: Insumos y equipos para análisis microbiológico.</i>	64
<i>Fig. 4- 11: Relación y control variables de entrada y de salida.</i>	64
<i>Fig. 5- 1: Variación de color en las reacciones de los tubos A, B, C, en función de las relaciones que se muestran en la tabla.5-2.</i>	66
<i>Fig. 5- 2: Espectro UV-vis de AgNPs obtenidas.</i>	68
<i>Fig. 5- 3: Espectro FTIR de AgNPs sintetizada.</i>	69
<i>Fig. 5-4: Perfiles de absorbancia UV-Vis de la síntesis de AgNPs en función del tiempo</i>	
<i>Fig. 5- 5a: distribuciones de tamaño en función de la relación fermento:AgNO₃.....</i>	71
<i>Fig. 5-5b: Imágenes SEM de AgNPs sintetizadas.....</i>	64
<i>Fig. 5- 6: El espectro EDS confirmó la presencia intensa de plata en las muestras.</i>	73
<i>5ig. 5- 7: Mecanismo propuesto de síntesis de AgNPs. a) Capping y estabilización de las AgNPs. b) Reducción de Ag⁺ a Ag⁰ usando la Griseofulvina. Abreviaturas: AgNPs, nanopartículas de plata.</i>	76
<i>Fig. 5- 8: Actividad antibacteriana de AgNPs frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.</i>	77
<i>Fig. 5- 8: Estudio microbiológico de endófitas en la Moringa Oleífera.....</i>	78
<i>Fig. 5- 9: Resuspension de AgNPs..</i>	78

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla. 2- 1: Compuestos presentes en la hoja de moringa oleífera [6].....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla. 2- 2: Metabolitos de Nigrospora sp aislados de Moringa oleífera [7].....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla. 2- 3: Compuestos de partida en la formación de metabolitos [8].</i>	<i>36</i>
<i>Tabla. 2- 4: Distribución de principales compuestos fenólicos en el reino vegetal [8].</i>	<i>37</i>
<i>Tabla. 4- 1: Materiales, equipos y reactivos utilizados.</i>	<i>56</i>
<i>Tabla. 4- 2: Relación de fermento/ AgNO₃.</i>	<i>59</i>
<i>Tabla. 5- 1: Análisis del potencial zeta de los AgNPs sintetizados.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabla. 5- 2: Antibiograma de las AgNPs frente microorganismos patógenos.....</i>	<i>77</i>

RESUMEN

En el presente estudio se logró sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata (AgNPs) con propiedades antibacterianas y antifúngicas, por un método de reducción química empleando como precursores de síntesis, metabolitos secundarios procedentes del endófito *Nigrospora sp* presente en el fermento de *Moringa oleífera*. Para la obtención de biocompositos, se estimuló en ausencia de luz el crecimiento de metabolitos secundarios en el extracto de hoja de *Moringa oleífera* y posteriormente se mezcló con una solución que contenía los iones Ag^+ . La capacidad reductora y estabilizante de la *griseofulvina* favorece la síntesis de nanopartículas de manera viable y sustentable. Los iones Ag^+ fueron reducidos a Ag^0 . La síntesis se llevó a cabo bajo condiciones ambientales normales de temperatura y presión, evaluando su comportamiento en cada intervalo de tiempo. La reducción se realizó sin la intervención de compuestos tóxicos que comprometen el medio ambiente. La formación y estabilidad de nanopartículas se monitoreó por espectroscopia UV-Vis señalando picos de absorción característicos de AgNPs en el rango de 436-440 nm; el análisis FTIR confirmó la presencia de grupos funcionales responsables de la reducción química; la medición del potencial zeta indicó la alta dispersión de AgNPs mostrando un potencial de -200 mV. La morfología, tamaño y composición fueron evaluados por medio de SEM-EDS mostrando tamaños de 3 a 70 nm y morfología esférica; la dispersión de tamaños señalada por el Nanotracer Wave fue congruente con los resultados del SEM. La actividad antimicrobiana de las nanopartículas obtenidas se evaluó frente a bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*) y gramnegativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) observándose sensibilidad de las AgNPs sintetizadas por un periodo de 48 horas. Es así como puede considerarse el precursor empleado en el presente estudio candidato para la síntesis de AgNPs con propiedades antibacterianas cuyo estudio no tiene precedentes.

ABSTRACT

Biological extracts have recently offered a great potential for rapid biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) with antibacterial activity. AgNPs were synthesized by reduction of Ag^+ ions using secondary metabolites from ferments *Moringa Oleifera*'s leaves as the reducing agent and silver nitrate (AgNO_3) 1mM as salt precursor. The synthesis of nanoparticles was monitored through the analysis by UV-Vis spectroscopy absorption at 436–440 nm indicating the presence of AgNPs in the colloidal aqueous solutions. FTIR spectra were performed to identify the compounds responsible for the bio reduction of the silver ions. The morphology and sizes of AgNPs were characterized by scanning electron microscope (SEM), energy dispersive analysis of X-ray spectroscopy (EDS) analysis, dynamic light scattering (DLS), and colloid stability by zeta potential measurements. The NPs observed were spherical in shape with sizes range from 3 to 70 nm. Antibacterial activity was confirmed during the evaluation against *Escherichia coli*, *Klebsiella cloacae*, *Staphylococcus epidermis*, and *Candida albicans*. The green synthesis of these AgNPs may be used as a potential method by secondary metabolites route.

CAPITULO 1

El presente capítulo nos da un bosquejo sobre la nanotecnología y las áreas inimaginables de exploración de la misma; su desarrollo hasta nuestros días, los desafíos y aplicaciones con miras al sustento de la vida del ser humano, como resultado del desarrollo de conocimientos interdisciplinarios como la Química, la Física, la Medicina y la Ciencia de los materiales.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Nanotecnología y Nanomateriales

La nanotecnología es la creación de materiales, dispositivos y sistemas útiles por medio de la manipulación de la materia a una escala nanoscópica. Los primeros intentos de esta tecnología fueron realizados en 1959 por Richard P. A esta escala, las propiedades físicas y químicas de los sistemas se diferencian de los sistemas macroscópicos con propiedades únicas. Un nanómetro es una billonésima parte de un metro[9]. La nanotecnología se aplica a casi toda área imaginable (Fig. 1-1), tal como la electrónica, magnética, óptica, tecnología informática, creación de materiales y biomedicina, abarcando la producción y aplicación de materiales en el tratamiento de gliomas, al proteger el agente terapéutico y permitir su liberación controlada. La terapia conjunta de células madres junto con las nanotecnologías podría considerarse una herramienta prometedora para entregar, de manera eficiente, las drogas a los tumores cerebrales

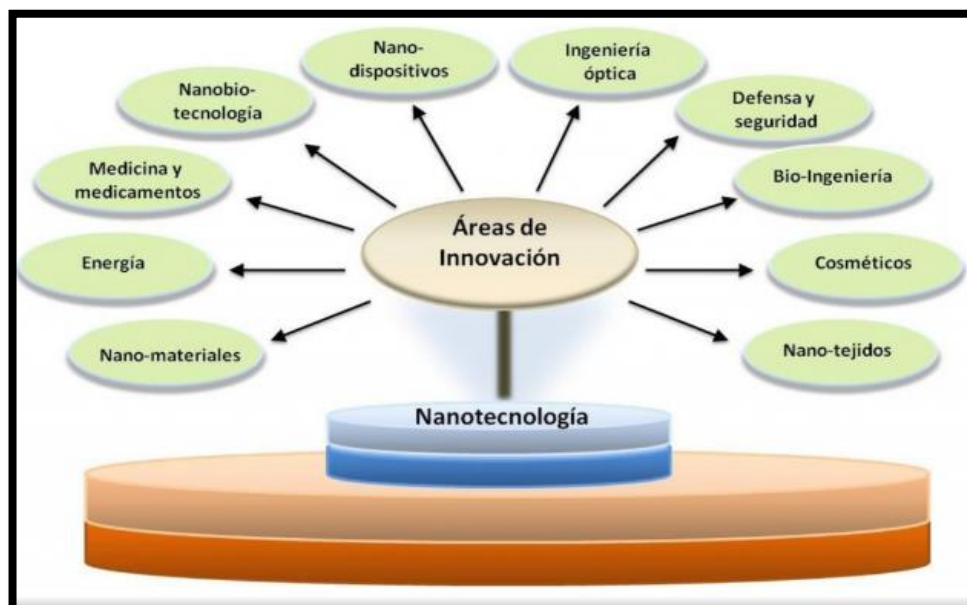


Figura 1- 1: Áreas de aplicación de la nanotecnología.

Se denomina nanomateriales a aquellos materiales que miden entre 1 y 100 nm en al menos una de sus dimensiones incluyendo nanotubos de carbono, nanocristales, puntos cuánticos, nanofibras, filtros nanoporosos, nanohilos, nanopartículas de óxidos metálicos, nanocapilares, dispersión de nanopartículas, películas de nanopines, nanocompuestos de polímero, y otros [10]. Los nanomateriales son producidos mediante diferentes métodos y de formas diversas (esferas, tubos, alambres, entre otras). Las características y propiedades de los materiales están en función de cómo se comportan los electrones dentro del mismo y cómo están ordenados dentro de la materia. En los nanomateriales se suman característicos particulares como resultado de las dimensiones del propio material teniendo en cuenta la elevada proporción de átomos superficiales. Es así como resultan novedosas propiedades que son aprovechadas en diferentes aplicaciones nanotecnológicas [11]. Debido a su pequeño tamaño, los dispositivos a escala nanométrica pueden interactuar fácilmente con biomoléculas localizadas tanto en la superficie como en el interior de las células. Al obtener acceso a tantas áreas del cuerpo, tienen la posibilidad de detectar enfermedades y de administrar tratamiento en formas que fueron inimaginables en el pasado [12]. Por ello también, pueden llegar con mayor rapidez y efectividad a un blanco elegido luego de ser administrados y la relación área/volumen aumenta conforme disminuye el tamaño del material [13]. Los nanomateriales se combinan con moléculas de interés biológico mediante enlaces covalentes, interacciones electrostáticas o de afinidad, produciendo materiales potenciales a ser empleados en el desarrollo de liberación de fármacos, y sistemas de diagnóstico [14].

1.2. Clasificación de los nanomateriales

Muchas de las propiedades de los materiales depende de cómo se comporten los electrones que se mueven o de como estén ordenados los átomos en la materia [15].

1.2.1. Nanocompuestos

Son materiales formados por dos o más fases, donde una de estas fases tiene una de sus tres dimensiones en escala nanométrica. Los polímeros son los más utilizados para este tipo de materiales[16].

1.2.2. Nanotubos

Estos nanomateriales están compuestos en su mayoría a base de carbono y silicio, son estructuras tubulares con un diámetro nanométrico como se muestra en la Fig. 1-2. Se encuentran de una capa o en su defecto de multicapas, algunos están cerrados por media esfera de fullereno, que es una forma estable del carbono, de los cuales se pueden obtener materiales más ligeros y resistentes, teniendo diversas aplicaciones[15].

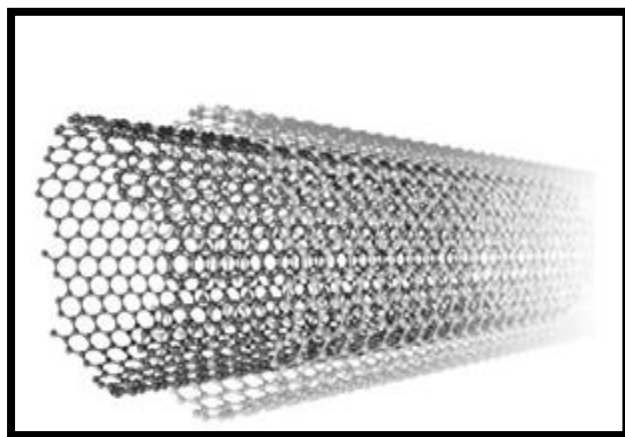


Figura 1- 2: Nanotubo de carbono de pared múltiple [1].

1.2.3. Nanopartículas

Son partículas con sus tres dimensiones a escala nanométrico. De acuerdo a su composición se pueden clasificar en carbonosas, metálicas, cerámicas y poliméricas. Dentro de la nanomedicina se encuentra gran cantidad de compuestos diferentes, incluyendo las nanopartículas transportadoras de fármacos, que pueden ser nanopartículas poliméricas, los liposomas o las micelas poliméricas. En la figura 1-3, se observa una imagen de nanopartículas poliméricas con tamaño de 200 nm.

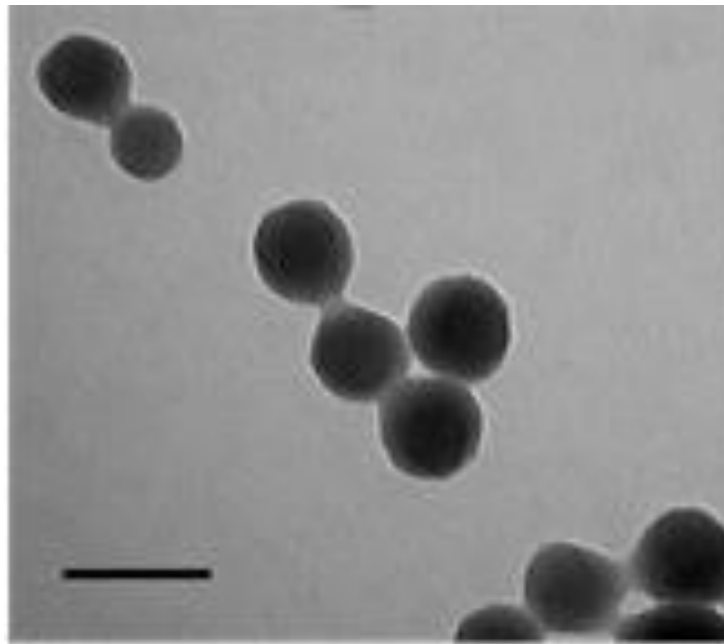


Figura 1- 3: Fotografía de nanopartículas poliméricas obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. Barra 200 nm

1.3. Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNPs) tienen gran interés debido a sus propiedades ópticas, eléctricas, catalíticas, bactericidas, entre otras [17]. Estas propiedades dependen del tamaño, la forma y la dispersión de las NPs que pueden ser controladas a partir del método de síntesis. Dentro de los parámetros que influyen en la morfología de las nanopartículas se encuentran la elección del agente reductor, las cantidades relativas y las concentraciones de reactivos, la temperatura y la duración de la reacción [12]. La plata tiene una larga historia en exitosas aplicaciones médicas como agente bactericida. Estudios recientes han mostrado que en su forma de nanopartículas son altamente efectivas como agentes antimicrobiales contra bacterias, hongos y virus [18]. La aplicación de nanopartículas de plata ha despertado mucho interés debido a que las nanopartículas pueden imitar o alterar procesos biológicos por lo que su uso en la medicina podría resolver problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los

medicamentos de uso tradicional debido a la baja probabilidad del desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos en comparación con los antibióticos convencionales; lo que ha conllevado al uso de AgNPs sobre distintos dispositivos de uso médico [19].

1.3.1. Relevancia de las Nanopartículas de plata como bactericidas

Las AgNPs presentan un marcado efecto microbicida frente a una variedad de microorganismos tales como virus, bacteria, hongos. Su eficacia bactericida está en función de la naturaleza del material, sus dimensiones nanométricas que permiten ser admitidas en el interior de las células de microorganismos con mayor facilidad permitiendo la interacción química. Existen otras nanopartículas (NPs) con propiedades bactericidas como es el caso del óxido de zinc, cobre u óxido de hierro. Este último a diferencia de los anteriores sólo presenta propiedades bactericidas en tamaño nanométrico [20]. La vía o el mecanismo de acción microbicida de las AgNPs es aún desconocida en su totalidad. La ruta de acción es diferente a los antibióticos tradicionales, lo que las convierte en una alternativa promisorias. Los estudios realizados como posibles rutas de acción de las AgNPs conllevan a mencionar perturbaciones en las funciones de la membrana celular, afectando la permeabilidad y función respiratoria de la misma. Es así como se logra el ingreso de las NPs a la célula, alterando funciones específicas en las proteínas y el ADN, al mismo tiempo que produce especies oxidativas [2],[21], [22]. El interés en las AgNPs con respecto a otras metálicas con propiedades bactericidas es mayor debido a que las sales de plata se han empleado con mucho precedente en cremas tópicas, y vendajes entre otros.

1.4. Planteamiento del problema

La biorreducción es una técnica emergente y con muchas ventajas para los procesos de la industria de nanomateriales. Es altamente eficiente, ahorra energía, y es coherente con el cuidado del medio ambiente al no utilizar compuestos tóxicos. Los esfuerzos tecnológicos y científicos han puesto su mirada en la obtención de nanopartículas metálicas empleando extractos vegetales con el fin de contribuir al desarrollo sustentable de la vida humana y su

entorno. Numerosos estudios han abarcado la síntesis de AgNPs con el fin de responder a la creciente demanda dada la utilidad y aplicación de AgNPs. De esta forma la reducción de AgNPs a partir de extractos biológicos es una importante oportunidad para el control de fenómenos como la actividad microbiana de algunas bacterias presentes en la naturaleza. Uno de los problemas puntuales para la obtención de AgNPs por un método de química verde es la elección del agente reductor. De este último dependen en gran medida las características asociadas a las nanopartículas obtenidas. La *Moringa Oleifera* es una propuesta viable como reductor de la sal precursora, debido a que presenta organismos endófitos como *Nigrospora sp* que son capaces de producir metabolitos secundarios como precursores de síntesis [7], [23]. Los metabolitos secundarios son empleados de forma exitosa en el desarrollo e implementación de fármacos [3]. Así, su capacidad reductora en presencia de metabolitos secundarios, como resultado de actividad catabólica y anabólica, potencializa la reducción de la sal AgNO_3 . Sin embargo, para proponer aplicaciones es indispensable estudiar y determinar las características físicas y químicas de las nanopartículas obtenidas por medio de dicho vegetal, como se propone en el presente estudio. Al aprovechar los metabolitos obtenidos de los fermentos de la *Moringa oleífera* como precursores de síntesis de AgNPs, los endófitas pueden llegar a competir con la bacteria que queremos inhibir; de ahí la necesidad de potenciar su efecto con nanopartículas de plata, dando como resultado una aplicación vertiginosa de las nanopartículas obtenidas que pueden ser consideradas en aras de biorremediación. Por otro lado el empleo del vegetal propuesto no incurre en debates de pertenecer a un alimento básico de la alimentación de la población.

1.4.1. Objetivo general

Sintetizar nanopartículas de plata, con propiedades antibacterianas utilizando un método de reducción química a partir de metabolitos secundarios presentes en el fermento de *Moringa oleífera*.

1.4.2. Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar nanopartículas de plata por una metodología de química verde, obteniendo un nanomaterial sin proliferación de contaminantes.
- ✓ Caracterizar las AgNPs por medio de técnicas analíticas como: Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis), Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR), Microscopía Electrónica de Barrido/ Espectroscopia de Dispersión de Rayos X (SEM/EDS), y Dispersión Dinámica de Luz (DLS), para determinar el tamaño y la estructura de las nanopartículas obtenidas, identificando longitud de onda, enlaces químicos, tamaño y estructura cristalina.
- ✓ Determinar el efecto de la sal precursora sobre las propiedades de las nanopartículas obtenidas.
- ✓ Identificar la influencia de los metabolitos secundarios dentro de la síntesis de AgNPs
- ✓ Evaluar la actividad antimicrobiana de las AgNPs en suspensión frente a las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella cloacae*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Candida albicans* siguiendo el procedimiento difusión por disco.

1.5 Justificación

En la actualidad las AgNPs desarrollan un papel importante en el área de la ciencia y la tecnología. Es así como su estudio ayuda a resolver numerosos inconvenientes y limitaciones del mundo macro [24]. Sus aplicaciones se han convertido en un escenario promisorio para resolver problemas de la vida humana y su entorno [9]. La *Moringa oleífera* se caracteriza por presentar compuestos bioactivos como flavonoides, polifenoles y microorganismos endófitos que pueden ser aprovechadas para potenciar la reducción [25,

26]. La *Moringa oleífera* tiene propiedades inherentes en cada una de las partes que la conforman. La mayoría han sido empleadas en la medicina tradicional [27].

Por lo anterior es de interés sintetizar AgNPs a partir del extracto de hojas de un árbol versátil en presencia sustancias que captan minerales indispensables para otros microorganismos lo que conlleva a que dichas sustancias (metabolitos secundarios) sean fuertemente competitivas y exhiban fuerte actividad frente a microorganismos patógenos.

Dada las condiciones del extracto (agente reductor) a emplear y las características del mismo, se espera que el presente estudio encierre las condiciones óptimas de síntesis de nanopartículas de plata con alto potencial antibacterial; frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus epidermis*, *Candida albicans*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella cloacae*). Lo que confirmaría que su estudio es de gran utilidad en el área de ciencias médicas.

CAPITULO 2

El capítulo a continuación describe las técnicas de síntesis y principios de caracterización de nanopartículas diferenciando entre aquellas que están clasificadas como Físicas y Químicas, así mismo profundizara en el método de reducción química como enfoque del presente trabajo y las ventajas de emplear compuestos derivados del metabolismo de las plantas como agentes reductores y estabilizadores de materiales a escala nanométrica.

CAPÍTULO 2

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA: REDUCCIÓN QUÍMICA

2.1. Métodos de obtención de nanopartículas de plata

Para la fabricación de nanopartículas se debe tener control de tamaños, morfología, propiedades químicas, cristalinidad y estructura. Los métodos de fabricación de los nanomateriales en general se dividen en dos categorías: "top-down" (de arriba hacia abajo) o "bottom-up" (de abajo hacia arriba) tal como se muestra en la Fig. 2-1 [28]. El método "top-down" se lleva a cabo a partir de materiales de grandes dimensiones que se reducen hasta alcanzar tamaños de pocos nanómetros empleando técnicas como la molienda o desgaste. En la rotura física es muy difícil el control de tamaños sumado a los costos de alta tecnología.

El método "bottom-up" consiste en la construcción de estructuras a partir de átomos o moléculas en fase gaseosa o en solución, a semejanza de lo que ocurre en la síntesis de proteínas, ADN o estructuras celulares en los seres vivos.

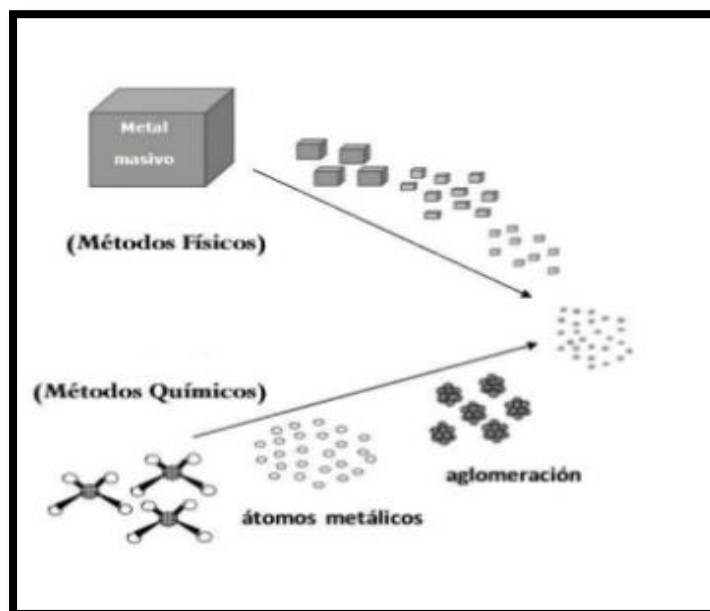


Figura 2- 1: Rutas de fabricación de nanopartículas [2].

Es esencial la estabilización de las nanopartículas en el medio dispersante para prevenir la aglomeración [29]. Esto puede ser logrado por estabilización electrostática o estérica. Diversos métodos han sido utilizados para la síntesis de nanopartículas como son: técnicas físicas, tecnologías en aerosol, litografía, ablación láser y campos ultrasónicos. Sin embargo, estas técnicas son generalmente costosas y utilizan equipos poco accesibles que requieren altos consumos de energía [12]. Los métodos químicos, se utiliza la reducción química, técnicas electroquímicas y fotoquímicas, siendo la primera la estrategia más empleada en el caso de AgNPs [28]. El método de reducción química empleando nitrato de plata como agente de partida, permite obtener dispersiones coloidales estables de plata amarilla, con tamaños, forma deseada y la aparición del color amarillo-marrón que indica la formación de AgNPs tanto en medio acuoso como orgánico [25, 30, 31].

A continuación se describen los principales métodos de obtención y en especial de la reducción química, ya que esta fue la que se utilizó en el presente estudio.

2.1.1. Spray pirolisis

La técnica de “Spray Pirolisis” está basada en la descomposición de pequeñas gotas submicrométricas de un aerosol, generados por dispositivos ultrasonidos para la obtención de partículas nanoestructuradas en un sólo paso (Fig.2-2). Las gotas de aerosol son convertidas en partículas nanoestructuradas a bajas, intermedias y altas temperaturas (200-1000 °C).

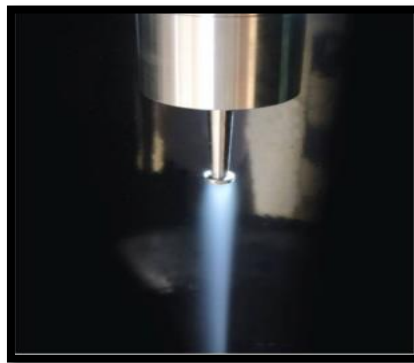


Figura. 2-2: Pirólisis de pulverización ultrasónica.

2.1.2. Deposición química de vapor (CVD)

Consiste en un sistema en el que ocurre la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), en o cerca de la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de nanopartículas [32]. La Fig. 2-3 señala un ejemplo de un esquema CVD.

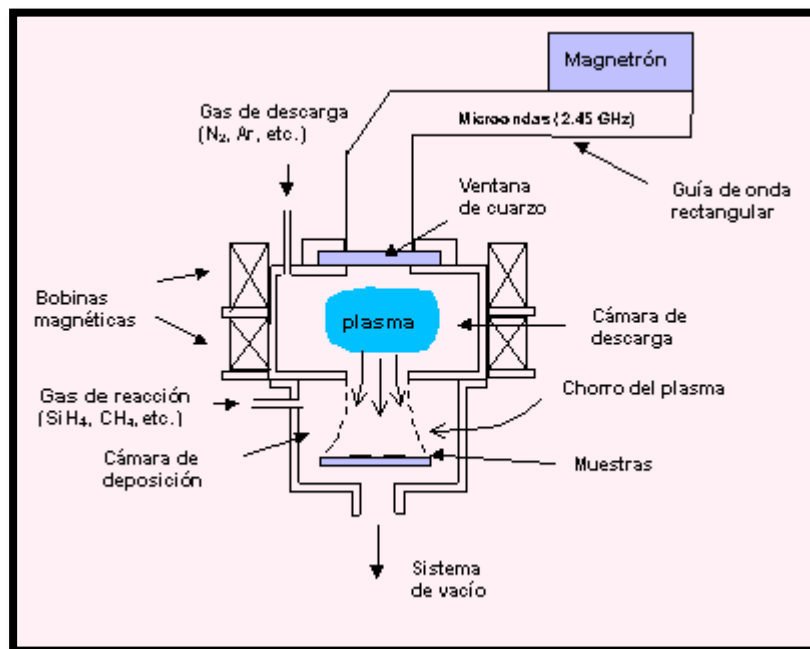


Figura. 2- 3: Sistema CVD

2.1.3. Molienda de partículas

Esta técnica se desarrolla por medio de molinos de alta eficiencia; las partículas resultantes son clasificadas por medios físicos, recuperándose las de tamaño nanométrico.

2.1.4. Método sol-gel

El método sol-gel es un proceso químico en fase húmeda. Este método se utiliza principalmente para la fabricación de nanomateriales (normalmente un óxido metálico). Se parte de una solución química o sol que actúa como precursor de una red integrada ya sea de partículas discretas o de una red de polímeros. Los precursores típicos del proceso sol-gel son los alcóxidos metálicos y los cloruros metálicos, que sufren varias reacciones de

hidrólisis y policondensación para formar una dispersión coloidal, que luego de una polimerización lenta forma un gel [33].

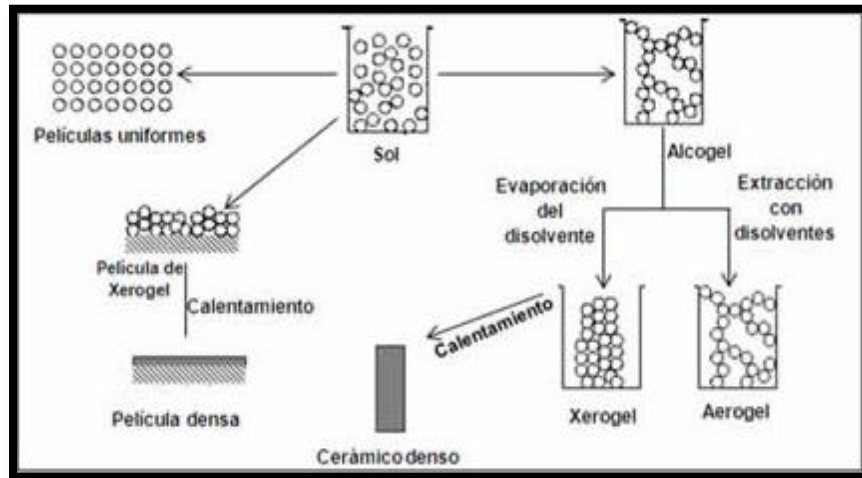


Figura. 2- 4: Esquema del proceso Sol-Gel

Un gel puede ser creado cuando la concentración de la especie dispersa aumenta. El solvente es atrapado en la red de partículas y así la red polimérica impide que el líquido se separe, mientras el líquido previene que el sólido colapse en una masa compacta. La deshidratación parcial de un gel produce un residuo sólido elástico que se conoce como xerogel como se muestra en la Fig. 2-4. Finalmente, este material es completamente deshidratado y eventualmente tratado térmicamente en flujo de gas para obtener el material nanoestructurado final. El método sol-gel ha sido usado en los últimos años para preparar una amplia variedad de materiales nanoestructurados. El método es atractivo porque involucra procesos a baja temperatura, la alta pureza y homogeneidad en el producto final [34].

2.2. Reducción química

La reducción química es un método eficiente de producción de nanopartículas [28]. Este método consiste en disolver una sal del precursor metálico, un reductor y un estabilizante en una fase continua o dispersante. Este último puede jugar el papel de reductor, de

estabilizante o ambos. Los extractos biológicos son empleados como reductores y estabilizantes[2]. En principio el tamaño promedio, la distribución de tamaños y la forma o morfología de las nanopartículas pueden ser controlados variando la concentración de los reactantes, del reductor y del estabilizante así como la naturaleza del medio dispersante. Por este método se pueden formar dispersiones estables por periodos de tiempo muy largos. En en la Fig. 2-5 se esquematiza una reacción de síntesis por un método de reducción química resultado del diseño propuesto para el presente estudio empleando nitrato de plata como sal precursora.

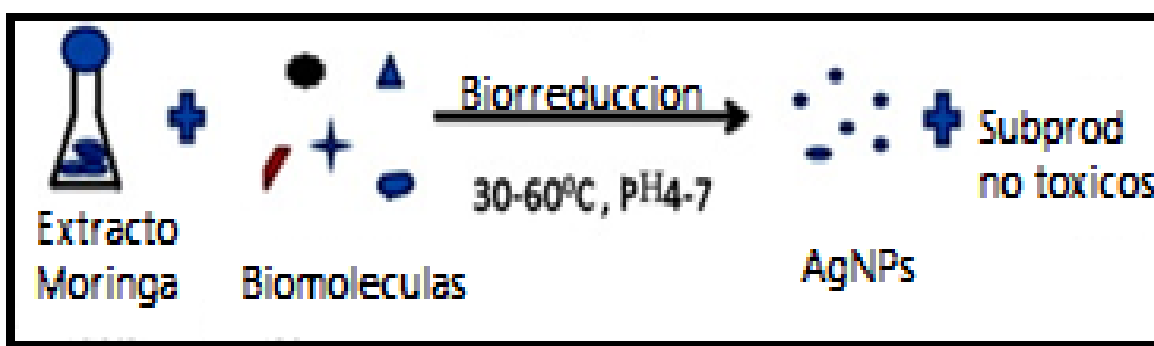


Figura. 2- 5: Reacción de síntesis de nanopartículas por reducción química [3].

2.2.1. Química verde

La química verde es una opción relativamente nueva de la química que se ha venido incluyendo en diferentes disciplinas (Fig. 2-6.), consistente en el diseño de productos químicos y procesos para reducir o eliminar el uso o la generación de sustancias peligrosas para el medio ambiente. Una de las áreas más activas es la utilización de los disolventes “verdes”. Se trata de una filosofía que consiste en el esfuerzo colectivo para reducir al mínimo, o de ser posible eliminar por completo la contaminación desde su inicio: mediante el uso de procesos “limpios”, evitando al máximo el desperdicio o uso indiscriminado de materias primas no renovables, así como el empleo de materiales peligrosos o contaminantes en la elaboración de productos químicos, que no atenten contra la salud o el ambiente. Los medios que utiliza la química verde se centran en la disminución o la eliminación del uso de productos químicos tóxicos y el reciclaje de los desechos producidos

por el avance tecnológico, de una manera creativa de tal forma que se consiga un mínimo impacto a los seres humanos y al medio ambiente, sin sacrificar el avance científico y tecnológico [35]



Figura. 2- 6: Áreas de impacto de la química verde.

2.2.2. Solventes naturales

Las plantas han constituido la base de los sistemas de medicina tradicional para mantener la salud e incrementar la calidad de vida del hombre. Surgen como una opción para sustituir los disolventes derivados del petróleo por otros procedentes de la biomasa, que se obtienen por procesos de fermentación, enzimáticos o de esterificación, con las ventajas de ser biodegradables y contener oxígeno en su estructura en casi todos los casos [29]. El empleo de extractos de plantas como agentes reductores es una vía rápida para la preparación de nanopartículas. A pesar de ser una técnica totalmente ecológica, presenta todavía desventajas importantes frente a otros métodos de síntesis, por los bajos rendimientos de producción [36].

2.2.3. Moringa oleífera

El árbol de la moringa (*Moringa oleifera* Lam.), de la familia Moringaceae, es la más importante de las trece especies conocidas del género moringa (Fig. 2-7a). Se conoce también como árbol de los espárragos, árbol de rábano (horseradish tree) o árbol de las perlas y se considera originario de la India [37]. Todas las partes de la planta son consumidas por ser un alimento completo, generalmente no tienen mal sabor y se consumen frescas. Los frutos o vainas verdes o inmaduros, se cuecen y saben a habichuelas; las semillas son consumidas tostadas y son muy nutritivas y las hojas verdes son preparadas como potajes y ensaladas. Además tienen un alto valor comercial en la India, donde son exportadas enlatadas. También se comercializan otros derivados como el aceite, extractos de sus hojas como polvos e infusiones [38]. Los alimentos servidos en infusión son los más utilizados debido a la cultura que se tiene en América latina como las sopas, atoles o refrescos [26]. En la actualidad esta planta que crece muy bien en zonas áridas, tropicales, subtropicales, semiáridas o propensas a la sequía como se describe en la figura 2-7b [39].



(b)

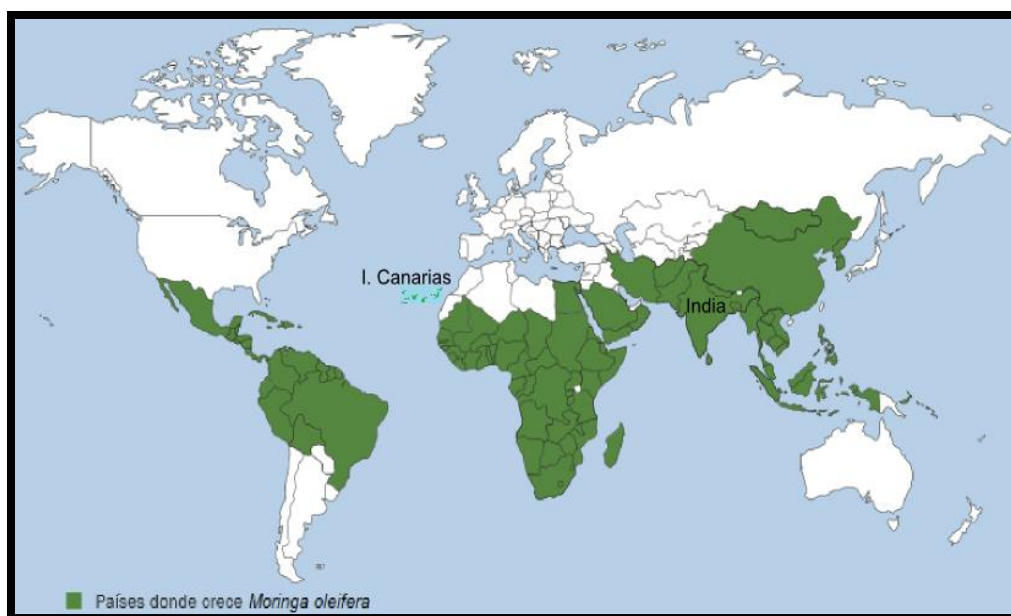


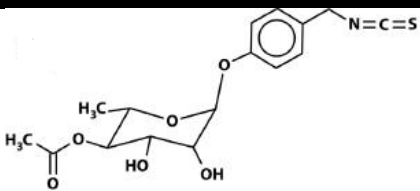
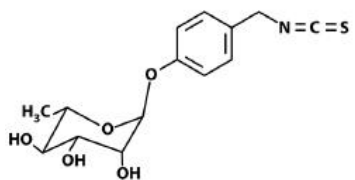
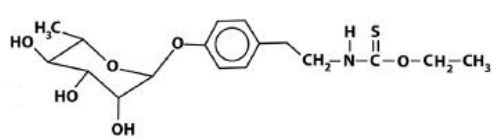
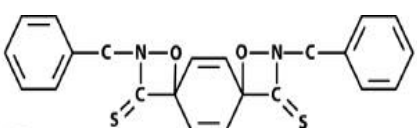
Figura. 2- 7: (a) Aspecto físico de la planta. (b) Distribución geográfica de cultivo de *Moringa oleífera* [4].

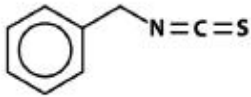
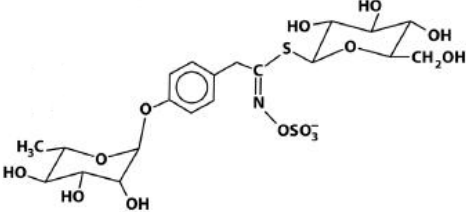
2.2.3.1 Hoja de *Moringa oleífera*

Las hojas de la *Moringa oleífera* son las partes más aprovechadas por su alto valor proteico. Las hojas muestran un valor considerable de vitamina A en forma de β -carotenos, minerales (hierro, potasio y calcio) y vitamina C. Además las hojas secas y molidas presentan hasta un 30% de proteínas en base seca, razón por la que se conoce que las hojas presentan mayores fuentes de nutrientes que las vainas. Además son ricas en componentes antioxidantes, entre los que sobresalen los isotiocianatos que figuran como uno de los principales portadores de propiedades anti cancerígenas y antibióticas. Los contenidos de componentes anti nutricionales en sus hojas como taninos, lecitinas e inhibidores de proteasas son insignificantes, por esta razón son comestibles en su totalidad, al mismo tiempo contienen un perfil de aminoácidos esenciales balanceados y son una fuente importante de vitaminas A, C y antioxidantes [6, 40, 41]. Otra de las propiedades características de la *Moringa oleífera* es su gran capacidad antioxidante, derivada de metabolitos secundarios como los ácidos fenólicos y flavonoides [25, 42]. Estas

propiedades derivan de su composición y estructura. Algunos de los compuestos comúnmente encontrados en la hoja de la moringa oleífera se muestran en la tabla 2-1. Se han realizado estudios comparativos para establecer la riqueza de compuestos fenólicos en las hojas de la planta revelando una gran variedad de fitoquímicos como los taninos, saponinas, esteroides, terpenoides, fenoles, alcaloides y flavonoides como la quercetina, isoquercitina, kaemfericitina, destacando su contenido en derivados de kaempferol, ácido cafeoilquínico y ácido feruloilquínico (Tabla 2-1). La capacidad antioxidante de las hojas fue correlacionada la composición de fenólicos individuales con el fin de identificar compuestos que eran responsables de este poder beneficioso [41]. Es así como dichos compuestos pueden ser precursores de metabolitos secundarios potencialmente activos e para la síntesis de nanopartículas de plata empleando un método de química verde [27].

Tabla. 2- 1. Compuestos presentes en la hoja de *Moringa oleífera* [6].

<i>Estructura</i>	<i>Nombre</i>
	4-(4'-O-acetil-α-L-ramnopiranosiloxy)benzil isotiocianato
	4-(β-L-ramnopiranosiloxy)benzil isotiocianato
	Niacimicina
	Pterigospermina

	benzil isotiocianato
	4-(α -L- ramnopiranosiloxi) benzil glucosinolato

2.2.3.2 Tallo y raíz de *Moringa oleífera*.

Actúa como un estimulante cardíaco, la corteza del tallo y la raíz es estimulante, diurética antiescorbútica, agente anti-inflamatorio y anti-úlceras entre sus usos medicinales. En su estructura posee taninos y alcaloides como la morfina, moriginine, y minerales como el calcio magnesio y sodio [43].



Figura. 2- 8: Aspecto físico del tallo y raíz de la Moringa oleífera.

2.2.4. Microorganismos endófitos

Los hongos endófitos se encuentran en el interior de las plantas sin afectar la misma. La estrecha relación que existe entre el endófito y su planta hospedera se considera de gran importancia, ya que el hongo es capaz de producir sustancias bioactivas, modificando los mecanismos de defensa de la planta, permitiendo e incrementando la sobrevivencia de ambos organismos[44]. Los endófitos producen compuestos activos que protegen a la planta frente al ataque de patógenos y herbívoros, constituyendo una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la medicina.

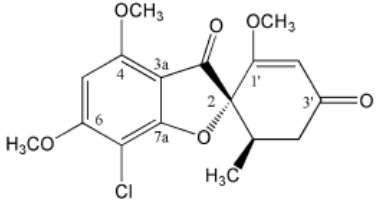
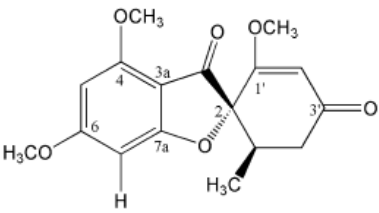
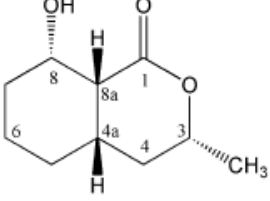
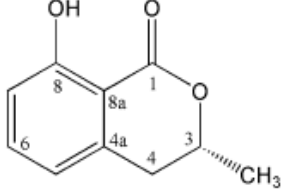
Los hongos endófitos se han encontrado en todas las plantas (pastos, algas, musgos y plantas vasculares), desde las que habitan en el ártico hasta los trópicos, así como en los campos agrícolas. Algunos hongos endófitos producen metabolitos secundarios o alelo químicos, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de otras especies que crecen a su alrededor y que usualmente son competidores por el espacio y nutrientes. Incluso se ha visto que ciertos hongos endófitos producen los precursores o los metabolitos secundarios con actividad biológica, cuya síntesis se le había atribuido a la planta.

2.2.4.1. *Nigrospora sp*

Nigrospora sp es un hongo filamentoso que se encuentra en el suelo, el aire y las plantas como una hoja patógeno. Se puede presentar como un endófito que es capaz de producir metabolitos secundarios antivirales y anti fúngicos. Aunque es a menudo considerado como un patógeno, también puede actuar como un endófito en función de su anfitrión. Estudios han identificado nuevos metabolitos aislados de *Nigrospora sp* en la *Moringa oleifera*. Algunos de estos metabolitos actúan como fito-toxinas, mientras que otros contienen propiedades antivirales o anti-fúngicos. Su identificación se basó en el análisis de la secuencia de ADNr, por fraccionamiento guiado por bioensayo, en el que cuatro metabolitos secundarios anti fúngicos se aislaron. Las estructuras químicas para griseofulvina, dechlorogriseofulvina, 8-dihidroramulosin y Mellein se muestran en la Tabla 2-2. En el ensayo antifúngico in vitro mostró que la griseofulvina es el principal metabolito en presentar inhibición sobre del crecimiento de hongos patógenos de plantas[7]. El propósito de la producción de muchos de estos metabolitos por el hongo no se entienden

completamente o son todavía desconocidos y es un área que necesita ser estudiado con mayor profundidad [45].

Tabla. 2- 2: Metabolitos de *Nigrospora sp* aislados de *Moringa oleífera* [7].

Nombre del Metabolito	Estructura
griseofulvina	
dechlorogriseofulvina	
8-dihidroramulosin	
Mellein	

2.3. Metabolismo y metabolitos.

El metabolismo es la capacidad que tienen los seres vivos de poder modificar químicamente la naturaleza de ciertas sustancias internas. Este proceso es mediado por reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que ocurren en el interior de la célula y

en el organismo. Estos complejos procesos interrelacionados son la base de la vida, a escala molecular y permiten las diversas actividades de las células: crecer, reproducirse, mantener sus estructuras y responder a estímulos, entre otras actividades[46]. El metabolismo de un organismo determina las sustancias que encontrará nutritivas y las que encontrará tóxica. El proceso está enmarcado en dos grandes fenómenos o reacciones (catabolismo y anabolismo). La captación de sustancias indispensables para el desarrollo del organismo es la clave para que se lleven estos procesos. Existen numerosas vías, que a su vez están en función del organismo en cuestión, una de ellas es el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbónicos. El Ciclo de Krebs es un proceso metabólico presente en cada una de las células del ser vivo que utilicen oxígeno para su subsistencia. Las sustancias o moléculas que resultan del metabolismo llevan el nombre de metabolitos. Estos últimos participan en las reacciones químicas que tienen lugar a nivel celular. El conjunto de estas reacciones bioquímicas, junto a los procesos físico-químicos intracelulares, constituye el metabolismo celular, la base molecular de la vida y éstos pueden presentar clasificación en primarios y secundarios[47].

2.3.1. Metabolitos primarios

El mecanismo por el cual el microorganismo realiza reacciones metabólicas necesarias para que pueda crecer y mantenerse vivo, reacciones anabólicas y catabólicas necesarias para el mantenimiento y crecimiento de la célula es conocido como metabolismo primario [48].

En las plantas las reacciones que intervienen tienen como producto final moléculas llamadas metabolitos. Debido a su carácter universal en el reino de las plantas, los procesos que intervienen en el metabolismo primario y sus metabolitos, se encuentran en todas las plantas sin excepción. Dentro del proceso de síntesis intervienen carbohidratos, lípidos, péptidos, vitaminas, ácidos nucleicos entre otros (Tabla. 2-3). El metabolismo primario proporciona un gran número de moléculas simples, como el ácido shiquímico, el acetato y los aminoácidos, los cuales constituyen los materiales de partida para las rutas biosintéticas del metabolismo secundario.

Tabla. 2- 3: Compuestos de partida en la formación de metabolitos [8].

Primario	Intermedio	Secundario
Carbohidratos	Monosacáridos, glucosa, fructosa.	Glucósidos, azúcares modificadas,
Proteínas	Aminoácidos	Alcaloides, taninos, fenilpropanos, curaminas.
Lípidos	Ácidos grasos	Terpenos esteroides
Ácidos nucleicos	Bases	Tetrapirroles, alcaloides imperfectos.

2.3.2. Metabolitos Secundarios

El metabolismo secundario incluye aquellos procesos metabólicos que tienen lugar después de terminado el crecimiento a través de vías biosintéticas específicas, que no tienen función estructural ni de reserva (Fig. 2-9) [49]. Incluyen la biosíntesis, la transformación y la degradación de los compuestos endógenos mediante proteínas de especialización las cuales se han formado como resultado de los procesos de diferenciación y se clasifican según su significación biológica y función en la célula productora[50]. Los metabolitos secundarios no son necesarios para la biosíntesis celular, no tiene por tanto un papel directo en el metabolismo energético, en consecuencia no se conoce con claridad la razón de su existencia [51]. Algunos de estos compuestos principalmente los antibióticos, son útiles para el organismo puesto que pueden inhibir a otros organismos de su entorno. Además tienden a ser sintetizados como familias de compuestos relacionados [5]. Las plantas se caracterizan por tener microorganismos endófitos o microorganismos que colonizan tejidos

en las plantas en una relación simbiótica que a su vez intervienen en la formación de metabolitos (Tabla 2-4).

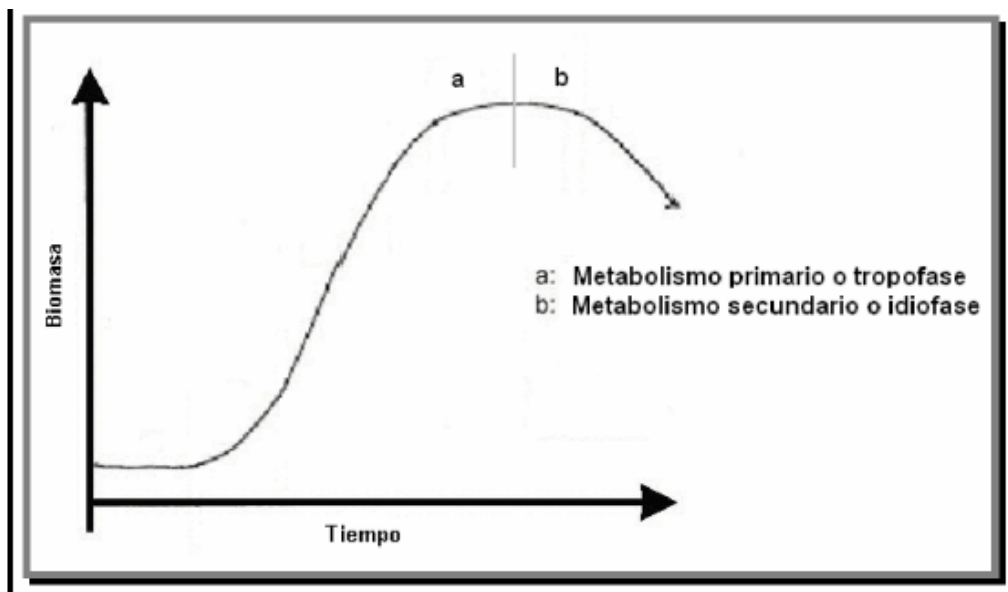


Figura. 2- 9: Curva del comportamiento del metabolito primario y secundario [5].

Tabla. 2- 4: Distribución de principales compuestos fenólicos en el reino vegetal [8].

Organismo	Patrones estructurales
Bacteria	Fenoles derivados de policetidos y quinonas (ocasionalmente presentes)
Hongos	Fenoles simples, fenilpropanoides y quinonas (regularmente reportadas)
Algas	Fenoles iodados y bromados, derivados del floroglucinol en la pared celular
Líquenes	Antraquinonas, depsidos, depsidonas y xantonas
Briofitas	Fenoles en la pared celular, fenilpropanoides estibenos y algunos flavonoides
Helechos, coníferas y plantas que florecen	Ligninas en la pared celular, amplio rango de fenoles de todo tipo

2.4 Principios de técnicas fisicoquímicas de caracterización

La espectroscopia o técnicas de espectroscopia se caracterizan por estudiar la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, con absorción o emisión de energía radiante a una longitud de onda determinada y los niveles de energía implicados en la transición cuántica. El análisis espectral se basa en detectar la absorción o emisión de radiación electromagnética. Caracterizar muestras por estas técnicas nos revela información de la estructura, enlaces químicos contribuyendo a la elucidación de propiedades de la muestra y entender su comportamiento. Se caracterizan por no destruir la muestra y no se requiere una preparación previa de la muestra. El espectro electromagnético (Fig. 2-10) maneja frecuencias y energías en función de la longitud de onda que se desee medir. Por ejemplo son imperceptibles al ojo humano las radiaciones UV, rayos X, rayos- γ (gamma) mientras que el rango visible del espectro es ($\sim 350\text{-}780\text{nm}$). También existen radiaciones con una longitud de onda mucho mayor como la radiación infrarroja, microondas y la de radiofrecuencia que también son imperceptibles para el ser humano [52]. El presente estudio contiene análisis de Espectroscopia Infrarroja (IR), UV-Visible y energía dispersada de rayos-X (EDX).

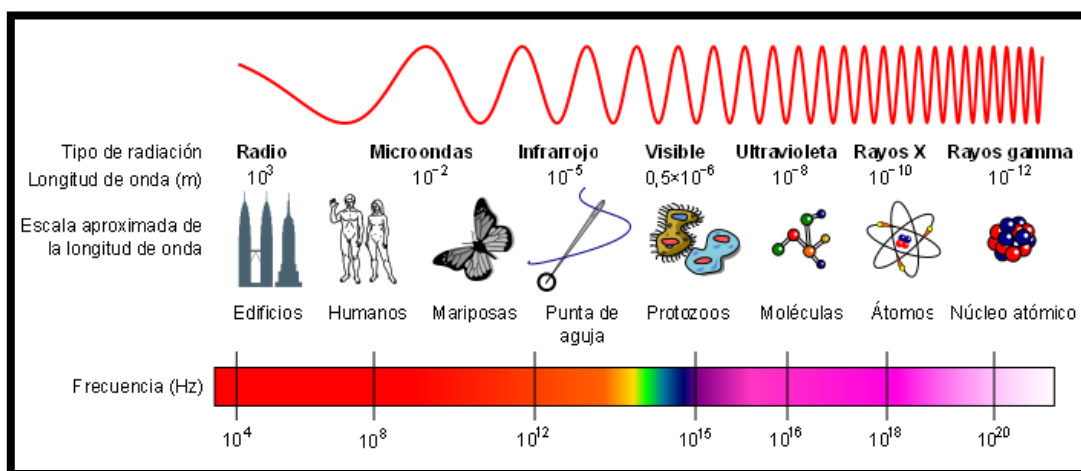


Figura. 2-10.: Espectro electromagnético

2.4.1.. Espectroscopia de absorción de luz ultravioleta y visible (UV-Visible)

La radiación UV- visible provoca una excitación de los electrones de orbitales de más baja energía a orbitales de más alta energía mediante transiciones electrónicas entre orbitales. Esta técnica nos permite determinar la absorción del extracto y la longitud de onda característica del plasmón superficial de las nanopartículas de plata, el cual refleja la longitud de onda que hace que la nube de electrones que se encuentra alrededor de esta nanopartículas metálica se polarice por efecto de la luz incidente (Fig. 2-11). Las nanopartículas de plata son reducidas a este plasmón en el rango de 400-450 nm, ésto con el fin de determinar la tasa de formación de Ag-NPs a intervalos definidos de tiempo[25, 27, 40].

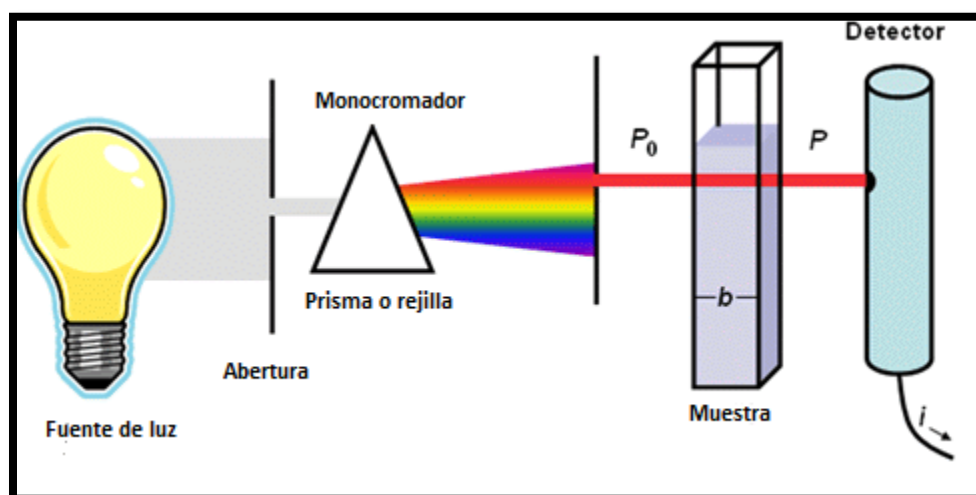


Figura. 2-11: Fundamento de espectroscopia UV-Vis.

2.4.2. Espectroscopia infrarroja (IR)

En esta técnica los enlaces de una molécula van a sufrir transiciones vibracionales, cada una con una frecuencia determinada y característica, y cada una de estas transiciones va a provocar una banda de absorción. En esta técnica se incide sobre la muestra, un haz de luz infrarrojo monocromático con una longitud de onda determinada, de tal forma que si la longitud de onda de excitación de algún enlace molecular presente en la muestra, coincide

con alguna de las frecuencias que componen el haz, se produce absorción de energía. La técnica de Espectroscopia de Infrarrojo brinda información sobre la presencia de grupos funcionales presentes en la muestra, al lograrse la identificación de ciertas bandas características, dependiendo de la cantidad de radiación infrarroja que éste absorbe, transmite o refleja. La complejidad de un espectro IR permite su uso para identificar sustancias ya que se transforma en una especie de “huella digital” del compuesto. Esto debido a que cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, pasa de su estado fundamental a un estado vibracional excitado, produciéndose una vibración característica. Esto genera señales con frecuencias que corresponden a la vibración de un enlace específico de acuerdo a la energía suministrada[53].

2.4.3. Espectroscopia por energía dispersiva de rayos-X (EDX)

Esta técnica proporciona información sobre la composición química de las muestras, las cuales al ser irradiadas con un haz de electrones primarios acelerados a una diferencia de potencial de $\sim 1-30\text{KeV}$, generan rayos-X que pueden ser detectados. Los electrones retrodispersados, son los electrones que se emplean en la técnica EDX, obteniéndose una imagen por contraste en función de la composición química del material. Los fotones emitidos por la muestra durante un determinado periodo, permiten identificar y cuantificar cada elemento presente en la muestra mediante un espectro de EDX, lo cual es posible debido a que cada elemento le corresponde una longitud de onda característica. Ésta técnica nos permite conocer y analizar la composición elemental de áreas del tamaño de algunos micrómetros cúbicos. Normalmente, esta técnica se emplea acoplada a un microscopio electrónico de transmisión (TEM) o de barrido (SEM). Cuando se incide un electrón y éste golpea a otro electrón que se encuentra en uno de los niveles de energía más internos de un átomo, le transfiere suficiente energía como para removerlo de su posición creando un hueco, el cual es ocupado por un electrón de un nivel más externo, ésta transición de un nivel externo a uno interno, genera un fotón de rayos-X. Esta técnica se emplea acoplada a microscopios electrónicos de transmisión o de barrido y a microscopio de rayos X.

2.4.4. Dispersión dinámica de luz (DLS)

Dispersión dinámica de la Luz: esta técnica es de gran utilidad para analizar la distribución del tamaño de partícula, presente en la muestra objeto de estudio[24].

2.4.5 Formación de nanopartículas en función del tiempo

La formación de nanopartículas desde el punto de vista cinético y termodinámico, depende fuertemente de procesos de nucleación y de crecimiento. Ambos procesos ocurren simultáneamente, y pueden ser considerados de forma individual a fin de realizar una buena aproximación al proceso de formación de AgNPs. En la nucleación puede dividirse en primaria, en la cual las partículas (o cristales) comienzan a formarse en ausencia de otras partículas sólidas (formación de núcleos) y secundaria en la que se requiere la presencia de estos núcleos [10]. El proceso de crecimiento de las partículas es controlado por la adición de otras partículas en las diferentes caras de las partículas primarias mediante interacciones químicas. Estos procesos de nucleación y crecimiento de cristales pueden ser descritos mediante diferentes teorías que se basan en el potencial químico. Para el caso de formación de una fase sólida en una fase líquida, la fase sólida se forma si se cumple que el potencial químico del componente disuelto es menor que el potencial químico del material en solución. En la formación de nanopartículas metálicas el seguimiento puede hacerse mediante estudios experimentales, siguiendo la reacción por técnicas como espectrofotometría UV-Vis, se ha comprobado que para favorecer menores tamaños de partícula, los procesos de nucleación han de ser rápidos y los procesos de crecimiento lentos y por poco tiempo. Sin embargo controlando estas dos variables, es posible modular el tamaño de partícula que se quiere obtener. En la figura 2-12 se describen las etapas del proceso de nucleación y crecimiento de una partícula de plata.

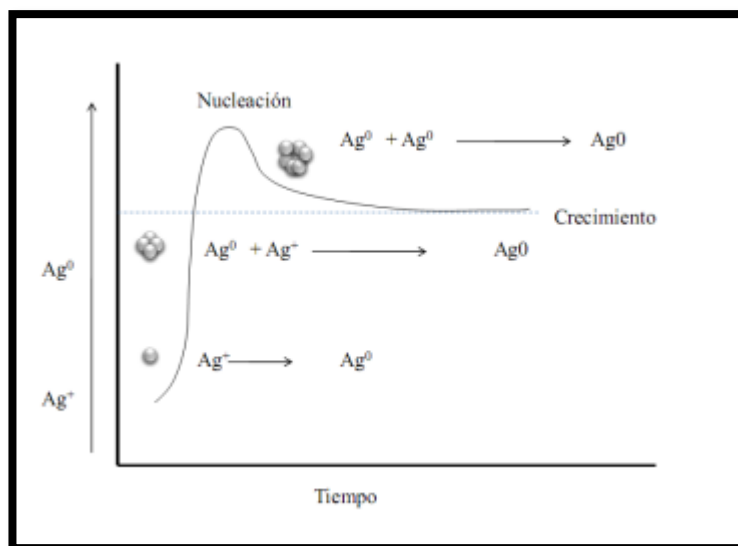


Figura 2-12: Etapas de nucleación y crecimiento de AgNPs.

2.5. Técnicas de caracterización estructural

A continuación se describen las técnicas de caracterización estructural empleadas en el presente estudio para la elucidación de la composición y morfología de las nanopartículas sintetizadas.

2.5.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) acoplada con EDS

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que sirve para analizar y caracterizar morfología, determinar el tamaño y distribución de las partículas de materiales sólidos de todo tipo: metales, cerámicos, polímeros, biológicos, orgánicos e inorgánicos con previa preparación. Las principales características del SEM son la alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. El método básico del SEM (“Scanning electron microscope”) consiste en un barrido de la superficie de un sólido en un patrón de trama con un rayo de electrones energéticos $\sim 30 \text{ keV}$. Una trama es un patrón de escaneo donde un rayo de electrones es barrido a través de una superficie siguiendo una línea recta (dirección x), regresa a su posición inicial, y se desplaza hacia abajo (dirección y) con incrementos

estándar (Fig. 2-12). Este procedimiento es repetido hasta que el área total de la muestra es examinada. El número arrojado por cualquier punto dado es determinado por la composición de la muestra en el punto y ángulo en el cual el rayo choca. Al interactuar los electrones incididos con la muestra, se generan electrones secundarios y retrodispersados. Los electrones secundarios son aquellos que se obtienen debido al choque elástico entre el electrón incidente y el electrón del núcleo (el chorro de electrones secundarios varía constantemente de acuerdo con la naturaleza de la superficie), los electrones liberados son monitoreados por un detector colocado arriba de la superficie de la muestra (dirección z), amplificada y almacenada en una computadora, el cual a través de pixeles origina la imagen de la superficie de acuerdo a la intensidad de la señal emitida por cada área escaneada del material, en una escala de grises (Fig. 2-13)[54]. La detección y medición de esta energía permite realizar una espectroscopia de energía dispersa (“EDS”), el cual nos da información sobre los elementos que se encuentran en la superficie de la muestra.

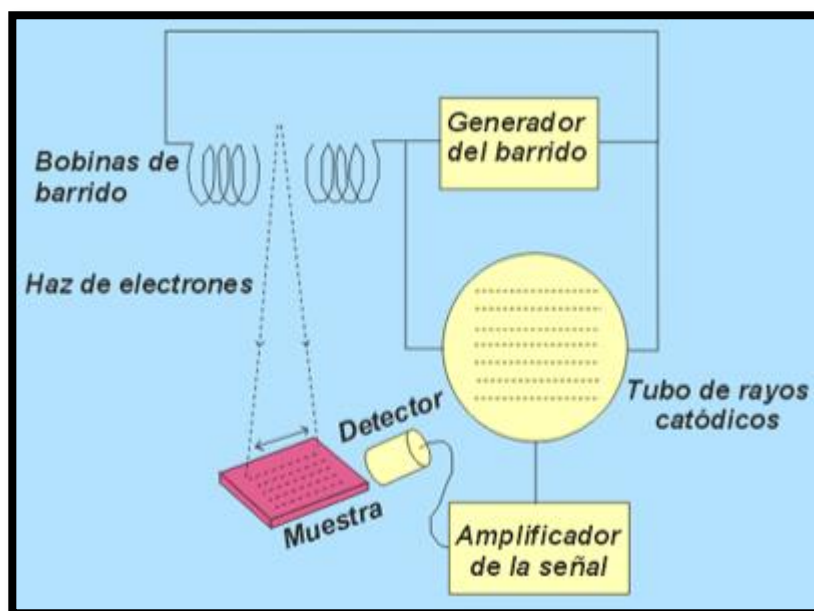


Figura. 2-13: Fundamentos de un Microscopio Electrónico de Barrido.

En este proyecto se busca caracterizar mediante esta técnica las AgNPs su morfología y estructura así como la manera como se agregan las partículas. Obteniendo información morfológica y topográfica de la superficie de residuos sólidos estudiados.

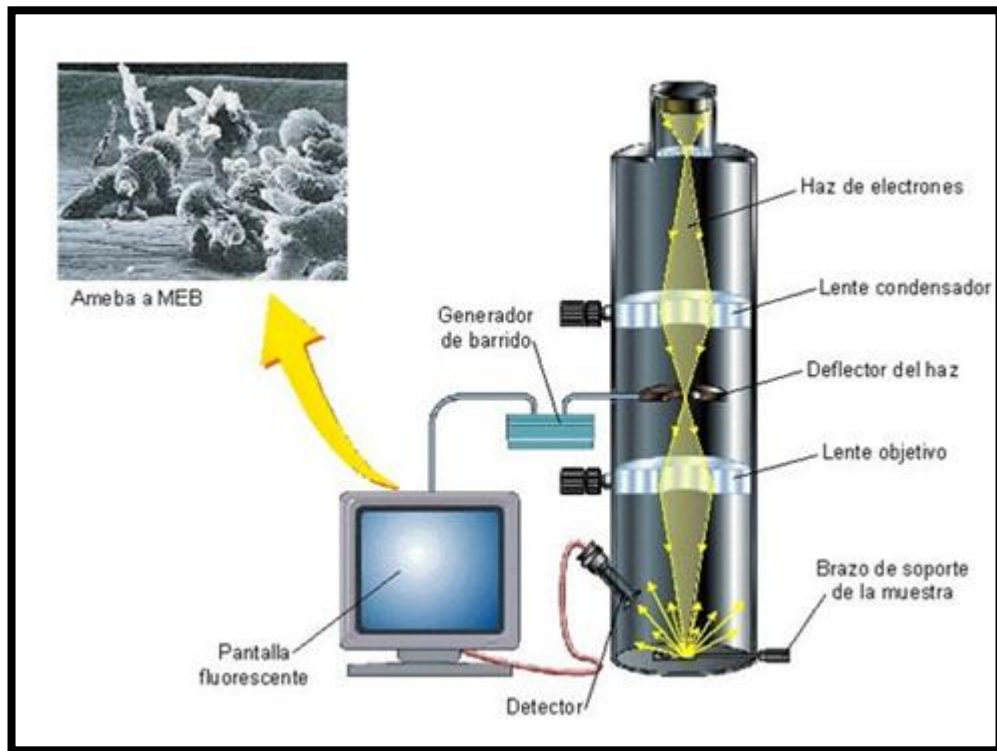


Figura. 2-14: Partes que componen un microscopio electrónico de barrido.

2.6. Medición del potencial Zeta y DLS

Es una propiedad física de las partículas en suspensión. Si alguno de los estados fundamentales de la materia está finamente disperso en otro, entonces se tiene un sistema coloidal. Ejemplos de sistemas coloidales son el agua, la sangre y muchos productos farmacéuticos. Las propiedades físicas del sistema coloidal son fuertemente afectadas por las propiedades de los coloides, que pueden ser partículas sólidas en una solución líquida, entre otros tipos de combinaciones. Es posible cambiar las características de una suspensión al comprender las interacciones de las partículas entre sí [55]. El potencial Zeta y distribución del tamaño de partículas es un parámetro importante en el control de partículas coloidales, éste parámetro indica el efecto de fuerzas electrostáticas, velocidad y estabilidad de las partículas en solución [56].

CAPITULO 3

Este Capítulo 3 brinda información sobre los microorganismos patógenos a evaluar, la dependencia de los nutrientes que absorben del medio en el cual se desarrollan y las particularidades de cada organismo objeto de este estudio, también se establecen los fundamentos del método de difusión por disco como herramienta útil para la identificación de propiedades antimicrobiales de las AgNPs

CAPÍTULO 3

MICROORGANISMOS Y CULTIVOS EMPLEADOS

3.1. Microorganismos patógenos

Son aquellos que dañan la salud humana, y son principalmente bacterias, virus y protozoarios. Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra, colonizan todo ambiente: suelo, agua y aire, participan de forma vital en todos los ecosistemas y están en interacción continua con las plantas, los animales y el hombre. Los microorganismos son clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta, pues participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos de los cuales dependemos para sobrevivir y enfrentar los retos del futuro. A medida que se van introduciendo nuevos antibióticos, las bacterias desarrollan diferentes mecanismos para neutralizarlos. Los microorganismos se agrupan en dos categorías: procarióticos y eucarióticos. En la primera están las Archaeas y las bacterias, mientras que en la segunda se encuentran hongos, algas y protozoarios. No obstante, de manera convencional los virus, viroides y priones son también considerados microorganismos. [57]. Hoy en día, existen muchas enfermedades originadas por microorganismos patógenos, que potenciados por el alto nivel de contaminación mundial, conllevan al desarrollo y evolución de otras formas de virus y bacterias más poderosas y resistentes a tratamientos biomédicos, creando inmunidad a los propios medicamentos, y obligando a desarrollar nuevas tecnologías en productos de eliminación microbiana.

3.2 Medios de cultivo

Para el crecimiento e identificación de microorganismos es importante proveer las sustancias alimenticias requeridas por éstos mismos. Los medios de cultivo son sustancias preparadas en el laboratorio que son comercializadas con el fin de suministrar al

microorganismo en cuestión de los nutrientes óptimos para su crecimiento y desarrollo (Fig. 4-1). El crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo está en función de temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante. Muchos microorganismos patógenos requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes. El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. A la temperatura del agua hirviendo se licua y se solidifica al enfriarse a 40 grados. En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre total, bilis, etc. Los hidratos de carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos. El suero y la sangre total se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.



Figura. 4- 1: Medios de cultivos comerciales empleados en el estudio.

3.2.1. *Escherichia coli*

Es un bacilo gramnegativo de la familia de las enterobacterias que se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente (Fig. 3-2a). La *Escherichia coli*, es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, no solamente por sus capacidades patogénicas sino también como modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole. Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Estas bacterias son capaces de afectar, con frecuencia a niños provocando brotes de gastroenteritis con diarrea líquida no inflamatoria, por consumo en alimentos con altos inóculos de microorganismos. Esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio[58].

La *E. coli* puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización, que se transmiten por vía oral o fecal a través del agua y alimentos. La mayoría de los agentes patógenos transmitidos por el agua no crecen en el agua e inician la infección en el aparato digestivo tras su ingestión, sino que entran en los sistemas de abastecimiento de agua mediante su contaminación con heces humanas o animales. La bacteria tiene cuatro fases de crecimiento: Fase de latencia, Fase logarítmica o exponencial, Fase estacionaria y Fase de muerte. En la fase de adaptación, las células se adaptan al nuevo ambiente, las cuales dependen de las condiciones en que estaban antes de introducirlas al medio. En la fase logarítmica o exponencial las células comienzan a crecer y dividirse según las condiciones existentes. Cuando un nutriente del medio se acaba la bacteria alcanza la fase estacionaria en la cual ya no hay crecimiento neto[59].

3.2.2. *Enterobacter cloacae*

El *Enterobacter cloacae* es una bacteria que pertenece al género es un bacilo Gram negativo Oxidasa negativo y Catalasa positivo presente (como microbiota local) en el aparato digestivo humano (Fig. 3-2c). *Enterobacter* ha cobrado importancia como patógeno en las últimas 3 décadas y se han aislado especies de este género en infecciones del tracto respiratorio, heridas quirúrgicas(infección nosocomial), tracto urinario, sangre [60]. Es responsable de infecciones oportunistas, cuando el organismo presenta las defensas en bajos niveles, y en otras ocasiones la infección es por contaminación externa. Es un bacilo Gram negativo; como el resto de las enterobacterias, son fermentadoras de la glucosa. Estos fermentan la lactosa por lo tanto se observan como colonias rosadas en Agar McConkey. Es un frecuente invasor secundario de quemaduras y heridas. Entre los síntomas se presentan: ardor o dolor al orinar, la sensación de tener que orinar aun cuando en realidad no sale orina o sólo sale un poquito, dolor en la parte inferior del abdomen, dolor por encima del hueso púbico (en las mujeres) una sensación de tener el recto lleno (en los hombres), orina sanguinolenta o con mal olor, fiebre leve, una sensación general de temblor y fatiga. Toda infección suele producir fiebre, dolor y malestar general.

El tratamiento de la infección por *Enterobacter cloacae* es principalmente suministrar antibióticos beta-lactámicos (piperacilina+tazobactam), fluoroquinolonas (ciprofloxacino), aminoglucósidos (gentamicina); si la bacteria adquiere resistencia se suelen administrar combinaciones de dos o más fármacos. La *Enterobacter cloacae* es resistente a la Cefalosporina [61-63].

3.2.3. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis es una especie bacteriana del género *Staphylococcus*, consistente en cocos Gram-positivos arreglados en grupos (Fig. 3-2b) poseen una capa externa de polisacáridos que se adhieren firmemente al plástico, lo que también contribuye a impedir la penetración de los antibióticos dificultando el tratamiento, estas biopelículas que crecen en los dispositivos de plástico que se colocan dentro del cuerpo. Esto ocurre más comúnmente en los catéteres intravenosos y prótesis médicas. En la actualidad se le reconoce como un patógeno importante causante de diferentes entidades clínicas, entre ellas: Infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa,

bacteremia en pacientes inmunosuprimidos, endoftalmitis después de cirugía ocular, infecciones de dispositivos médicos o cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fístulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas, injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas e implantes de mama. Una característica importante de esta bacteria es la susceptibilidad antimicrobiana que presenta, ya que ha desarrollado resistencia a la meticilina. Esta es la razón por la cual en la actualidad se considera que la vancomicina es el tratamiento de elección para las infecciones causadas por este germen. A diferencia del *S. aureus*, se conoce poco sobre el mecanismo de patogénesis, sin embargo, se reconoce como característica de muchas cepas la formación de un 'biofilm' fabricado en base al ácido teicoico, el cual normalmente forma parte de la pared del estafilococo. Esta capa los protege de la acción de los neutrófilos y a su vez disminuye la penetración de los antibióticos. Las manifestaciones clínicas de las infecciones causadas por *S. epidermidis* difieren marcadamente de aquellas causadas por el *S. aureus*. Los síntomas suelen ser sutiles e inespecíficos; y el curso clínico es más subagudo e incluso crónico, sin signos fulminantes de infección,

Cerca del 90% producen beta lactamasas, mientras que 60% al 80% son resistentes a la meticilina. El fármaco de elección es la vancomicina y la duración del tratamiento varía de acuerdo al tipo de infección[64].

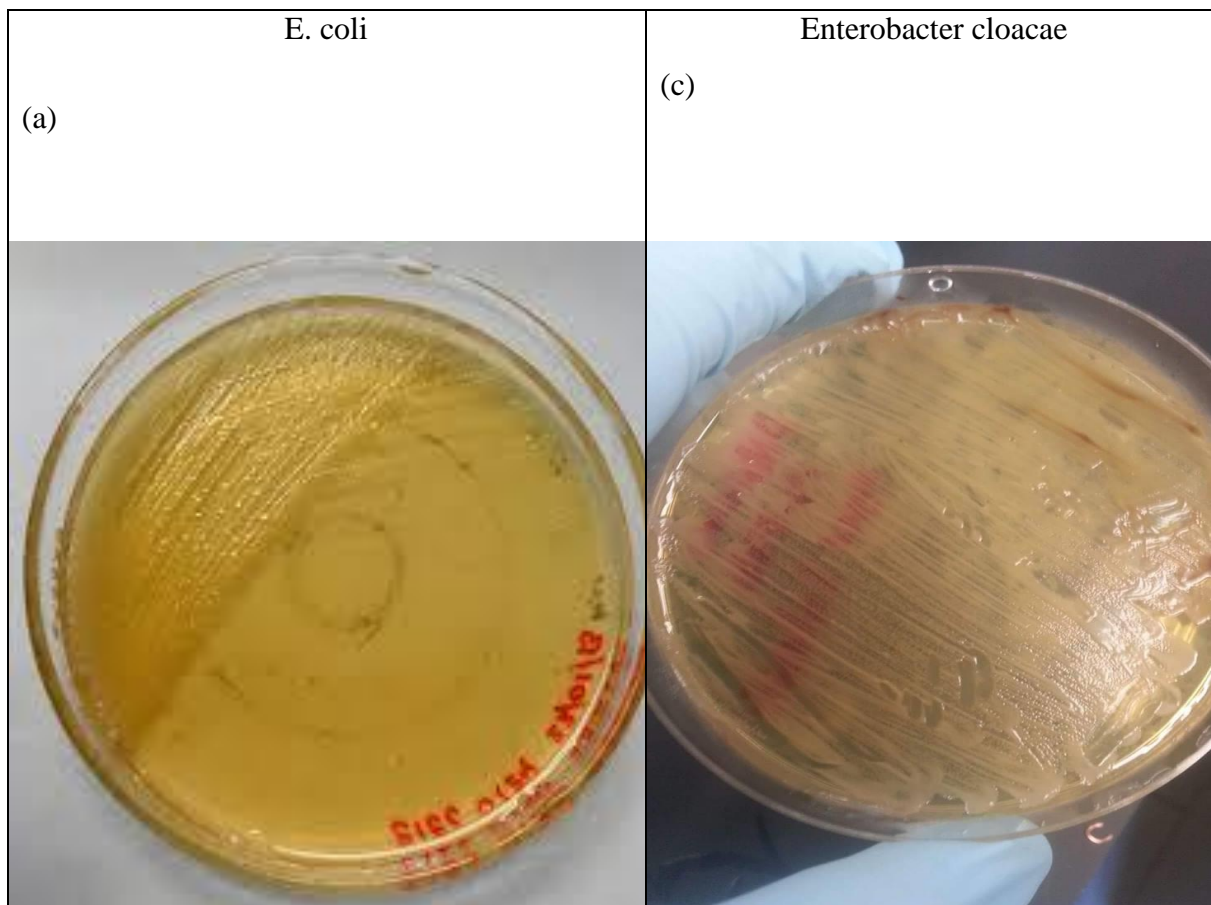
3.2.4. *Candida Albicans*

Candida albicans es un hongo diploide asexual (forma de levadura) y saprófito, de la familia de los *Cryptococcaceae*. Habitualmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Tiene una función relevante en la digestión de los azúcares, mediante un proceso de fermentación. Son células ovoides o ligeramente alargadas que miden entre 3 y micras (fig. 3-2d), se reproducen por blastoconidios, una forma que es observable al microscopio, la otra es en forma de levadura, los primeros, son producidos una vez en un plazo aproximado de 20 minutos. Se caracterizan por formar pseudohifas tanto en vivo, como in vitro. *Candida* se desarrolla con gran facilidad en medios artificiales de cultivo. Aunque puede haber pequeñas diferencias entre la morfología colonial de las

diferentes especies de *Candida*, por lo regular es similar. Se desarrollan en el medio de Agar Sabouraud como colonias cremosas lisas o rugosas en un tiempo promedio de 24 a 48 horas, a temperaturas de 24 a 37°C, con un olor característico a levadura de pan o cerveza.

Los métodos convencionales para la identificación de las especies de *Candida* están basados en la asimilación y fermentación de carbohidratos y su morfología. La rápida y correcta identificación a nivel de especie de los aislamientos de *Candida*, son fundamentales para garantizar la adecuada prescripción específica, tanto en dosificación como duración, que permita una pronta y eficaz terapia antifúngica.

C. albicans, el principal patógeno humano del género *Candida*, es una levadura comensal de la mucosa oral, gastrointestinal y vaginal de individuos sanos y parece tener una distribución casi mundial. La presencia de estas levaduras en la cavidad oral no necesariamente da lugar a enfermedades a menos que existan factores predisponentes para el desarrollo de la candidiasis [65].



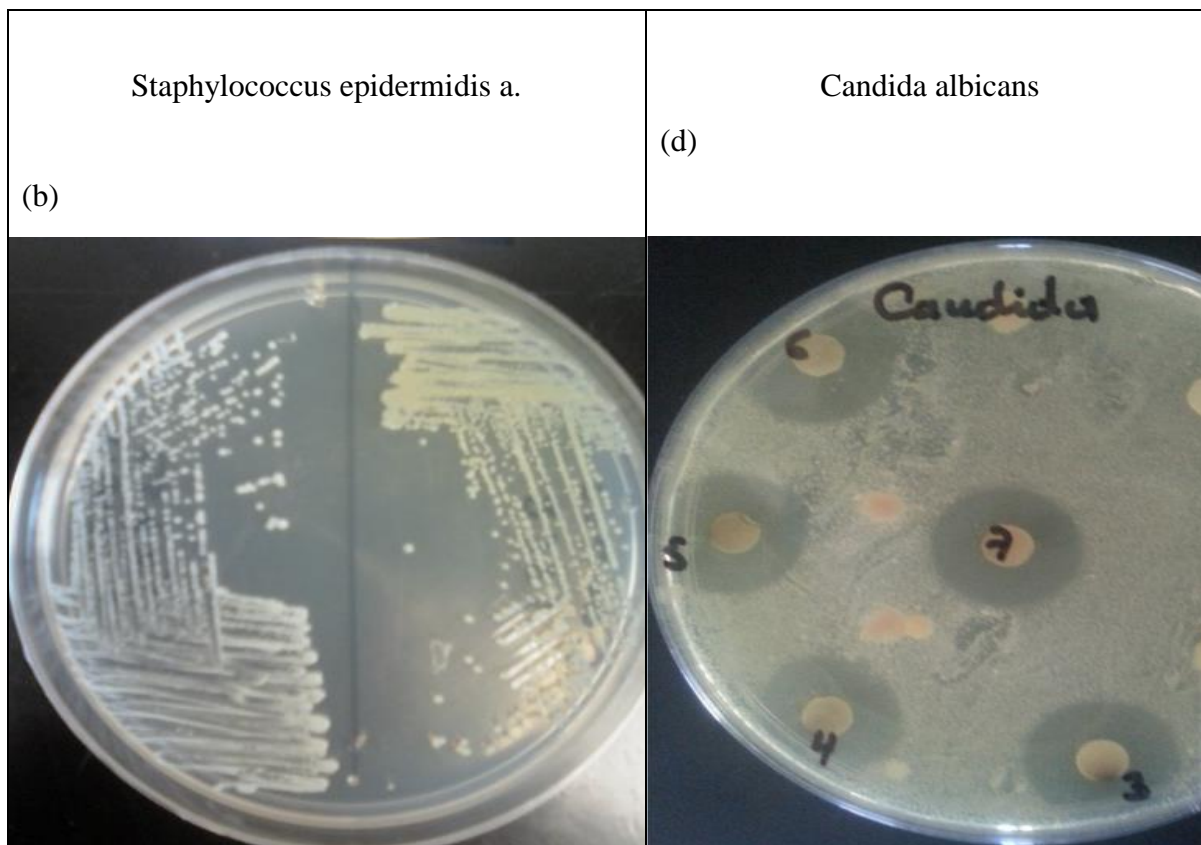


Figura. 3- 2: Cultivos de microorganismos patógenos utilizados en el presente estudio

3.3 método de difusión por disco

La difusión con disco es una de las técnicas más antiguas para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos y sigue siendo la más utilizada en la rutina de los laboratorios clínicos. Esta técnica es adecuada para la evaluación de la mayoría de los patógenos bacterianos incluyendo los microorganismos exigentes más frecuentes, permite el estudio de una gran diversidad de antimicrobianos y no requiere un material especial. Para el análisis debe tenerse en cuenta:

1. Seleccionar las colonias
2. Preparar una suspensión del inóculo
3. Estandarizar la suspensión del inóculo
4. Inocular la placa
5. Colocar discos de antimicrobiano

6. Incubar la placa

7. Medir las zonas de inhibición e interpretar los resultados.

Se utilizaron cepas la cepas suministrada por el Laboratorio de odontología de la Universidad Autónoma de Baja California y se preparó tanto el medio líquido para el cultivo celular como el medio sólido, donde la cepa crecerá en las cajas de Petri. Posteriormente ambos medios se a esterilizaron junto con los discos impregnados con las nanopartículas por un periodo de 48 horas a una temperatura de 37°C (Fig. 3-3).

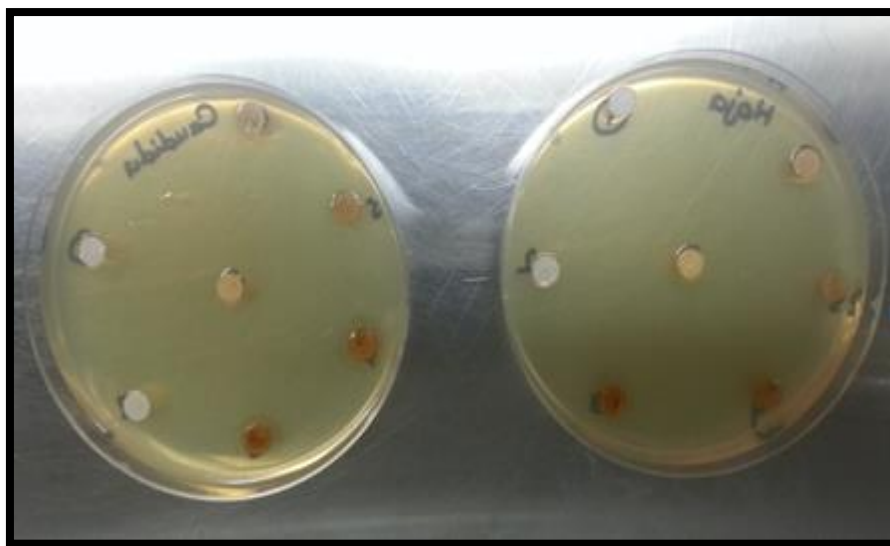


Figura. 3- 3: Discos impregnados de nanopartículas en la técnica de difusión por disco.

CAPITULO 4

Las nanopartículas sintetizadas y caracterizadas en este proyecto de investigación, requirieron un procedimiento específico, que se presentan en este Capítulo de manera detallada.

CAPÍTULO 4

DETALLES DE EXPERIMENTACION

El carácter de esta investigación de tipo experimental. El cumplimiento de los objetivos propuestos está soportado por una revisión previa de la literatura. Se controlaron las condiciones de síntesis de esterilidad en el laboratorio y finalmente se estudió el efecto de inhibición de crecimiento de los microorganismos en función de la relación de las nanopartículas y el tiempo de contacto. En la Figura 4-1 se observa un diagrama de la metodología empleada.

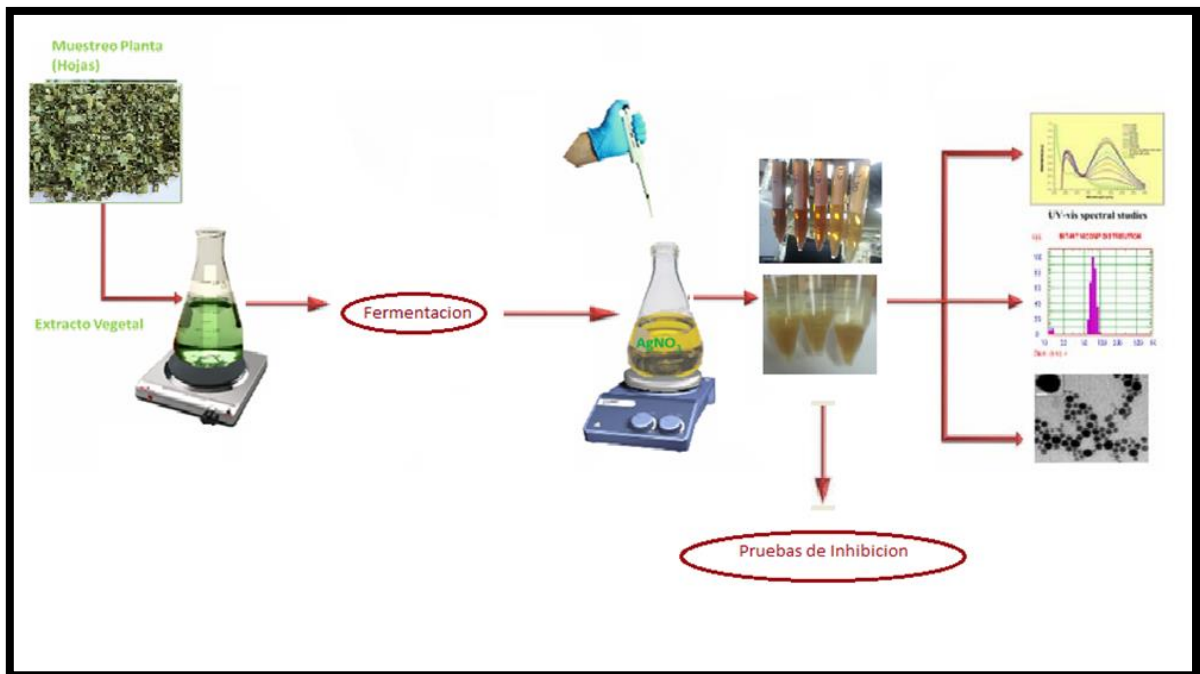


Figura. 4- 1: Diagrama de metodología diseñada en el presente estudio.

4.1 Materiales y equipos empleados

En la Tabla 4-1. Se presenta un listado de los equipos y materiales utilizados en el presente proyecto; los cuales se encuentran en su mayoría en los laboratorios de materiales y Corrosión y Materiales y de Biopelículas del Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California.

Tabla. 4- 1: Materiales, equipos y reactivos utilizados.

Material /Equipo	*	Material /Equipo	*
Espectrofotómetro UV-Vis marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25	LB	Eppendorf, Papel whatman	LC
Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) marca Perkin Elmer, modelo Spectrum One	LC	Plancha de Calentamiento	LC,
Nanotracer	LC	Centrifuga, Incubadora	LB
TEM, SEM, EDS, EDX,	LC	Reactivos	
Balanza analítica, Vasos de precipitado, Matraces Erlenmeyer	LC	Nitrato de Plata	LC
Tubos VWR, Pipetas Pasteur	LC	Etanol	LC
Insumos estériles, Transferpipetas, puntas, Autoclave	LB	Agua desionizada, Hipoclorito de sodio	LC

* **LC** y Disponible en el Lab. de corrosión y **LB** en el Lab. de Biofilms

4.2 Obtención de las muestras

Las muestras de *Moringa oleífera* fueron cosechadas de árboles cultivados en Mexicali, Baja California, México. Los productos químicos utilizados se compraron a Fermont con

calidad analítica y el cumplimiento de las especificaciones de la American Chemical Society (ACS).

4.2.1 Lavado de la muestra

Se usaron las hojas de la planta. Preparación de la muestra se realizó de la siguiente manera:

- Recolección de las plantas.
- Selección y lavado de las muestras en una solución de etanol al 75% durante 30 s, e hipoclorito de sodio 1% durante 10 min, luego se enjuagó para eliminar todos los microorganismos externos conservando solamente los endófitos. Se dejaron secar a temperatura ambiente.
- Reducción de tamaño utilizando un mortero como se muestra en la Figura 4-2.



Figura. 4- 2: Muestras de Moringa oleífera una vez son maceradas y secadas se almacenan por separado y se rotulan.

4.2.2. Preparación del fermento

Los procedimientos adoptados siguieron el método descrito por precedentes investigaciones [7, 27] El extracto se preparó por infusión de 10g de *Moringa Oleífera* en 1L de agua desionizada a una temperatura de 60°C durante 15 min teniendo cuidado de que la temperatura no supere los 60 grados centígrados (Fig. 4-3.). Se filtró el caldo producido y se almacenó por un periodo de 7 días en ausencia de luz a una temperatura de 25 grados centígrados, estimulando procesos de biotransformación en los que participan organismos endófitos (hongos y bacterias) y moléculas activas en el extracto de la planta para propiciar metabolitos secundarios.

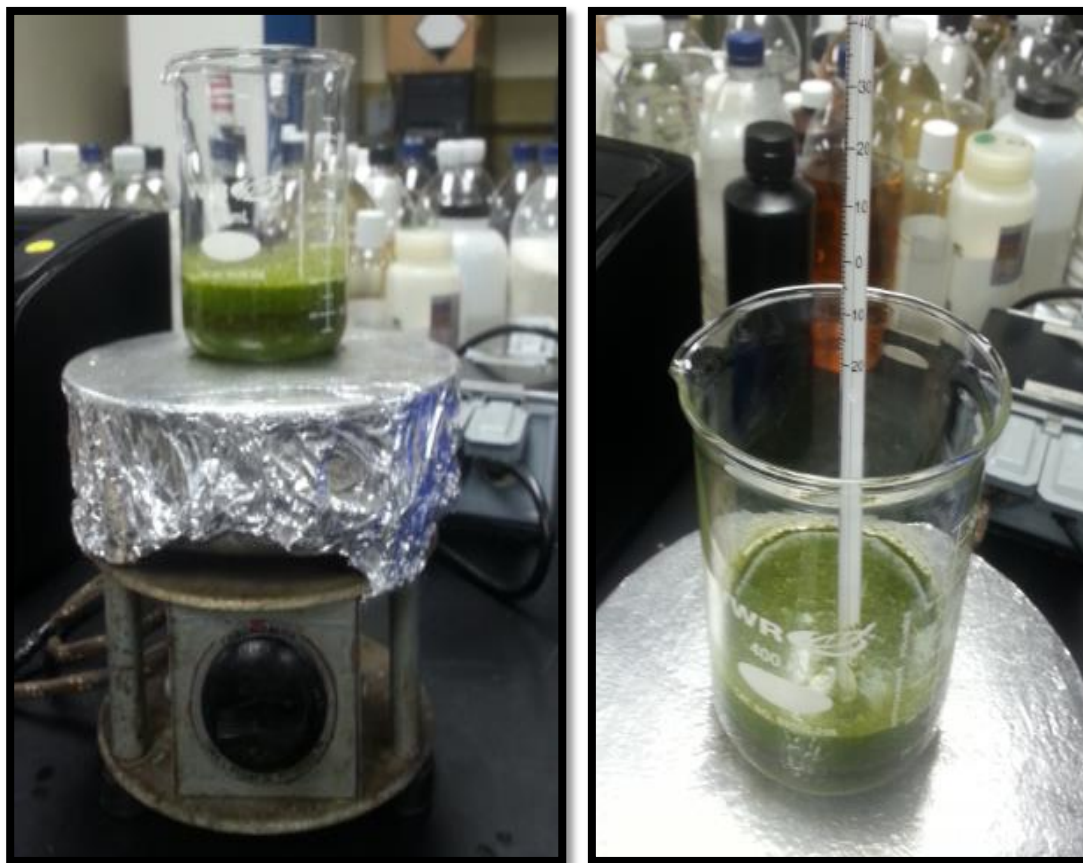


Figura. 4- 3: Esquema de preparación del extracto de hoja de Moringa oleífera por infusión.

La síntesis de nanopartículas de plata se realizó empleando, nitrato de plata (AgNO_3) como sal de partida para la reacción. Se preparó una solución madre de 1 mM de nitrato de plata, y se mezcló en diferentes proporciones con el fermento en una relación fermento: AgNO_3 como se indica en la tabla 4-2.

Tabla. 4- 2: Relación de fermento: AgNO_3 .

Muestras	Relacion fermento: AgNO_3
A	1:1
B	1:5
C	1:10

La reacción procedió a temperatura ambiente durante 10 min, observándose un cambio en el color de la solución a color marrón-amarillo indicando la formación de nanopartículas de plata [38, 66]. Las nanopartículas se separaron del medio de reacción por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. Posteriormente se lavaron con agua y acetona para su posterior caracterización. Estas suspensiones se llevaron al ultrasonido (Fig. 4-4) durante 30 minutos con el propósito de retirar cualquier precipitado que pueda formarse y utilizar solamente las nanopartículas que presenten estabilidad coloidal.



Figura. 4- 4: Muestras en ultrasonido.

4.3. Condiciones para caracterización espectroscópica

4.3.1. Espectroscopia UV-Vis.

Para el seguimiento espectrofotométrico, se utilizó el equipo Perkin-Elmer UV-Vis Lambda 25 spectrophotometer (Fig. 4-5) del Laboratorio de Biofilms del II-UABC, obteniéndose el espectro de absorción de las muestras en suspensión coloidal en un rango espectral de 300 a 600 nm.



Figura. 4- 5: Espectrofotómetro UV-Vis Lambda 25.

4.3.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)

Para la identificación de grupos funcionales involucrados en la reacción se utilizó el equipo *Perkin Elmer Spectrum One FTIR* con ATR del Laboratorio de Corrosión del II-UABC se muestra en la figura 4-6. El rango espectral empleado es de 500 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} . La muestra es colocada en la celda y se realizan background previos para minimizar interferencias.



Figura. 4- 6: Equipo de espectroscopia infrarroja (FTIR) Perkin Elmer Spectrum One.

4.3.3. Espectroscopia por energía dispersiva de rayos-X (EDX)

El análisis elemental de los inorgánicos presentes en la muestra se realizó con el equipo Shimadzu EDX-7000/8000 que se muestra en la figura 4-7.



Figura. 4- 7: Equipo Shimadzu EDX-7000/8000.

4.3.4. Dispersión dinámica de la Luz (DLS)

El tamaño hidrodinámico de las nanopartículas de plata se determinó por mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS por sus siglas en inglés) en el equipo Nanotracs Wave (Fig 4-8), para lo cual se suspendieron las nanopartículas sintetizadas en agua destilada a pH 10 y se procedió a leer en el equipo de las suspensiones de AgNPs obtenidas. Adicional a ello se realizó la medición del potencial zeta de las suspensiones coloidales.



Figura. 4- 8: Nanotracs Wave

4.3.5. Cinética de crecimiento de AgNPs

Para conocer el tiempo de reducción de iones de plata en mezclas de reacción, se realizó seguimiento espectrofotométrico a las soluciones para conocer la absorbancia de las mezclas de reacción a diferentes relaciones (1: 1, 1: 5 y 1: 10) en un intervalo de tiempo de 720 minutos usando el espectrofotómetro UV-Vis Lambda 25.

4.4. Condiciones para caracterización estructural

4.4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para observar las AgNPs obtenidas se empleó el equipo Tescan Lyra 3 que se muestra en la figura 4-9. El SEM utilizó un haz de electrones con voltaje nominal de 30kV. El sistema de electrones cuenta con una emisión de campo de 2nm. Adicionalmente este equipo cuenta con un sistema EDS para determinar y cuantificar los componentes presentes en la muestra.



Figura. 4- 9: Microscopio electrónico de barrido Tescan Lyra 3.

4.5. Medición antibacterial de las nanopartículas de plata en microorganismos patógenos

Se obtuvieron cultivos puros de *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Klebsiella cloacae* (ATCC-23355), *Staphylococcus epidermis* (ATCC-12228) y *Candida albicans* de American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, EE.UU. Se realizaron suspensiones de los cultivos puros, se dispersaron sobre agar de soya tripticasa de soya y se incubaron a 37 ° C. Previo a ello se determinó la concentración en UFC de partida mediante diluciones seriadas y recuento en placa, así como seguimiento espectrofotométrico. La cepa fresca de cada bacteria se extendió uniformemente sobre las placas individuales y se colocaron los discos impregnados de las AgNPs sobre la bacteria en cuestión. Posteriormente se monitoreó por un periodo de 6 h por 2 días a una

temperatura de 37 ° C y se midieron los halos de inhibición (ZOI). En la figura 4-10 se observan medios de cultivo e instrumentos utilizados en este estudio. Para la medición antibacterial se controlaron las variables de entrada (temperatura, tiempo de incubación y relación fermento:AgNO₃ como se indica en la figura 4-11.



Figura. 4- 10: Insumos y equipos para análisis microbiológico.

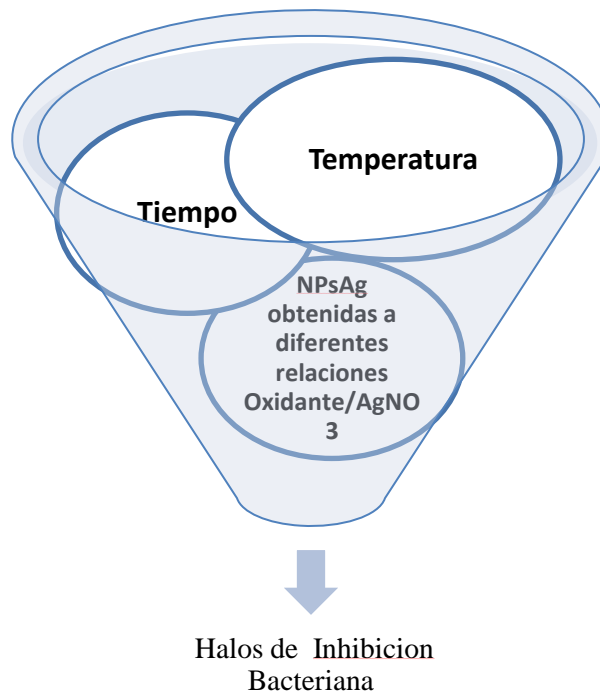


Figura 4- 11: Relación y control variables de entrada y de salida.

CAPITULO 5

En este capítulo se consolida la discusión y resultados obtenidos luego de la síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata, así mismo el cumplimiento y materialización del objetivo del proyecto. Este análisis crítico permitirá identificar las características, propiedades y aplicación de las nanopartículas en función del método de síntesis

CAPITULO 5

DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Nanopartículas obtenidas

La Figura 5-1 muestra las nanopartículas sintetizadas luego de ser suspendidas y sonificadas. Las suspensiones de nanopartículas preparadas se dejaron en reposo por un período de 7 días, con el fin de descartar cualquier precipitado y trabajar con una suspensión coloidalmente estable, coincidiendo con lo reportado [67]. La variación en los tonos de color de amarillento a marrón indica que las NPs obtenidas tienen diferentes tamaños.

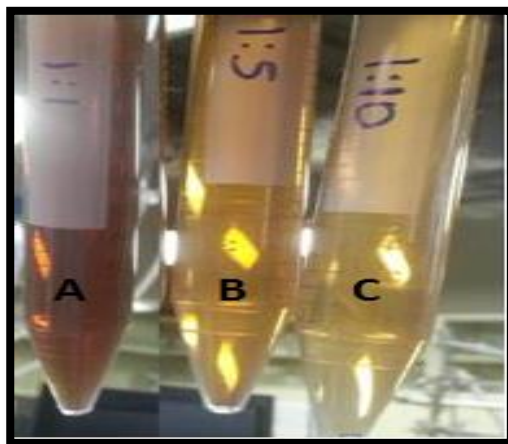


Figura. 5- 1: Variación de color en las reacciones de los tubos A, B, C, en función de las relaciones que se muestran en la tabla.4-2.

5.2. Técnicas espectroscópicas

5.2.1. Espectroscopia UV-Vis.

La estabilidad y formación de NPs en solución se comprobó con el seguimiento espectrofotométrico [24]. Los AgNPs presentan resonancia de plasmón de superficie (SPR) debido a que tienen electrones libres de nanopartículas metálicas que interactúan con la onda de luz debido [17]. Es bien sabido que la intensidad de absorbancia depende principalmente del tamaño y forma de los AgNPs y, en general, de los picos de absorbancia a medida que aumenta el tamaño de las nanopartículas[21]. La Figura 5-2 muestra un escaneo de las muestras en el rango de 300-600 nm. Las bandas con picos característicos en el intervalo de 436 a 440 nm corresponden a la señal de AgNPs dependiendo de la relación fermento /AgNO₃. El cambio de color se debe a la reducción de Ag⁺ y a la formación de AgNPs. Las señales obtenidas con respecto a las diferentes relaciones fueron 1:10 (434 nm), 1: 5 (440 nm), 1: 1 (445 nm), respectivamente. Los resultados muestran que la proporción de fermento juega un papel importante en el control de la formación de nanopartículas. Se observó una mayor absorbancia con picos comparativamente estrechos cuando se mezcló el extracto con una solución de AgNO₃ en una relación 1:10 indicando la formación de nanopartículas. Dado que la relación fermento :AgNO₃ disminuye, la señal de absorción aumenta porque más Ag⁺ están disponibles para la interacción con biomoléculas del fermento.

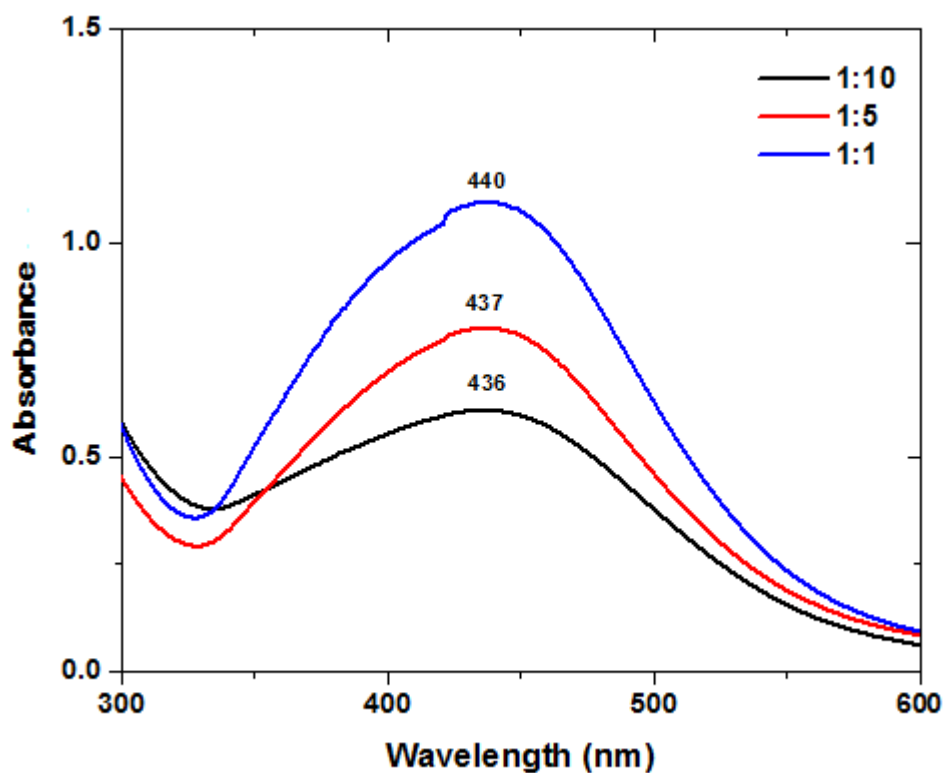


Figura. 5- 2: Espectro UV-vis de AgNPs obtenidas.

5.2.2. Espectroscopia infrarroja (FTIR)

El análisis FTIR se llevó a cabo para identificar las moléculas correspondientes a los metabolitos implicados en la reducción, taponamiento y estabilización de los AgNPs sintetizados. Los picos observados se analizaron cuidadosamente para identificar los grupos funcionales. El análisis espectroscópico de FTIR indicó banda ancha a 3593 cm^{-1} representando grupos -OH unidos. La banda observada a $2917\text{-}2843\text{ cm}^{-1}$ se corresponde al grupo alifático C - H. El pico alrededor de 1624 cm^{-1} corresponde al estiramiento C = O. El pico observado a 1541 cm^{-1} corresponde al grupo amina secundaria, mientras que el pico a 1341 cm^{-1} corresponde a la flexión simétrica de CH_3 . Además, el pico observado a 1274 cm^{-1} corresponde al estiramiento -SO_3 , y 1077 cm^{-1} corresponde a enlaces C = O de éter, éster o fenol. La Figura 5-3 muestra los espectros FTIR de las AgNPs sintetizadas en suspensión. La variación en las bandas de los espectros se debe a su interacción de las biomoléculas con nitrato de plata durante la reacción de reducción. Al comparar con la biblioteca estándar, se elucidaron señales características de β -carotenos, flavonoides y taninos que están implicados activamente con enzimas en la reducción y estabilización de los AgNPs.

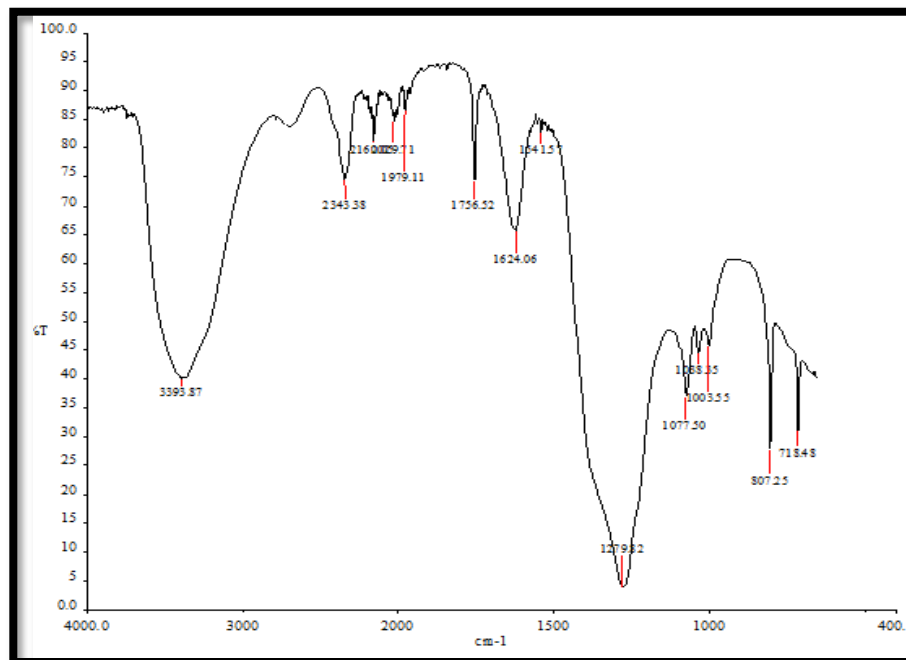


Figura. 5- 3: Espectro FTIR de AgNPs sintetizada.Relación 1:10

5.2.3. Formación de partículas en función del tiempo

En la Figura 5-4 se observa el comportamiento espectrofotométrico de la cinética de nanopartículas en formadas en función del tiempo, una expansión del tiempo de reacción fue acompañada con un evidente aumento en la intensidad de absorbancia antes de 4 horas en la mezcla 1: 10 ee inferior a 8 horas para las muestras 1:5 y 1:1 respectivamente, pero no se encontró aumento significativo después de 8 horas. Esto demuestra que la reducción de iones de plata en estas mezclas de reacción se completó en 8 horas y que no hubo aumento adicional en la absorción hasta 12 horas, mientras que en el caso de una mezcla de relación 1:10, la reducción de iones de plata se completó en 4 h, Dando como resultado un alto rendimiento de nanopartículas en poco tiempo. Esto podría deberse a una mayor exposición iones muestra₃, lo que resulta en la biosíntesis rápida de AgNPs mediante la aceleración de la reducción de iones de plata. Además, se examinó la estabilidad de los AgNPs sintetizados manteniendo las mezclas de reacción a temperatura ambiente durante 4 meses, Y se encontró que la mezcla de reacción mostró pico a la misma longitud de onda con una intensidad de absorción similar que confirmó la estabilidad de los AgNPs sintetizados. Este análisis nos lleva a decir que la muestra 1:10 presenta tiempos de nucleación más rápidos dada la intensidad y la forma estrecha del pico en relación a las demás muestras objeto de estudio.

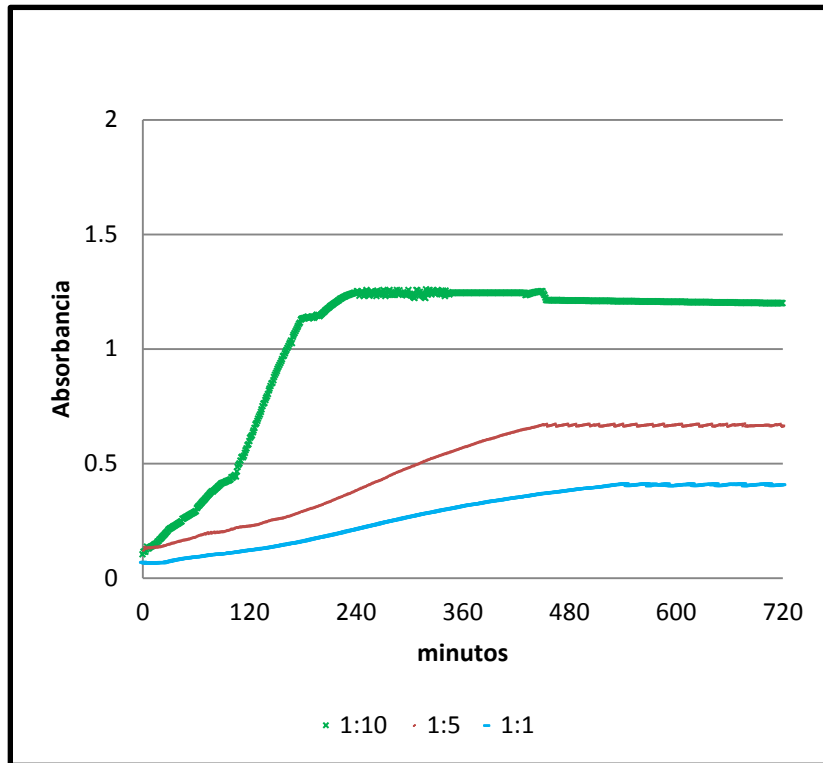


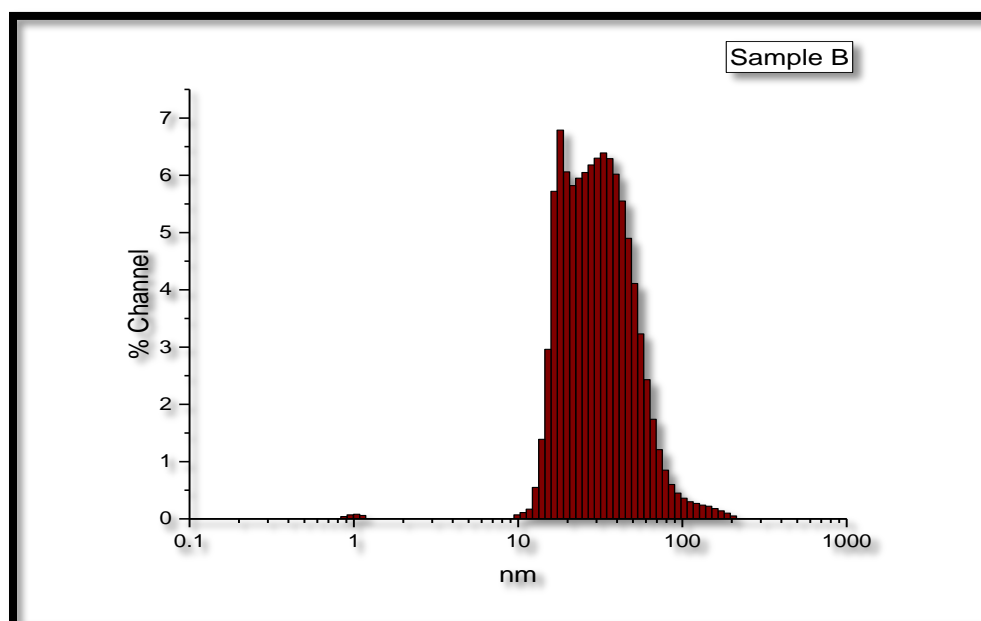
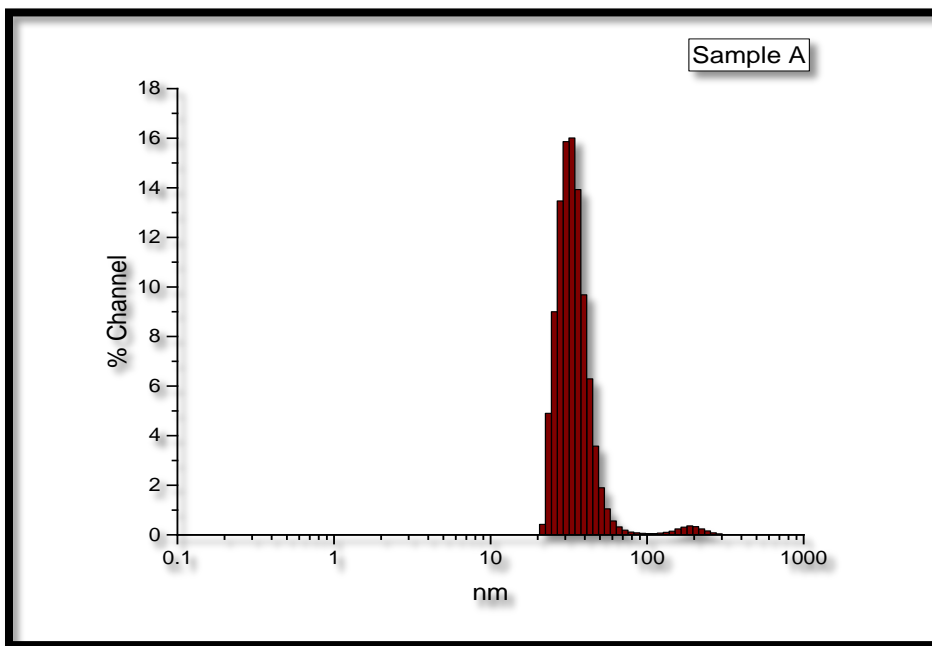
Figura 5-4: Perfiles de absorbancia UV-Vis de la síntesis de AgNPs en función del tiempo

5.3 Caracterización estructural

5.3.1. Espectroscopia por energía dispersiva de rayos-X (EDS) y Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Figura 5-5a muestra la distribución de tamaños de partículas de las AgNPs sintetizadas. Este análisis también señaló la presencia de NPs pequeñas con tamaños desde de 2nm (muestra C) hasta tamaños de 70 nm (muestra A). El aumento de las proporciones de nitrato de plata favorece la reducción de iones de plata que conduce a la agrupación o nanoclusters de AgNPs y la formación de aglomerados más grandes en cada solución. Las imágenes por SEM muestran la morfología / composición de las AgNPs observándose nanopartículas esféricas (Fig. 5-5b). El espectro EDS muestra una intensa presencia de plata (Fig.5-6); Por

otro lado la notable altura del pico de cobre se debe a que las películas de las muestras se prepararon sobre una rejilla de este material. Las imágenes resultantes de los análisis de SEM y DLS son congruentes y confirman que el tamaño de las partículas obtenidas está en el orden nanométrico.



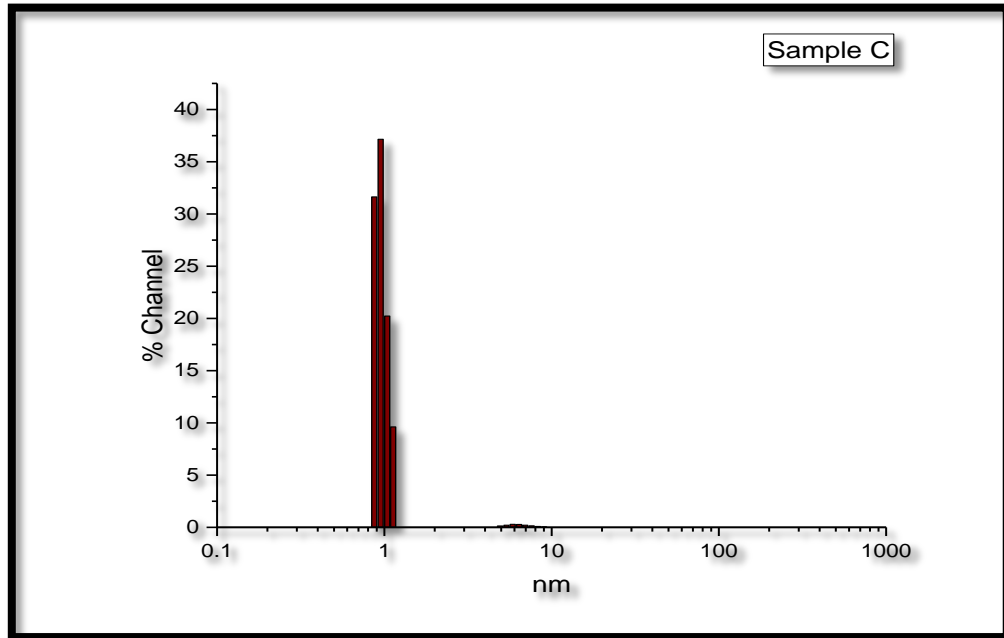


Figura. 5-5a: distribuciones de tamaño en función de la relación fermento:AgNO₃.
Muestras A(1:10), B(1:5), C (1:1).

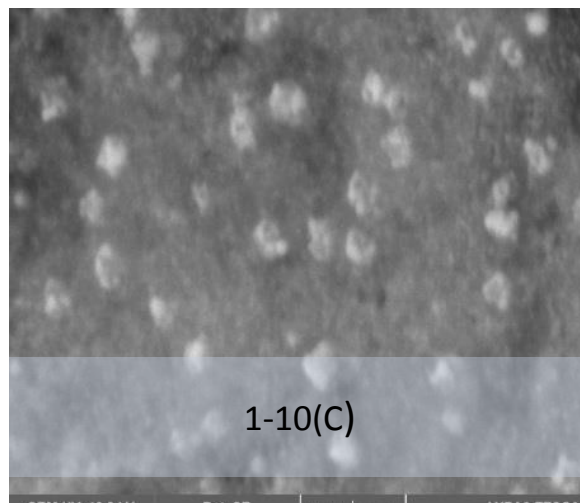
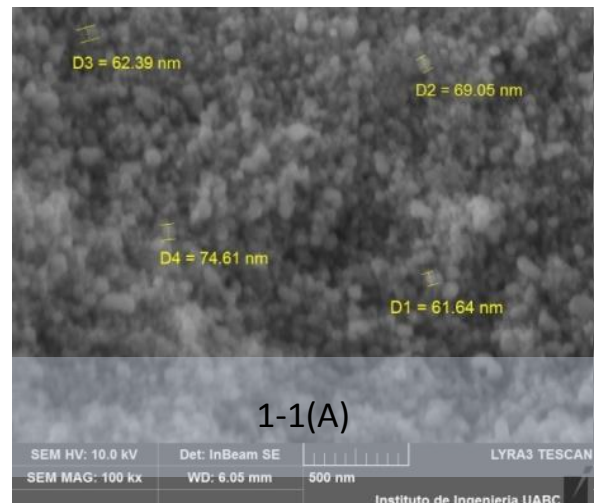
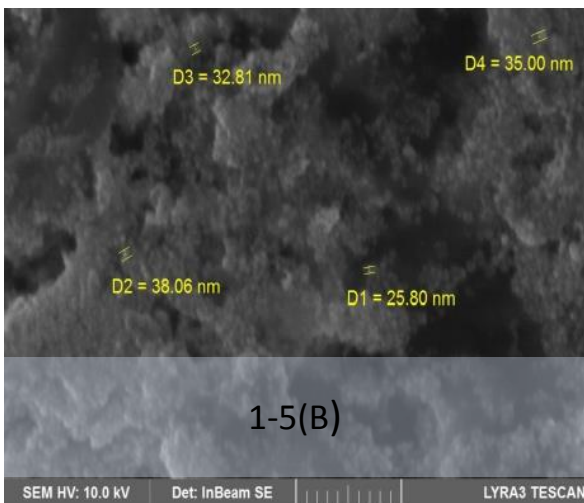


Figura. 5-5b: Imágenes SEM de AgNPs sintetizadas

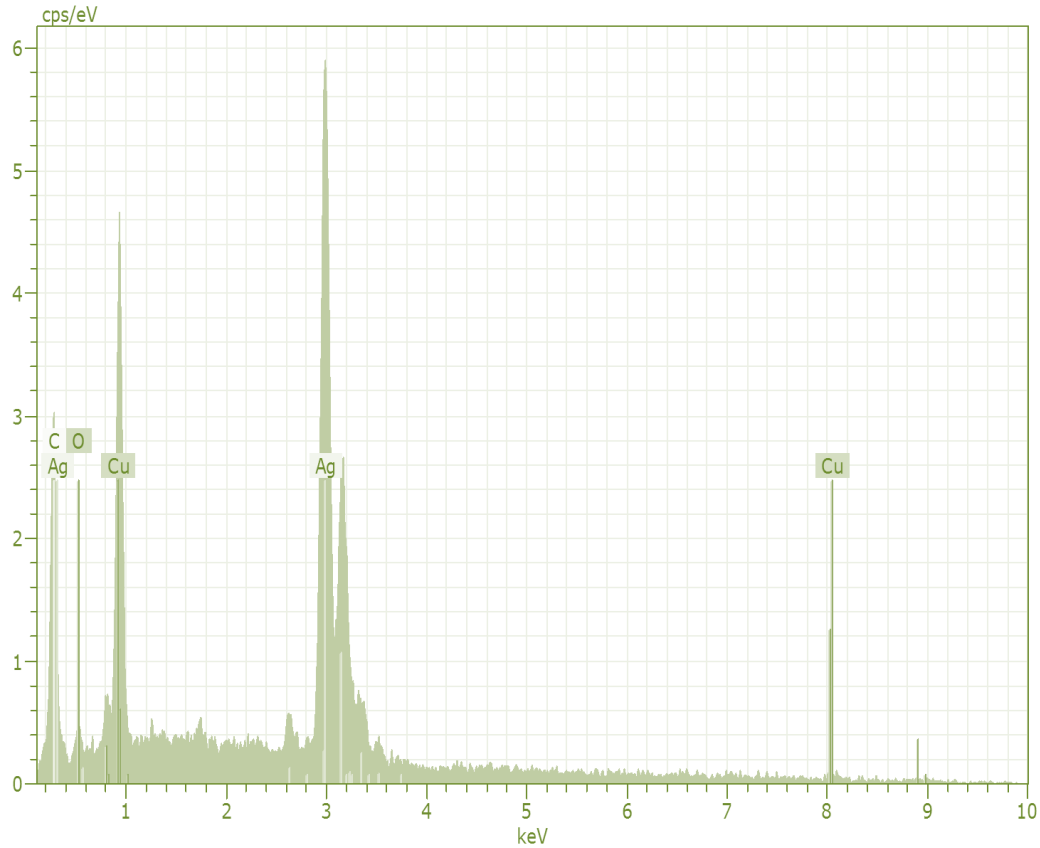


Figura. 5- 6: El espectro EDS confirmó la presencia intensa de plata en las muestras.

5.4 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Un equipo Nanotrak Wave I se utilizó para determinar los tamaños hidrodinámicos por DLS de las AgNPs sintetizadas, así como también la medición del potencial Zeta para conocer su estabilidad coloidal. Las distribuciones del tamaño de partícula se determinaron mediante análisis de 3 ml de muestra (Fig. 5-5a). La muestra C presentó una distribución con tamaños de ~ 3 nm con picos de intensidad de $\sim 38\%$; La muestra B presenta un promedio de 25 nm y una intensidad de $\sim 15\%$; La muestra A presenta tamaños mayores

que las muestras A y C, con 70 nm y ~ 15% de intensidad máxima. Los resultados obtenidos demuestran que la relación de fermento:AgNO₃ tiene un papel importante en el control del crecimiento y tamaño de los AgNPs durante la síntesis verde usando metabolitos secundarios

5.4.1. Potencial Zeta

El potencial zeta y la distribución de tamaños son parámetros importantes porque indican el grado de fuerzas electrostáticas, tales como la solubilidad, la dispersión coloidal, la disolución la velocidad de disolución y la estabilidad física. El potencial Zeta medido fue de -200mV, indicando la estabilidad física de las nanopartículas sintetizado como se muestra en la Tabla 5-1.

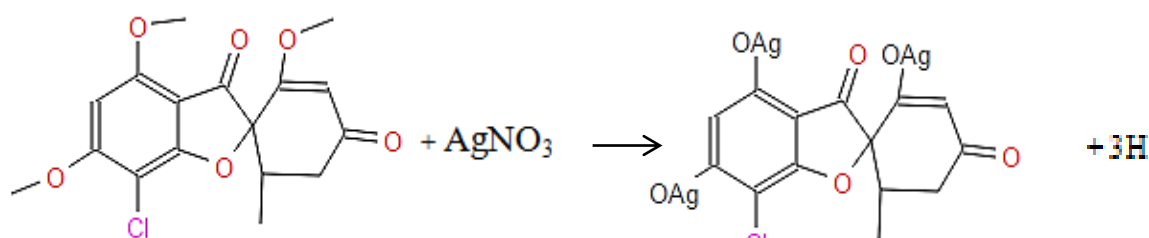
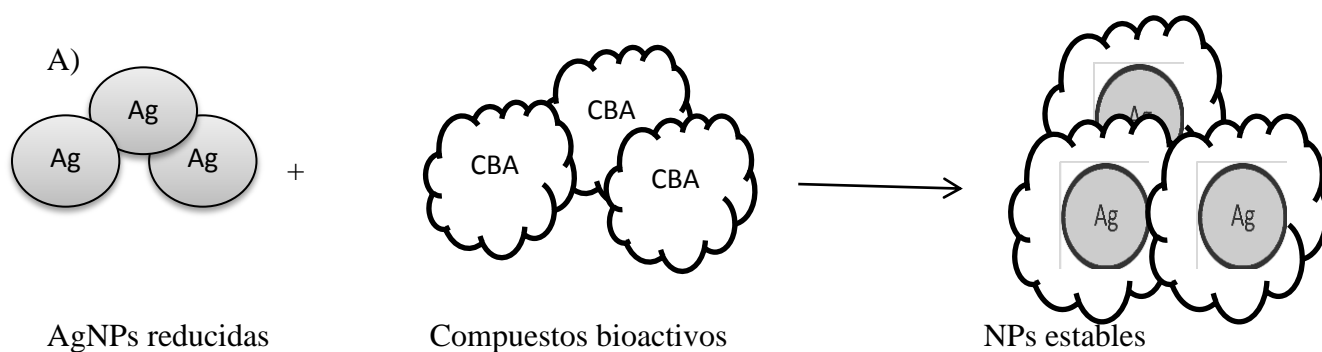
Tabla. 5- 1: Análisis del potencial zeta de los AgNPs sintetizados.

Muestra	Tamaño promedio de la partícula (nm)	Movilidad (u/s/V/Cm)	Carga (fC)	Potencial zeta (mV)	Polaridad	Conductividad (μS/cm)
A	70	-11.81	-0.042	-200	Negative	218
B	25	-11.81	-0.039	-200	Negative	223
C	3	-11.81	-0.001	-200	Negative	228

5.5 Mecanismo propuesto involucrado en la síntesis de AgNPs

Un estudio previo se siembra de fermentos en cajas con medio de cultivo nos señaló la presencia de endófitos en la *Moringa oleifera* tal como se indica en la figura 6-8; coincidiendo con estudios reportados en la literatura [7, 68]. En el fermento de *Moringa oleifera* se identificaron compuestos fenólicos y la presencia del endófito *Nigrospora sp.* capaz de producir metabolitos en el que la griseofulvina es el principal con propiedades

anti- fúngicas tal como sea reportado. Por lo tanto, la hipótesis del mecanismo de reducción de los iones de plata por Griseofulvina es través de una reacción redox (Fig. 5-7). La presencia de iones de plata en el extracto de la planta forma primero un complejo de plata intermedia y luego el óxido en forma ceto con la liberación de electrones libres y iones Ag^+ . Estos iones Ag^+ se reducen para formar plata metálica (Ag^0). Los subproductos producidos durante la reducción reacción son iones nitrato y metabolitos de plantas secundarias que no han reaccionado, que se eliminan durante el lavado del de las AgNPs [2].



B)

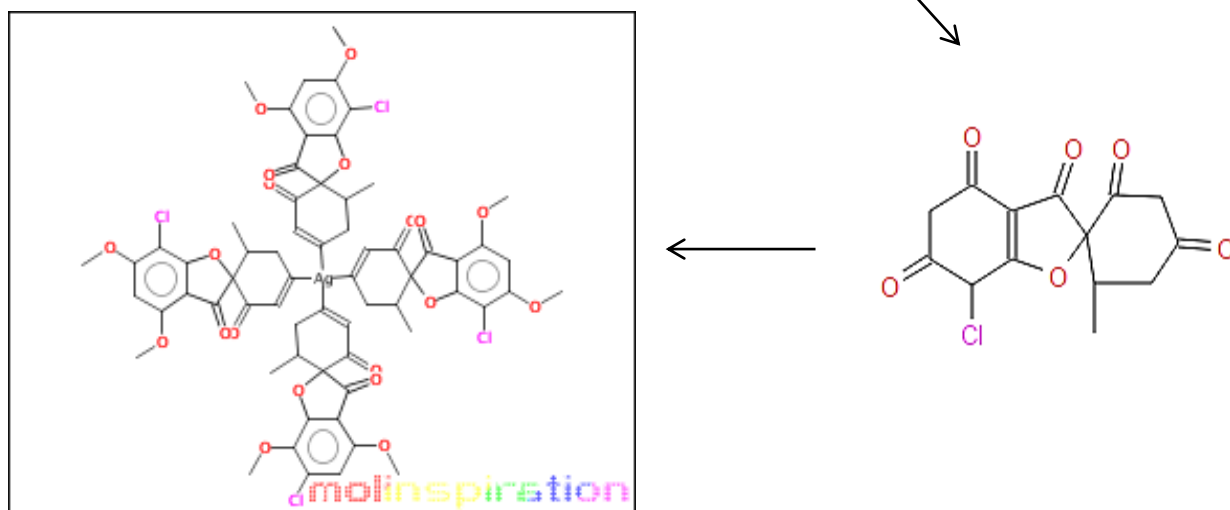


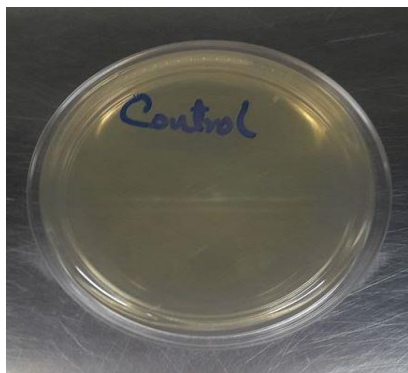
Figura. 5-7: Mecanismo propuesto de síntesis de AgNPs. A) Capping y estabilización de las AgNPs. B) Reducción de Ag^+ a Ag^0 usando la Griseofulvina. Abreviaturas: AgNPs, nanopartículas de plata.

5.6. Medición antibacterial y antifúngica de las nanopartículas de plata en microorganismos patógenos

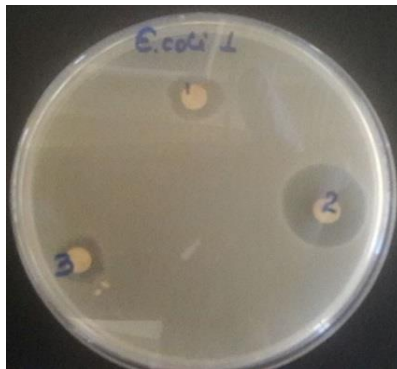
Una vez caracterizadas y separadas del medio de reacción las nanopartículas fueron colocadas en viales y resuspendidas para evaluar sus propiedades antibacterianas (Fig. 5-10). La actividad antimicrobiana se evaluó frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella cloacae*, *Staphylococcus epidermis* y *Candida albicans*, utilizando el método de difusión por disco. La concentración inicial de los cultivos bacterianos se estandarizó a 100 UFC/mL; a partir de dicha suspensión, se tomó 1 mL y se distribuyó de manera homogénea en cajas de Petri 100 x 15 mm. Con la ayuda de una perforadora, se cortaron discos de 5 mm de diámetro, se esterilizaron y se les adicionaron 30 μ L de las AgNPs suspendidas, provenientes de las soluciones A, B y C. Los discos impregnados se colocaron sobre las cajas sembradas y fueron incubados a 37 °C durante 48 horas, a fin de cuantificar el efecto inhibitorio de las AgNPs sintetizadas. La figura 5-9 muestra los halos o zonas de inhibición para cada microorganismo, mientras que en la Tabla 5-2 se especifican los diámetros de los mismos. Se puede apreciar que, para todos los microorganismos evaluados, los mejores resultados de inhibición siguen el orden B>C>A. Las AgNPs se unen a la membrana celular causando cambios en su permeabilidad afectando sus funciones respiratorias. Penetrando en estructuras en el interior de las bacterias alterando y modificando enlaces químicos de los grupos funcionales basados en azufre y fósforo, tales como las cadenas de ADN, también contribuyen al efecto bactericida de los iones Ag^+ que emergen de la superficie de los AgNPs. Las AgNPs interactúan con componentes celulares a través de enlaces covalentes e iónicos. A niveles altos, los metales pueden dañar las membranas celulares, alterar enzimas e interrumpir las funciones celulares.

Tabla. 5- 2: Antibiograma de las AgNPs frente microorganismos patógenos.

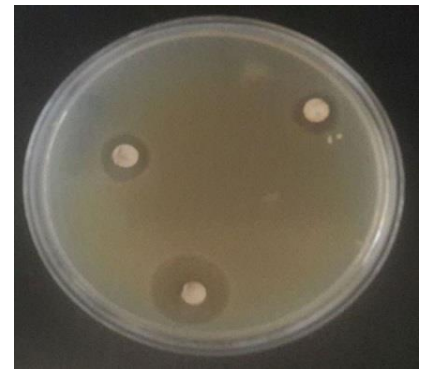
Muestra	Diámetro de la zona de Inhibición (mm)			
	<i>K. cloacae</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
A	8	7	9	8
B	18	19	19.5	18
C	10	9	11	9



(Control)



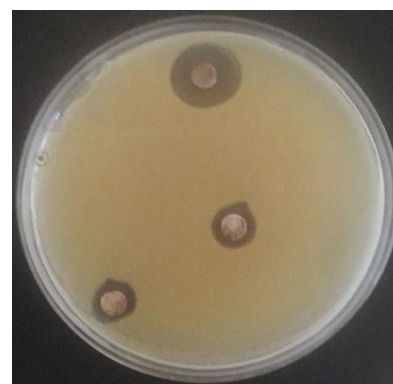
(*E. coli*)



(*C. albicans*)



(*K. cloacae*)



(*S. epidermis*)

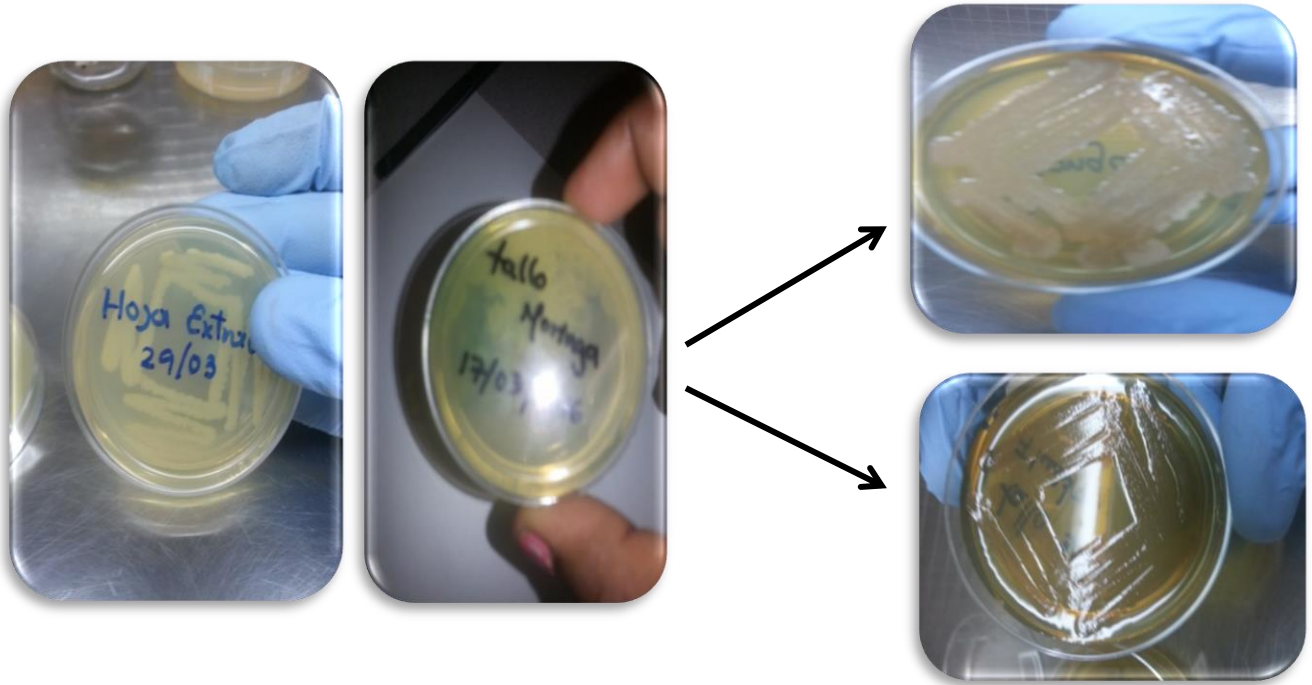


Figura. 5- 9: Estudio microbiológico de endófitas en la Moringa Oleifera.

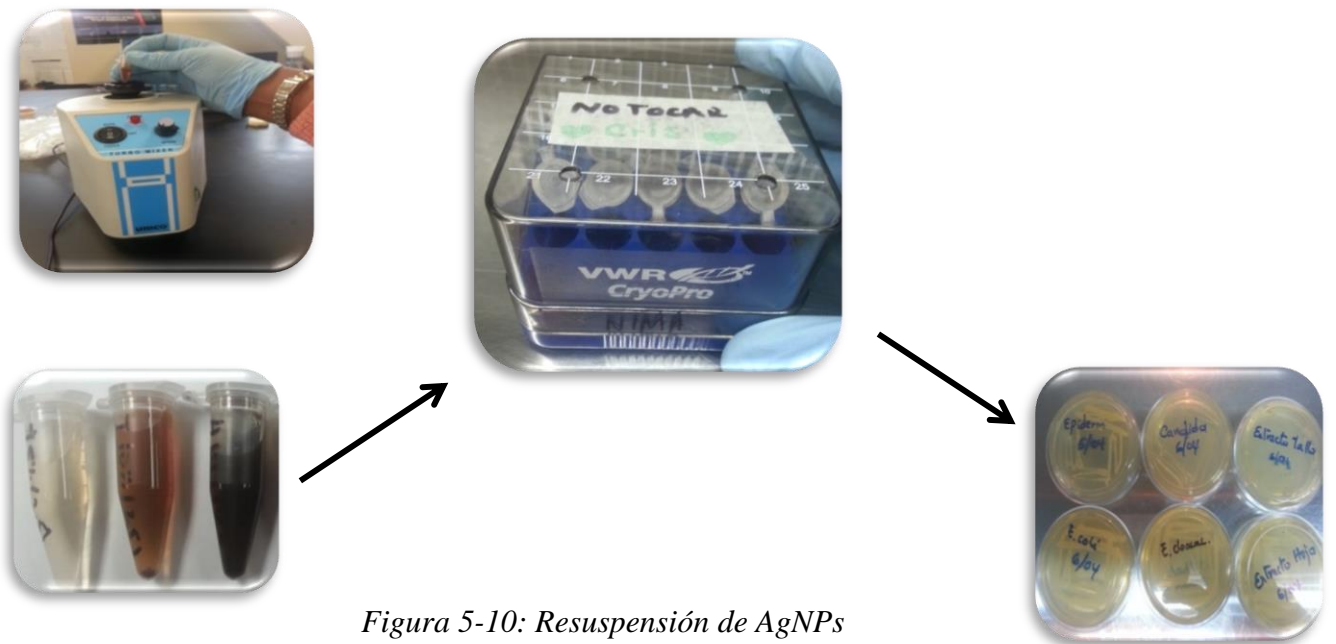


Figura 5-10: Resuspensión de AgNPs

CAPITULO 6

En siguiente capítulo describe las conclusiones obtenidas del proyecto realizado, y recomendaciones futuras con miras a la síntesis óptima de nanopartículas con aplicaciones en el área de biomedicina.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

6.1.1. Síntesis de nanopartículas

De los estudios realizados obtuvimos las siguientes conclusiones:

- Es posible obtener nanopartículas de plata a través de reducción a temperatura ambiente empleando metabolitos del endófito *Nigrospora sp.* presente en el fermento de *Moringa oleífera*.
- La estructura y propiedades AgNPs dependen de la relación fermento:AgNO₃, para el caso de la relación 1:10 las nanopartículas presentaron tamaños más pequeños y tiempos de reacción menores.
- El seguimiento espectrofotométrico las técnicas de caracterización (UV-vis, FTIR, DLS) comprobaron síntesis de AgNPs con picos apreciables en un rango de 400 a 450 nm, estimados por estudios anteriores.
- Se comprobó mediante microscopía electrónica de barrido la topografía y tamaño de AgNPs con tamaños de ~3nm y ~70nm.

6.1.2. Evaluación antibacteriana

En la medición de la actividad antimicrobial de las nanopartículas de evidenció halos de inhibición que presentaron las AgNPs frente a los microorganismos inhibiendo el crecimiento de estos microorganismos comprobando que la concentración y tamaño de las nanopartículas de plata expuestas a la bacteria juega un papel importante, donde a mayores concentraciones de nanopartículas de plata mayor será la sensibilidad de la *E. coli*.

En base a los resultados obtenidos por las caracterizaciones realizadas, se concluyó lo siguiente:

1. Los fitoquímicos presentes en el fermento no sólo actúan como agentes reductores, sino que también estabilizan los AgNPs sintetizados. La estabilidad de las AgNPs se examinó mediante el almacenamiento de las muestras durante 4 meses, y se encontró que las mezclas de reacción mostraron picos a la misma longitud de onda con una intensidad de absorción similar.
2. Para el caso de la relación 1:10 la síntesis se logró en menos de 4 horas con un pico comparativamente estrecho y un tiempo de reducción más corto las gráficas de absorbancia frente al tiempo indican claramente que la formación AgNPs para esta solución tiene un periodo de inducción (nucleación) de un crecimiento. Entonces es posible afectar las propiedades de NPs impulsando las velocidades de los pasos. Los NP formados a través de este mecanismo se denominan partículas primarias de acuerdo con la clasificación en Química coloide. Las mayorías de las reacciones químicas dependen de las concentraciones de los reactivos. A medida que estas sustancias se agotan, las reacciones ocurren de manera más lenta como es el caso de la relación 1:1

3. En el análisis espectrofotométrico se observó sensibilidad por parte de las muestras frente a la excitación SPR a ~ 440 nm y se obtuvieron picos de absorción característicos de las AgNPs en función de la relación fermento:AgNO₃. La absorbancia aumenta a medida que disminuye el tamaño de las nanopartículas debido a que más Ag⁺ están disponibles para la interacción con biomoléculas del fermento. El análisis FTIR identificó grupos funcionales responsables de la reducción de las partículas identificando la griseofulvina como metabolito con mayor participación en la interacción con los iones Ag.

4. En la caracterización se confirmó que cuando aumenta la relación fermento:AgNO₃ se presentan aglomerados compactos de alta densidad de partículas de plata como el caso de la relación 1:1; señalando que las partículas estaban definidas en forma esférica y con dimensiones desde 3 nm. El análisis EDS de las AgNPs de la figura 5-6 señaló los componentes elementales luego de la síntesis mostrando pico intenso de plata lo que nos confirmó que la síntesis y separación del medio de reacción de las nanopartículas se llevó a cabo de manera efectiva.

5. Las AgNPs demostraron propiedades antibacterianas y anti fúngicas frente a microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella cloacae*, *Staphylococcus epidermis* y *Candida albicans*, siendo la solución B (1:5) la de mayor efectividad. Estos resultados son congruentes en comparación con antibiogramas reportados con antibióticos de referencia [27].

6. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

- ✓ Las siguientes son recomendaciones para futuras investigaciones en la misma línea de investigación proyecto para optimización y oportunidades de mejora:
- ✓ Realizar la síntesis modificando las condiciones ambientales de temperatura estudiando el efecto cinético de la reacción y morfología de las nanopartículas obtenidas.
- ✓ Determinar la concentración de AgNPs tomando la ruta del NO_3
- ✓ Realizar un análisis microestructural mediante TEM de las AgNPs, con el propósito de elucidar la estructura cristalina y complementar la información obtenida sobre la composición estructural de las nanopartículas, así como determinar su densidad y distribución espacial
- ✓ Comprobar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas utilizando un antibiótico de referencia comparar los resultados con los obtenidos en esta investigación. Además, probar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas en otros microorganismos patógenos.

Tomando en cuenta las propuestas anteriores, se espera que este proyecto desarrollado contribuya al desarrollo de nuevas vías de síntesis utilizando metabolitos secundarios como potenciadores de síntesis y posibles candidatos de estabilización de AgNPs en aplicaciones biomédicas.

ANEXOS

PRODUCTOS OBTENIDOS DURANTE LA FORMACION

<i>Redacción de Artículo como 1er autor</i>	E. C. Arrieta <i>et al.</i> , "Silver nanoparticles biosynthesized by secondary metabolites from Moringa oleifera stem and their antimicrobial properties," <i>African Journal of Biotechnology</i> , vol. 16, no. 9, pp. 400-407, 2017.
<i>Asistencia a congreso</i>	Amidiq 2017
Cursos certificados	D001x: Medicinal Chemistry: The Molecular: Basis of Drug Discovery
Capacitación sobre publicaciones	Springer.

AMIDIQ

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.
La Ingeniería Química en el Desarrollo Sostenible de Nuevos Procesos y Productos

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

ERIC CRISTINA ARRIETA PEREZ, BENJAMIN VALDEZ SALAS, MONICA CARRILLO BELTRAN

Por la presentación del trabajo:

SÍNTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA MEDIADA POR METABOLITOS SECUNDARIOS
PRESENTES EN LA HOJA DE MORINGA OLEIFERA. EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA

Id: 72

XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Ixtapa Zihuatanejo, Gro., México, del 9 al 12 de mayo de 2017


Dr. Mauricio Sales Cruz
PRESIDENTE DE AMIDIQ




Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

VERIFIED

CERTIFICATE of ACHIEVEMENT



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Wendy E. Raymond".

Wendy E. Raymond, Ph.D

Vice President for Academic Affairs and Dean of Faculty

Davidson College

This is to certify that

ERIC CRISTINA ARRIETA PEREZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Erland Stevens".

Erland Stevens, Ph.D

Professor and Chair of Chemistry

Davidson College

successfully completed and received a passing grade in

D001x: Medicinal Chemistry: The Molecular Basis of Drug Discovery

a course of study offered by DavidsonX, an online learning initiative of Davidson College through edX.

VERIFIED CERTIFICATE
Issued 27 de May, 2016

VALID CERTIFICATE ID
[2fd752e1aada4c90864fd8b860e0a1f1](#)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
VICERRECTORÍA - CAMPUS MEXICALI
Departamento de Información Académica

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: Eric Cristina Arrieta Pérez

POR SU PARTICIPACIÓN EN EL CURSO TALLER

“Springer”

CON UNA DURACIÓN DE 2 HORAS.

Impartido el 13 de octubre

Mexicali, B. Cfa., 13 de octubre del 2015

“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



Jefe de Oficina Biblioteca Central

VICERRECTORÍA CAMPUS MEXICALI
DEPTO. DE INFORMACIÓN
ACADÉMICA

Lic. Ruperto Espinoza Moreno

REFERENCIAS

- [1] L. A. R. Mendoza, A. S. Galindo, L. L. López, and A. O. C. Facio, "Nanomateriales Poliméricos Acrílicos Basados en Grafeno y NTCs Acrylic Polymer Nanomaterials Based on Graphene and NTCs," *Revista Científica*, vol. 6, no. 12, 2014.
- [2] S. Ahmed, M. Ahmad, B. L. Swami, and S. Ikram, "A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise," (in English), *Journal of Advanced Research*, Review vol. 7, no. 1, pp. 17-28, Jan 2016.
- [3] P. Kuppusamy, M. M. Yusoff, G. P. Maniam, and N. Govindan, "Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications—An updated report," *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2014.
- [4] O. Awodele, I. A. Oreagba, S. Odoma, J. A. Teixeira da Silva, and V. O. Osunkalu, "Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 139, no. 2, pp. 330-336, 1/31/2012.
- [5] A. P. Chaparro Pedraza, "Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SGP 321 de *Mucor circinelloides* y evaluación de su actividad antimicrobiana," Facultad de Ciencias, 2010.
- [6] M. E. Olson and J. W. Fahey, "Moringa oleifera: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas," *Revista mexicana de biodiversidad*, vol. 82, no. 4, pp. 1071-1082, 2011.
- [7] J. Zhao, Y. Zhang, L. Wang, J. Wang, and C. Zhang, "Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam.," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, no. 5, pp. 2107-2112, 2012.

- [8] D. García, "Los metabolitos secundarios de las especies vegetales," *Pastos y Forrajes*, vol. 27, no. 1, 2004.
- [9] K. N. Thakkar, S. S. Mhatre, and R. Y. Parikh, "Biological synthesis of metallic nanoparticles," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 6, no. 2, pp. 257-262, 2010.
- [10] E. R. Reyna, B. V. Salas, M. C. Beltrán, N. Nedev, M. C. Alvarez, and E. V. Salas, "Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles Biosynthesized from *Staphylococcus Aureus*."
- [11] B. Bhushan, "Introduction to nanotechnology," in *Springer handbook of nanotechnology*: Springer, 2010, pp. 1-13.
- [12] J. Suarez-Cerda, G. Alonso-Nunez, H. Espinoza-Gomez, and L. Z. Flores-Lopez, "Synthesis, kinetics and photocatalytic study of "ultra-small" Ag-NPs obtained by a green chemistry method using an extract of Rosa 'Andeli' double delight petals," (in English), *Journal of Colloid and Interface Science*, Article vol. 458, pp. 169-177, Nov 2015.
- [13] A. A. Ghazwani, "Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani*," *African Journal of Biotechnology*, vol. 14, no. 26, pp. 2170-2174, 2015.
- [14] S. D. Caruthers, S. A. Wickline, and G. M. Lanza, "Nanotechnological applications in medicine," *Current opinion in Biotechnology*, vol. 18, no. 1, pp. 26-30, 2007.
- [15] F. Bartolomé *et al.*, *Nuevos materiales en la sociedad del siglo XXI*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España), 2007.
- [16] E. Castillo, *Extreme value theory in engineering*. Elsevier, 2012.
- [17] S. Gurunathan *et al.*, "Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 74, no. 1, pp. 328-335, 2009.
- [18] J. S. Kim *et al.*, "Antimicrobial effects of silver nanoparticles," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 3, no. 1, pp. 95-101, 2007.
- [19] M. J. Hajipour *et al.*, "Antibacterial properties of nanoparticles," *Trends in biotechnology*, vol. 30, no. 10, pp. 499-511, 2012.

- [20] J. T. Seil and T. J. Webster, "Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature," *Int J Nanomedicine*, vol. 7, pp. 2767-2781, 2012.
- [21] S. Anjum and B. H. Abbasi, "Biomimetic synthesis of antimicrobial silver nanoparticles using in vitro-propagated plantlets of a medicinally important endangered species: *Phlomis bracteosa*," *International journal of nanomedicine*, vol. 11, p. 1663, 2016.
- [22] N. Cioffi and M. Rai, *Nano-antimicrobials: progress and prospects*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [23] E. Martínez, T. Cantillo, and D. García, "Micobiota asociada a lotes importados de semillas de moringa (*Moringa oleifera*)," *Fitosanidad*, 2013.
- [24] V. Dhand, L. Soumya, S. Bharadwaj, S. Chakra, D. Bhatt, and B. Sreedhar, "Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 58, pp. 36-43, 2016.
- [25] R. G. Singh, P. S. Negi, and C. Radha, "Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour," *Journal of functional foods*, vol. 5, no. 4, pp. 1883-1891, 2013.
- [26] N. C. Alfaro and W. Martínez, "Uso potencial de la moringa (*Moringa oleifera*, Lam) para la producción de alimentos nutricionalmente mejorados," *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT), Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACYT), Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Guatemala*, 2008.
- [27] T. Prasad and E. Elumalai, "Biofabrication of Ag nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and their antimicrobial activity," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 1, no. 6, pp. 439-442, 2011.
- [28] G. Schmid, *Nanoparticles: from theory to application*. John Wiley & Sons, 2011.
- [29] L.-S. Wang *et al.*, "Synthesis and anti-fungal effect of silver nanoparticles–chitosan composite particles," *International journal of nanomedicine*, vol. 10, p. 2685, 2015.
- [30] M. Villanueva-Ibáñez, M. Yañez-Cruz, R. Álvarez-García, M. Hernández-Pérez, and M. Flores-González, "Aqueous corn husk extract–mediated green synthesis of AgCl and Ag nanoparticles," *Materials Letters*, vol. 152, pp. 166-169, 2015.

- [31] V. K. Sharma, R. A. Yngard, and Y. Lin, "Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities," *Advances in colloid and interface science*, vol. 145, no. 1, pp. 83-96, 2009.
- [32] C. GOMEZ-ALEIXANDRE, O. SANCHEZ, L. VAZQUEZ, and J. ALBELLA, "Obtención de materiales cerámicos por deposición química en fase de vapor (CVD)," *BOL. SOC. ESP. CERAM. VIDR*, vol. 30, no. 5, pp. 325-328, 1991.
- [33] J. Morales, J. Morán, M. Quintana, and W. Estrada, "Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta sol-gel a partir de nitrato de plata," *Revista de la Sociedad Química del Perú*, vol. 75, no. 2, pp. 177-184, 2009.
- [34] R. Zanella, "Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño," *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, vol. 5, no. 1, 2012.
- [35] B. Altava, M. I. Burguete, and S. V. Luis, "Educación cooperativa en Química Verde: la experiencia española," *Educación Química*, vol. 24, Supplement 1, pp. 132-138, 3// 2013.
- [36] N. Saifuddin, C. Wong, and A. Yasumira, "Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation," *Journal of Chemistry*, vol. 6, no. 1, pp. 61-70, 2009.
- [37] J. A. Parrotta, *Moringa Oleifera Lam: Resedá, Horseradish Tree, Moringaceae, Horseradish-tree Family*. International Institute of Tropical Forestry, US Department of Agriculture, Forest Service, 1993.
- [38] O. S. Bello, K. A. Adegoke, and O. O. Akinyunni, "Preparation and characterization of a novel adsorbent from Moringa oleifera leaf," *Applied Water Science*, pp. 1-11, 2015.
- [39] V. M. Cornejo Sánchez and S. E. Paredes Acevedo, "Evaluación de bloques multinutricionales con tres niveles de follaje de terebinto (*Moringa oleifera*) como fuente proteica, en el desempeño reproductivo de conejas de la raza Neozelandés," Universidad de El Salvador, 2011.
- [40] K. Elumalai, S. Velmurugan, S. Ravi, V. Kathiravan, and S. Ashokkumar, "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and

- evaluation of its antimicrobial activity," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 143, pp. 158-164, 2015.
- [41] W. Nouman, F. Anwar, T. Gull, A. Newton, E. Rosa, and R. Domínguez-Perles, "Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* Lam," *Industrial Crops and Products*, vol. 83, pp. 166-176, 5// 2016.
- [42] C. Makita, L. Chimuka, P. Steenkamp, E. Cukrowska, and E. Madala, "Comparative analyses of flavonoid content in *Moringa oleifera* and *Moringa ovalifolia* with the aid of UHPLC-qTOF-MS fingerprinting," *South African Journal of Botany*, vol. 105, pp. 116-122, 7// 2016.
- [43] L. Gopalakrishnan, K. Doriya, and D. S. Kumar, "Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application," *Food Science and Human Wellness*, vol. 5, no. 2, pp. 49-56, 6// 2016.
- [44] R. Elvira Sánchez-Fernández *et al.*, "Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina," *TIP*, vol. 16, no. 2, pp. 132-146, // 2013.
- [45] A. Starratt and S. Loschiavo, "The production of aphidicolin by *Nigrospora sphaerica*," *Canadian journal of microbiology*, vol. 20, no. 3, pp. 416-417, 1974.
- [46] C. G. Friedrich, "Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria," *Advances in microbial physiology*, vol. 39, pp. 235-289, 1997.
- [47] V. Kumar, A. Abbas, N. Fausto, and J. Aster, "Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury, and death," *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania*, pp. 3-42, 2010.
- [48] P. Owen, "Biotecnología de la Fermentación. Editorial Acribia," *Zaragoza, España*, 1991.
- [49] S. De Baets, S. Vandedrinc, and E. Vandamme, "Vitamins and Related Biofactors, Microbial Production," in *Encyclopedia of Microbiology, 2nd ed.;*(Ed. J. Lederberg); *Vol 4; Academic Press, USA, 2000, 2000*, pp. 837-853.
- [50] R. Valdés and M. I. Balbín, "Curso de fisiología y bioquímica vegetal," *La Habana, Cuba: Universidad Nacional de Ciencias Agrarias de la Habana*, 2000.

- [51] W. R. Strohl, "Industrial antibiotics: today and the future," *Drugs and the pharmaceutical sciences*, vol. 82, pp. 1-47, 1997.
- [52] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*. Thomson Brooks/Cole, 2007.
- [53] M. A. Acuna and G. E. Murphy, "Uso de espectroscopia infrarroja y análisis multivariado para predecir la densidad de la madera de pino oregón," *Bosque (Valdivia)*, vol. 28, no. 3, pp. 187-197, 2007.
- [54] L. Shi, "Zinc phosphating on 6061-T6 aluminum alloy," University of British Columbia, 2000.
- [55] J. E. Tibaquirá, J. Moran, T. Otanicar, and J. D. Posner, "Mediciones de potencial zeta de microesferas de vidrio en glicol de etileno y en soluciones tampón de fosfato," *Scientia et technica*, vol. 1, no. 35, 2007.
- [56] A. Abdelmoteleb *et al.*, "Silver nanoparticles from *Prosopis glandulosa* and their potential application as biocontrol of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Bacillus cereus*," *Chemical Speciation & Bioavailability*, vol. 29, no. 1, pp. 1-5, 2016.
- [57] N. M. M. Arias, A. L. S. Pérez, S. L. C. Ricalde, and J. M. S. Yáñez, "Los MICROORGANISMOS," 2005.
- [58] B. S. Drasar and M. J. Hill, *Human intestinal flora*. Academic Press (London) Ltd., 24/28 Oval Road, London, NW1, 1974.
- [59] J. P. Nataro and J. B. Kaper, "Diarrheagenic *Escherichia coli*," *Clinical microbiology reviews*, vol. 11, no. 1, pp. 142-201, 1998.
- [60] R. Calderón *et al.*, "Caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido tipo SHV-5 en una unidad de cuidados intensivos neonatal de Lima," *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol. 20, no. 3, pp. 121-127, 2003.
- [61] S. Fraser, M. Arnett, and C. Sinave, "Enterobacter infections," *J. WebM D*, vol. 7, pp. 114-120, 2010.
- [62] E. PELÁEZ *et al.*, "Brote epidémico de bacteriemias por bacilos gram-negativos (BNG), especialmente *Enterobacter cloacae*, en una unidad de hemodiálisis, en pacientes portadores de catéteres permanentes tunelizados," *Nefrología*, vol. 23, no. 4, pp. 333-43, 2003.

- [63] R. Tato-Rodríguez *et al.*, "Brote de *Enterobacter cloacae* complex multirresistente productor de CTX-M-9 en una unidad de cuidados intensivos," *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 34, no. 4, pp. 237-242, 2016.
- [64] C. Garcia Apac, J. Pardo Valdespino, and C. Seas Ramos, "Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: Reporte de un caso," *Revista Medica Herediana*, vol. 14, no. 4, pp. 221-223, 2003.
- [65] M. Perurena, Y. Torres, R. Díaz, C. Fernández, G. Martínez, and M. T. Illnait, "Caracterización de cepas de *Candida Albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes de Sida. Resumen," *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, vol. 4, no. 5, 2005.
- [66] V. R. Netala *et al.*, "Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities," (in English), *International Journal of Nanomedicine*, Article vol. 11, pp. 5683-5696, 2016.
- [67] F. Ascencio, J. Rius, C. Zorrilla, R. Herrera, and D. México, "Síntesis y Estabilización de Nanopartículas de Plata y Óxidos de Plata Reducidas con Acido Tánico," *Acta Microscopica*, 2011.
- [68] E. C. Arrieta *et al.*, "Silver nanoparticles biosynthesized by secondary metabolites from *Moringa oleifera* stem and their antimicrobial properties," *African Journal of Biotechnology*, vol. 16, no. 9, pp. 400-407, 2017.