

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**SÍNTESIS VERDE Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS EXTRAÍDOS DE BUGAMBILIA
FUNCIONALIZADOS CON NANOPARTÍCULAS**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN INGENIERÍA

PRESENTA

LORENA VANESSA BOLAÑOS SAENZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. BENJAMIN VALDEZ SALAS

CODIRECTOR DE TESIS

DR. ERNESTO ALONSO BELTRÁN PARTIDA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

AGRADECIMIENTOS

A Dios por llenarme de fe, sabiduría y fortaleza durante mi maestría y estancia en un nuevo país.

A mis padres y mi hermano, por ser mi ancla en todo momento, por acompañarme a la distancia y motivarme cada día a seguir con mis sueños.

A mi familia, porque cada uno de ellos aportó a mi crecimiento personal y profesional, gracias por ser mi apoyo y brindarme palabras de aliento.

A mi novio, por ser mi apoyo en cada paso que doy y por motivarme siempre a cumplir mis metas.

A los amigos que hice en este nuevo país, gracias porque todos aportaron a mi crecimiento académico y personal.

A los Doctores del Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, en especial al Dr. Benjamín Valdez por abrirme las puertas en su laboratorio y darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrados, y por acogerme muy bien durante mi periodo de maestría.

Al CONACYT, por apoyarme durante dos años con la beca de maestría con el objetivo de cursar mis estudios en buenas condiciones.

Y, por último, y no menos importante, a mí misma, por no rendirme y seguir a pesar de algunas dificultades, por siempre tener claro mis objetivos y por aquello que me motiva a seguir con lo que me apasiona.

Y recuerden, que ningún soñador es pequeño y ningún sueño es demasiado grande.

Gracias a Dios por permitirme cumplir una meta más.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación se centró en la síntesis verde y evaluación microbiológica de los metabolitos secundarios del extracto acuoso de *Bugambilia* funcionalizados con nanopartículas de plata y óxido de cobre. Para la obtención de las nanopartículas, se desarrolló una ruta de síntesis verde en medio acuoso implementando extractos de *Bugambilia glabra roja*, una planta nativa de climas tropicales que se encuentra en países de Suramérica y Centro América, como es el caso de México. Esta especie contiene una variedad de metabolitos secundarios capaces de actuar como agentes reductores y estabilizadores de reacción; ya que están compuestos por grupos funcionales calificados como donadores o aceptores de electrones debido a su reactividad química. Logrando una interacción metal-metabolito permitiendo que el compuesto orgánico acapare al metal alrededor de su superficie formando así las nanopartículas estabilizadas.

Se empleó una metodología basada en dos procesos diferentes para cada precursor de los metales, para el caso de la plata, se implementó solo 10 mL de AgNO_3 y 0.05 mL de extracto acuoso de *Bugambilia glabra* a temperatura ambiente y agitación constante, mientras que ($\text{Cu}_x\text{O-NPs}$), se partió de 10 mL del precursor de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, agregando 0.05 mL de extracto de la planta, y Tween-80 como estabilizador de las nanopartículas. Una vez sintetizados los nanomateriales, se caracterizaron por medio de espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR), espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis), dispersión de luz dinámica (DLS), microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDX). El espectro UV-Vis de la solución de nanopartículas de plata mostró la presencia del metal con un pico en aproximadamente en 475 nm. Además, se evidenciaron tamaños, estabilidad coloidal (Potencial Zeta) y morfologías esféricas homogéneas con valores entre 7.88 nm a 70 nm, y potencial Z entre 38 mV a 92.4 mV. Por otro lado, la síntesis de nanopartículas de óxido de cobre conllevó a la oxidación del metal debido a la presencia de oxígeno en el ambiente, después de la reducción con el extracto de la *Bugambilia*, se agregó Tween-80 para aumentar la estabilidad coloidal de la solución. Los resultados de las caracterizaciones mostraron una señal en el espectro UV-Vis en

aproximadamente 247 nm, particular del óxido de cobre. Además, manifestaron tamaños entre 47 nm a 90 nm, con morfología esférica e irregular debido a la formación de clústers. Sin embargo, lograron una estabilidad con un potencial Zeta mayor a 50 mV. Estos nanomateriales fueron evaluados contra cepas bacterianas de *Escherichia coli* (E. coli) y *Staphylococcus aureus* (S. aureus), mostrando una mayor inhibición para las nanopartículas de óxido de cobre con valores entre 20 mm a 30 mm, mientras que las nanopartículas de plata obtuvieron halos de inhibición entre 13 mm a 15 mm, lo cual corrobora lo estipulado en la literatura científica, sobre las excelentes propiedades antibacterianas que presenta el cobre frente a microorganismos. En el caso de las nanopartículas de óxido de cobre, se ha reportado que tienden a generar especies reactivas (ROS) que provocan los daños celulares, alteraciones en el ADN, oxidación de las proteínas, entre otros.

ABSTRACT

The goals of this research were focused on the green synthesis and microbiological evaluation of the secondary metabolites of the aqueous extract of *Bugambilia* functionalized with nanoparticles of silver and copper oxide. To obtain the nanoparticles, a green synthesis route was developed in an aqueous medium, implementing extracts from *Bugambilia glabra* red, a native tropical plant found in South and Central American countries, such as Mexico. This species contains a variety of secondary metabolites capable of acting as reducing agents and reaction stabilizers, since they are composed of functional groups acting as electron donors or acceptors due to their chemical reactivity. Achieving a metal-metabolite interaction allows the organic compound to accumulate metal around its surface, thus forming stabilized nanoparticles.

A methodology based on two different processes was used for each metal precursor, in the case of silver, only 10 mL of AgNO₃ and 0.05 mL of aqueous extract of *Bugambilia glabra* were used at room temperature and constant agitation, while (Cu_xO-NPs), were synthesized starting with 10 mL of the CuSO₄·5H₂O precursor, adding 0.05 mL of plant extract, and Tween-80 as a stabilizer for the nanoparticles. Once the nanomaterials were synthesized, they were characterized by means of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), visible

ultraviolet spectroscopy (UV-Vis), dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The UV-Vis spectra of the silver nanoparticle solution showed the presence of the metal with a peak at approximately 475 nm. In addition, sizes, colloidal stability (Zeta Potential) and homogeneous spherical morphologies with size characteristics between 7.88 nm to 70 nm, and Z potential from 38 mV to 92.4 mV were obtained. On the other hand, the synthesis of copper oxide nanoparticles led to oxidation of the metal due to presence of oxygen in the environment, after reduction with the Bugambilia extract, Tween-80 was added to increase the colloidal stability of the solution. The results of the characterizations showed a signal in the UV-Vis spectrum at approximately 247 nm, characteristic for copper oxide. In addition, nanostructures with sizes between 47 nm to 90 nm were obtained, with spherical and irregular morphology due to the formation of clusters. In addition, they presented good stability with a Zeta potential greater than 50 mV. These nanomaterials were evaluated against bacterial strains of *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), showing greater inhibition for copper oxide nanoparticles with values between 20 mm and 30 mm, while silver nanoparticles obtained inhibition halos between 13 mm and 15 mm, which corroborates what is stipulated in the scientific literature, on the excellent antibacterial property of copper against microorganisms. In the case of copper oxide nanoparticles, it has been reported that they tend to generate reactive species (ROS) that cause cell damage, DNA alterations, protein oxidation, among others.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
Índice de Figuras.....	9
Índice de Gráficas	10
Índice de Tablas	10
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Introducción.....	12
1.2. Planteamiento del problema	13
1.3. Justificación	14
1.4. Hipótesis	14
1.5. Objetivos.....	15
1.5.1. Objetivo general	15
1.5.2. Objetivos específicos.....	15
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....	16
2.1. Fundamentos de síntesis verde	16
2.1.2. Ejemplos de síntesis química convencional y síntesis verde	18
2.2. La <i>Bugambilia Glabra</i>	19
2.2.1. Metabolitos secundarios y sus propiedades biológicas.....	20
2.2.2. Extracción, caracterización y aplicaciones de los productos naturales	22
2.3. Técnicas de caracterización para metabolitos secundarios.....	24
2.3.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	24
2.3.2. Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectroscopia de masas (UHPLC-MS)	25
2.3.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN):.....	27
2.4. Síntesis verde de nanopartículas	28
2.4.1. Síntesis verde de nanopartículas de plata (Ag-NPs)	30
2.4.2. Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre (Cu _x O-NPs).....	31
2.5. Técnicas de caracterización para NPs	32
2.5.1. Espectroscopia ultravioleta visible (UV-VIS)	32
2.5.2. Dispersión de luz dinámica (DLS)	33
2.5.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	34

2.5.4. Espectroscopia de rayos-X de energía dispersiva (EDS).....	35
2.5.5. Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	36
2.6. Análisis microbiológico.....	37
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	40
3.1. Extracción e identificación de metabolitos secundarios.....	40
3.1.1. Preparación de extractos de <i>Bugambilia</i>	40
3.1.2. Pruebas cualitativas.	41
3.1.3. Separación y purificación de los metabolitos secundarios de la <i>Bugambilia</i>	49
3.2. Síntesis verde de NPs	53
3.2.1. Síntesis verde de Ag-NPs.....	53
3.2.2. Síntesis verde de Cu _x O-NPs	55
3.3. Caracterización de los extractos de <i>Bugambilia glabra</i> y Ag-NPs y Cu _x O-NPs.....	56
3.3.1. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)	56
3.3.2. Espectroscopia UV-Vis.....	56
3.3.3. Dispersión de luz dinámica (DLS)	56
3.3.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	57
3.3.5. Espectroscopia de rayos-X de energía dispersiva (EDS).....	57
3.4. Análisis microbiológicos de Ag-NPs y Cu _x O-NPs a través de síntesis verde de extractos de <i>Bugambilia</i>	57
3.4.1. Metodología para la preparación de las muestras para difusión en agar.....	58
CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	60
4.1. Identificación de los metabolitos secundarios de la <i>Bugambilia</i>	60
4.1.1. Pruebas Cualitativas	60
4.1.2. Obtención de metabolitos secundarios por purificación.....	64
4.1.3. Caracterización por FT-IR de los metabolitos secundarios de la <i>Bugambilia glabra</i> ...	65
4.2. Caracterización de las Ag-NPs y Cu _x O-NPs.....	70
4.2.2. UV-Vis	70
4.2.2.1 UV-Vis de las Ag-NPs	70
4.2.2.2. UV-Vis de las Cu _x O-NPs	72
4.2.3.1. FT-IR de las Ag-NPs	74
4.2.3.1. FT-IR de las Cu _x O-NPs.	75
4.2.4.1. DLS de las Ag-NPs	77
4.2.4.2. DLS de las Cu _x O-NPs	80

4.2.5. SEM	81
4.2.5.1. SEM de las Ag-NPs	81
4.2.5.2. SEM de las Cu _x O-NPs	84
4.2.6. EDS	86
4.2.6.1 EDS de las Ag-NPs	86
4.2.6.2. EDS de las Cu _x O-NPs	88
4.3. Pruebas microbiológicas de las Ag-NPs y Cu _x O-NPs frente a <i>E. Coli</i> y <i>S. Aureus</i>	90
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	96
CAPÍTULO 6. TRABAJO A FUTURO Y RECOMENDACIONES.....	98
CAPÍTULO 7. ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.
REFERENCIAS	¡Error! Marcador no definido.

Índice de Figuras

Figura 1. Esquemas de reacción de compuestos orgánicos: síntesis de deshidratación de alcoholes por química verde (A) y, reacción por síntesis química convencional: reacción de oxidación de alcoholes secundarios (B).....	19
Figura 2. Información científica de la flor de <i>Bugambilia glabra</i>	20
Figura 3. Modos vibracionales de las moléculas.....	25
Figura 4. Equipo de cromatografía de ultra alto rendimiento acoplado a espectroscopia de masas (UHPLC-MS) [ref].....	26
Figura 5. Diagrama del funcionamiento de un espectrómetro de resonancia magnética nuclear [ref].	28
Figura 6. Procesos metodológicos para la síntesis de nanopartículas (NPs) [23].	29
Figura 7. Diagrama de funcionamiento de la espectroscopia UV-Vis para compuestos químicos [ref].....	33
Figura 8. Diagrama de funcionamiento de la técnica de DLS [ref].	34
Figura 9. Diagrama del funcionamiento del microscopio SEM [ref].	35
Figura 10. Diagrama de funcionamiento de la espectroscopia de rayos-X de energía dispersiva (EDS) [ref].	36
Figura 11. Diagrama de funcionamiento de microscopia de fuerza atómica AFM [ref].....	37
Figura 12. Mecanismo de acción de las nanopartículas de plata en bacterias gramnegativas [33].	39
Figura 13. Mecanismo de acción de las Cu_xO -NPs en a) bacterias gramnegativas como <i>E. coli</i> y b) bacterias grampositivas como <i>S. aureus</i> [34].	39
Figura 14. Proceso de preparación de los extractos para las flores de <i>Bugambilia glabra</i>	40
Figura 32. Metodología de síntesis de Cu_xO -NPs utilizando como precursor $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	55
Figura 33. Metodología general de las pruebas microbiológicas para las Ag-NPs y Cu_xO -NPs frente a bacterias de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	59
Figura 34. Estructuras químicas de los posibles metabolitos secundarios presentes en la planta de <i>Bugambilia glabra</i>	63
Figura 35. Seguimiento por TLC de la separación de los metabolitos secundarios en los extractos de <i>Bugambilia glabra</i> a) etanólicos y b) acuosos; donde 1) fucsias, 2) rosadas, 3) naranjas y 4) coloridas.	65
Figura 36. Mecanismo de reacción de la reducción de la plata a partir de los metabolitos secundarios de la <i>Bugambilia glabra</i>	71
Figura 37. Posible mecanismo redox entre el extracto acuoso de <i>Bugambilia glabra</i> y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ para la formación de Cu_xO -NPs.	73
Figura 38. Esquema de ejemplificación de posible acaparamiento de los fitocompuestos de la planta sobre el metal de plata donde: a) NPs con carga superficial negativa y b) nanopartícula con carga superficial positiva.....	79
Figura 39. Posible estructura química de las Cu_xO -NPs con tween-80 como estabilizante, donde la carga superficial de la NP la confiere el óxido metálico (+1 o +2).	81
Figura 40. Imágenes SEM de las Ag-NPs obtenidas mediante síntesis verde (muestra 2).	83
Figura 41. Imágenes SEM de las Ag-NPs obtenidas mediante síntesis verde (muestra 3).	84
Figura 42. Imágenes SEM de la síntesis verde de las Cu_xO -NPs para la muestra M4 con tween-80.	86
Figura 43. Caracterización por EDS de la muestra 2 de Ag-NPs.....	87
Figura 44. Caracterización por EDS de la muestra 2 de Ag-NPs.....	88

Figura 45. Caracterización por EDS de las Cu_xO -NPs.....	89
Figura 46. Difusión en agar de las Ag-NPs frente a <i>S. Aureus</i> , donde a) Ag-NPs (1 gota/gotero 1h); b) Ag-NPs (1 gota/capilar 3h); c) Ag-NPs (1 gota/ capilar 1h) y d) Ag-NPs (1 gota/gotero 3h).....	92
Figura 47. Difusión en agar de las Ag-NPs frente a <i>E. Coli</i> , donde a) Ag-NPs (1 gota/gotero 1h); b) Ag-NPs (1 gota/capilar 1h); c) Ag-NPs (1 gota/ gotero 3h) y d) Ag-NPs (1 gota/capilar 3h).....	92
Figura 48. Difusión en agar de las Cu_xO -NPs frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> , donde a) - c) M2 (Cu_xO -NPs sin tween-80) y b) – d) M4 Cu_xO -NPs con tween-80).....	95

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Espectros FTIR de los metabolitos secundarios purificados a través de preparativa.	66
Gráfica 2. Espectros FTIR de los metabolitos secundarios purificados a través de columna en sílice gel.....	68
Gráfica 3. Espectro UV-Vis de las diferentes metodologías de las AgNPs comparadas con el extracto de <i>Bugambilia glabra</i> donde línea negra (1h gotero), línea roja (3h gotero), línea azul (1h capilar), línea verde (3h capilar) y línea morada (extracto de <i>Bugambilia</i>).	72
Gráfica 4. Espectro UV-Vis de las diferentes metodologías de las Cu_xONPs comparadas con el extracto de <i>Bugambilia glabra</i> donde línea roja (extracto de <i>Bugambilia</i>) y línea gris (Cu_xONPs)... ..	74
Gráfica 5. Espectros de FTIR de la planta <i>Bugambilia glabra</i> y las AgNPs, donde: línea negra (extracto), línea roja (M1: 3h gotero), línea azul (M2: 3h capilar), línea verde (M3: 1h gotero) y línea rosada (M4: 1h capilar).	75
Gráfica 6. Espectros de FTIR de la planta <i>Bugambilia glabra</i> y las Cu_xONPs , donde: M4 Cu_xONPs con tween-80 (línea negra), M2 Cu_xONPs sin tween-80 (línea roja) y extracto (línea azul).....	76
Gráfica 7. Tamaño de partículas para las diferentes metodologías de las AgNPs donde: a) 3h gotero, b) 1h gotero, c) 3h capilar y d) 1h capilar.....	79
Gráfica 8. Tamaño de partículas de las Cu_xONPs estabilizadas con Tween 80.....	81
Gráfica 9. Halos de inhibición del extracto de <i>Bugambilia glabra</i> roja frente a cepas bacterianas de <i>E. coli</i>	91
Gráfica 10. Halos de inhibición de las AgNPs frente a cepas bacterianas de a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. aureus</i> , donde M1) AgNPs (1 gota/gotero 3h); M2) AgNPs (1 gota/gotero 1h); M3) AgNPs (1 gota/ capilar 3h) y M4) AgNPs (1 gota/capilar 1h).	93
Gráfica 11. Halos de inhibición de las Cu_xONPs frente a cepas bacterianas de a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. aureus</i> donde: M2 (Cu_xONPs sin tween-80) y M4 (Cu_xONPs con tween-80).....	95
Gráfica 12. Espectro UV-Vis de la degradabilidad por exposición a la luz blanca del extracto acuoso de <i>Bugambilia glabra</i> roja, donde: línea azul (0 h), línea roja (24 h), línea negra (48 h) y línea verde (72 h).	¡Error! Marcador no definido.

Índice de Tablas

Tabla 1. Principios y conceptos de la química verde.	17
Tabla 2. Estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios presentes en la <i>Bugambilia</i>	21
Tabla 3. Fases móviles implementadas para la TLC de los extractos etanólicos.	49
Tabla 4. Fases móviles implementadas para la TLC de los extractos acuosos.....	50
Tabla 5. Fases móviles implementadas para la TLC de los tubos (11-23).....	53
Tabla 6. Formación de nanopartículas de plata con el extracto acuoso de <i>Bugambilia</i> rojas.....	54

Tabla 7. Resultados de las pruebas cualitativas para los extractos etanólicos de las plantas de Bugambilia glabra.....	61
Tabla 8. Resultados de las pruebas cualitativas para los extractos acuosos de las plantas de Bugambilia glabra.....	61
Tabla 9. Resultados de DLS de las AgNPs sobre tamaños de partícula, estabilidad coloidal y carga superficial.	77
Tabla 10. Datos de la composición atómica de la muestra 2 de AgNPs.	87
Tabla 11. Datos de la composición atómica de la muestra 3 de AgNPs.	88
Tabla 12. Datos de la composición atómica de las Cu _x ONPs.	89
Tabla 13. Ordenes de reacción de los extractos acuosos de Bugambilia glabra roja expuestos a la luz en tiempos de 0h, 24 h, 48h y 72 h.	¡Error! Marcador no definido.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

La síntesis de nanopartículas (NPs) metálicas ha generado un gran impacto a nivel científico debido a las múltiples aplicaciones que presentan estos materiales, y es que no solo se implementan en la industria química, sino que se ha descubierto que tienen funciones importantes para la industria farmacéutica. Durante muchos años, se ha reportado que la manera de obtener nanopartículas en los rangos estipulados (1 nm a 100 nm) se enfocan en dos métodos basados de arriba hacia abajo y de abajo hacia arriba. Donde el primero, genera nanopartículas partiendo de moléculas grandes a moléculas más pequeñas, y el segundo, produce nanomateriales partiendo de compuestos pequeños [1]. Cada una de estas metodologías se pueden llevar a cabo a través de procesos químicos, físicos y/o biológicos, donde los dos primeros suelen ser costosos y tienden a producir daños colaterales al medio ambiente y a la salud humana. Por lo que actualmente, se están impulsando y desarrollando nuevas estrategias sintéticas en el área biológica que involucran agentes naturales como extractos de plantas, frutos y microorganismos (hongos, bacterias, etc.) que permitan la reducción y estabilización de los metales en solución, favoreciendo así, una disminución en el tamaño del nanomaterial formado [2]. Estas rutas sintéticas han sido evaluadas y aceptadas por muchos investigadores del área, puesto que se incluye a la química verde como rama principal del diseño experimental y, además, que conlleva a la formación del compuesto deseado sin la empleabilidad de solventes tóxicos y costosos, conjuntamente se implementan condiciones de reacción a bajas temperaturas y presiones ambientales, lo que permite que no se produzcan compuestos peligrosos que logren contaminar el hábitat [2]. En función de esto, la producción de nanopartículas a partir de extractos de plantas permite desarrollar tratamientos alternativos para combatir enfermedades invasivas y crónicas en el sistema humano, y opcionalmente, reforzar compuestos químicos para aplicaciones industriales como detergentes, pinturas, recubrimientos, envolturas, entre otras; logrando nanomateriales funcionalizados con metabolitos secundarios que favorezcan una mejora en las propiedades biológicas de los compuestos obtenidos, como antimicrobianas, anticancerígenas, antifúngicas, etc. Muchos

Capítulo 1. Introducción

reportes científicos, han demostrado que las Ag-NPs y Cu_xO-NPs reducidas con productos naturales presentan excelentes actividades antimicrobianas favoreciendo la inhibición de crecimiento de bacterias. El hecho de que los metales estén rodeados por moléculas orgánicas le brinda mayores aplicaciones como mejoras en su potencial de inhibición, mayor interacción de los grupos funcionales libres en reacciones químicas, transporte adecuado por el sistema digestivo añadiendo una liberación controlada del material. Esto se debe a que estos fitocompuestos se constituyen por grupos funcionales que suelen ser reactivos y tener funciones específicas en la medicina tradicional [3].

Para este trabajo de investigación, se sintetizó y caracterizó los metabolitos secundarios presentes en la *Bugambilia glabra* y se funcionalizaron con NPs, trabajando con metales como la plata y el cobre, obteniendo propiedades fisicoquímicas como el diámetro de las nanopartículas, estabilidad coloidal, morfología y potencial inhibitorio del crecimiento bacteriano contra cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Para esto, se busca desarrollar una estrategia sintética fácil, de bajo costo y sin el uso de solventes tóxicos que produzcan los nanomateriales de manera eficaz y que puedan ser escalados. Además, implementar técnicas de caracterización como FT-IR, UV-Vis, DLS, SEM y EDS que permitan visualizar señales específicas que demuestren la presencia de las NPs en solución.

1.2. Planteamiento del problema

Uno de los problemas actuales para el tratamiento de enfermedades está asociado a diferentes situaciones que se basan en la estabilidad de los compuestos activos en el organismo, la resistencia de los microorganismos a ciertos medicamentos, el estrés oxidativo de algunas proteínas y alteraciones en el ADN [4]. Estas complicaciones hacen que la ciencia tome un giro, en la búsqueda y desarrollo de nuevos materiales activos que logren solucionar este problema, por lo que la bionanotecnología entra a jugar un papel importante en la innovación de metodologías sintéticas para la obtención de nuevos productos farmacéuticos, industriales, alimenticios, entre otros. A partir de esta área, se puede investigar la síntesis de NPs de Ag y Cu_xO con extractos acuosos de plantas, tal es el caso de la *Bugambilia glabra*, que fungen como agentes reductores de los cationes metálicos que conllevan a la nucleación y formación de NPs debido a los fitocompuestos

Capítulo 1. Introducción

que la constituyen, brindándoles un aumento en las propiedades biológicas del metal como antimicrobianos. Además, de poder involucrar a las NPs en las reacciones químicas que se instauran a nivel celular, debido a que se da el desprendimiento del metal dentro de la célula lo que puede favorecer a la mejora de procesos celulares o a la muerte de la misma, en función de la aplicación buscada [5].

1.3. Justificación

La química tradicional ha generado el desarrollo de nuevos compuestos capaces de mejorar materiales de la industria química, farmacéutica, cosmética y alimentaria. La gran mayoría de los compuestos activos provienen de plantas o de cualquier otro producto natural. Este enfoque medicinal e industrial ha permitido que la ciencia despliegue alternativas terapéuticas que manifiesten propiedades biológicas más específicas para la corrección de problemas de salud y en el área industrial. Esto se puede obtener haciendo uso de metabolitos secundarios provenientes de plantas como agentes reductores y estabilizadores para metales de transición, debido a que sus grupos funcionales no solo son capaces de realizar reacciones redox, sino que, además, pueden aumentar las propiedades farmacéuticas de nanomateriales formados. Para ello, la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios extraídos de la flor de *Bugambilia glabra* y funcionalizados con NPs metálicas para la mejora de procesos celulares, podría ser una excelente alternativa en la industria farmacéutica y química. También, se hace necesaria la implementación de la química verde para desarrollar productos de manera económica, beneficiosa y ecológica con la salud humana y el medio ambiente. De esta manera, se logra optimizar condiciones de reacción como temperatura, tiempo, solventes no tóxicos, presión y pH adecuados, los cuales favorecen la formación de nanopartículas de una manera más eficiente.

1.4. Hipótesis

Los extractos naturales presentes en la flor de *Bugambilia glabra* son posibles compuestos activos que pueden actuar como agentes reductores y estabilizadores de NPs metálicas antibacterianas.

Capítulo 1. Introducción

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Sintetizar y evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos naturales de la flor de *Bugambilia* funcionalizados con nanopartículas de plata y óxido de cobre.

1.5.2. Objetivos específicos

- Extraer y caracterizar los metabolitos secundarios de la flor de *Bugambilia glabra*.
- Optimizar las condiciones de síntesis verde de las nanopartículas (temperatura, solventes, presión, etc.) para obtener un método eficiente utilizando los metabolitos secundarios de la flor de *Bugambilia glabra*.
- Caracterizar las NPs empleando diversas técnicas fisicoquímicas.
- Realizar pruebas microbiológicas a las NPs para verificar su efecto microbicida.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. Fundamentos de síntesis verde

El término “química verde” fue implementado por primera vez por Paul Anastas, el cual se considera como el fundador de esta área de la química. Este campo científico, se asocia directamente con la generación de compuestos químicos con valor agregado a pequeña y grande escala de una manera sostenible, sin generar residuos nocivos para la salud y efectos secundarios al medio ambiente [6]. Gracias a la química verde, Anastas y Warner lograron resolver una de las problemáticas más controversiales de la química aplicada, estableciendo 12 reglas que explican detalladamente como se debe realizar la síntesis química de una manera sustentable. Por ende, en las últimas dos décadas la química verde ha tomado gran importancia a nivel científico, gracias a que se dio a conocer por medio de conferencias internacionales la filosofía de la química verde y la capacitación de entes relacionados con la ciencia. Permitiendo así, el avance científico en el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas, además de lograr una reducción en los impactos negativos que ha generado la síntesis química convencional. Esto ha proporcionado que los centros de investigación y las entidades del sector industrial trabajen en pro de un mismo objetivo, la generación de una química ambiental sostenible.

2.1.1. Reglas para la síntesis verde

Las 12 reglas que rigen la química verde permiten establecer normas para las buenas prácticas de laboratorio, la disminución de la contaminación ambiental, la búsqueda de procesos benignos y sostenibles, donde se puedan implementar solventes no tóxicos, catalizadores reutilizables; además, donde las condiciones de reacción sean ideales, es decir, desarrolladas a temperatura y presión ambiental. Esto con el objetivo de generar la menor producción de residuos tóxicos, que no logren afectar el medio ambiente y la salud humana. En consecuencia, estos fundamentos están ligados a entes políticos, sociales y económicos que apoyen el desarrollo de una química sostenible. Actualmente, las reglas que presiden la química verde, establecidas por Anastas y Warner, son las siguientes: prevención, economía atómica, síntesis químicas menos nocivas, fabricación de productos

Capítulo 2. Marco Teórico

químicos más estables, solventes no tóxicos y confiables, mejoras en las condiciones de reacción que favorecen la eficiencia energética, manejo de materias primas renovables, disminución de compuestos secundarios, catálisis, parámetros para una buena degradación, determinación en tiempo real sobre la reducción de la contaminación y metodologías químicas más segura para evitar accidentes laborales [7]. Cada uno de estos principios están asociados a conceptos que explican cómo llevar a cabo nuevas rutas sintéticas (ver tabla 1).

Tabla 1. Principios y conceptos de la química verde.

No	Principios de la química verde	Conceptos
1	Prevención	Prevenir los desechos o limpiar los desechos creados
2	Economía atómica	Incorporar todos los materiales utilizados en el producto final
3	Síntesis química menos Peligrosas	Utilizar y generar sustancias que posean poca o ninguna toxicidad
4	Diseño de productos químicos más seguros	Efectuar la función deseada de los productos y minimizar su toxicidad
5	Disolventes y auxiliares más seguros	Las sustancias auxiliares deben ser inocuas cuando se utilizan
6	Mejoras en las condiciones de reacción que favorecen la eficiencia energética	La síntesis química se debe desarrollar a presión y temperatura ambiente.
7	Manejo de materias primas renovables	Las reactivos iniciales deben ser renovables y económicamente viables
8	Reducir derivados	Minimizar la modificación de procesos fisicoquímicos para no usar reactivos adicionales y producción de residuos
9	Catálisis	Utilizar sustancias catalíticas
10	Parámetros para una buena degradación	Los productos químicos deben descomponerse en productos de degradación inocuos

Capítulo 2. Marco Teórico

11	Determinación en tiempo real sobre la reducción de la contaminación	Desarrollar metodologías analíticas que supervisen y controlen en tiempo real las sustancias.
12	Metodologías químicas más seguras para evitar accidentes laborales	Elegir sustancias que minimicen accidentes químicos.

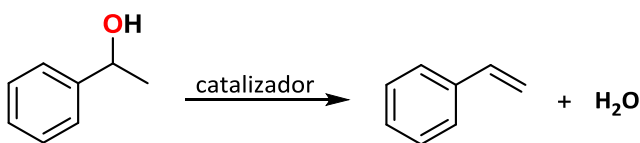
2.1.2. Ejemplos de síntesis química convencional y síntesis verde

Las reacciones llevadas a cabo por medio de síntesis química convencional no cumplen en su gran mayoría las 12 reglas establecidas por la química verde, debido a que suelen utilizar reactivos tóxicos y peligrosos, los cuales provocan residuos y subproductos de reacción no deseados. Esto hace que constantemente se esté en la búsqueda de metodologías novedosas donde se implementen reacciones con solventes no contaminantes, donde se generen residuos a los cuales se les dé un segundo uso o simplemente se logren desechar de manera controlada. Es ahí, donde entran las nuevas estrategias de producción de compuestos a través de síntesis verde.

En comparativa, un ejemplo claro que demuestra las diferencias entre la síntesis química convencional y la síntesis verde se evidencia en algunas reacciones de oxidación de alcoholes secundarios, debido a que se tiende a utilizar el reactivo de Jones ($\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) para llevar a cabo el proceso de oxidación donde el alcohol se puede convertir en un carbonilo. En este procedimiento, se tiende a generar sales de cromo (III) las cuales son consideradas como residuos tóxicos [7]. Por otro lado, las reacciones típicas como la sustitución nucleofílica y la deshidratación de alcoholes, se pueden implementar catalizadores para generar residuos no peligrosos y neutros como el agua, el cual es amigable con el medio ambiente (ver figura 1).

Capítulo 2. Marco Teórico

A. Reacción de deshidratación de alcoholes: Formación de residuos no tóxicos (H₂O)



B. Reacción de oxidación de alcoholes secundarios: Formación de residuos tóxicos (sales de Cr(III))

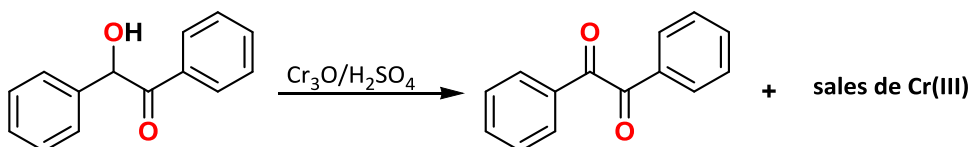


Figura 1. Esquemas de reacción de compuestos orgánicos: síntesis de deshidratación de alcoholes por química verde (A) y, reacción por síntesis química convencional: reacción de oxidación de alcoholes secundarios (B).

2.2. La *Bugambilia Glabra*

La planta de *Bugambilia glabra* o también conocida como la “flor de papel, veranera, Santa Rita, napoleón, trinitaria y papelillo” pertenece a la familia *Nyctaginaceae*, la cual consta de 18 diferentes especies. Esta planta se puede encontrar en varios países de Latinoamérica y se considera nativa de Brasil y Perú; además se cultiva en zonas tropicales y subtropicales del mundo [8]. Esta planta es un arbusto trepador que puede crecer hasta 10 metros de altura, asimismo, puede florecer durante todo el año si se encuentra expuesta a los rayos del sol. Por otro lado, la *Bugambilia* se caracteriza por tener diferentes colores que puede presentar sus brácteas como rosado, amarillo, morado, blancas, entre otras, las cuales rodean las diminutas flores de color blanco. La *flor de papel* se utiliza en muchos países como medicina ornamental para el tratamiento de enfermedades como la diarrea, dolor de estómago, náuseas, hipotensión, dolores de inflamación, entre otros [9] (ver figura 2).

Capítulo 2. Marco Teórico



Nombre científico: *Bougainvillea*.

Clases: Magnoliopsida

Subclase: Caryophyllida

Orden: Caryophyllales

Familia: *Nyctaginaceae*.

Género: *Bougainvillea*.

Especie: *Glabra*

Figura 2. Información científica de la flor de *Bugambilia glabra*.

2.2.1. Metabolitos secundarios y sus propiedades biológicas

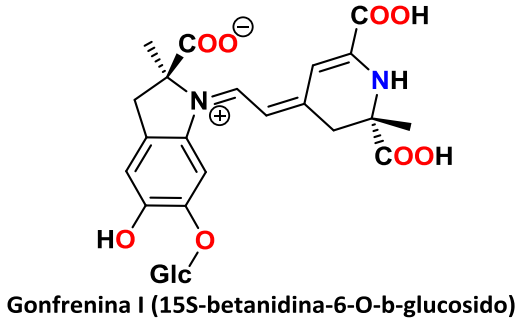
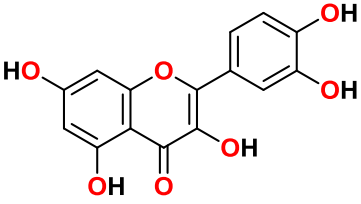
Las investigaciones científicas llevadas a cabo sobre productos naturales han demostrado que las plantas, flores y frutos contienen una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales presentan diferentes propiedades biológicas como anticancerígenos, antileishmaniasis, antidiabéticos, antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, entre otros; lo que permite considerarlos como compuestos activos. Las actividades biológicas de los productos naturales se deben a las diversas estructuras químicas que los componen, lo que ha posibilitado la clasificación de estos de acuerdo a su reactividad y función; logrando establecer que sus propiedades químicas se fundamentan en la interacción que ocurre entre los grupos funcionales de los metabolitos y las biomoléculas (enzimas, proteínas, etc.) presentes en nuestro organismo. Conforme a esto, los compuestos bioactivos pueden aportar mejoramiento en productos cosméticos, alimenticios y farmacéuticos. De este modo, la *Bugambilia* es considerada una planta con numerosos metabolitos secundarios que aportan beneficios para su uso en la medicina tradicional. Algunos de los compuestos activos más importantes son: betacianinas, flavonoides, ácidos fenólicos y terpenos.

Para el caso de las betacianinas, son un grupo específico de alcaloides denominados betalaínas, y son los encargados de brindarle el color rojo y/o violeta a las brácteas de la planta. La mayoría de las ramificaciones en el núcleo de las betacianinas se caracterizan por ser glucósidos, y son considerados compuestos antioxidantes [10]. Por otro lado, los flavonoides tienen un núcleo de orden secuencial de C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos (A

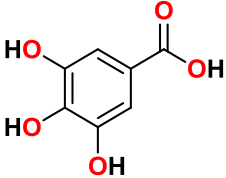
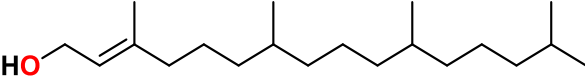
Capítulo 2. Marco Teórico

y B) y, un heterociclo (C) con un carbonilo α , β -insaturado. En estos compuestos orgánicos, los sustituyentes más comunes son hidróxilos, metoxilos y glucósidos presentes en los anillos A y B [11]. Algunos reportes científicos, han establecido que los flavonoides más comunes en la flor de *Bugambilia* son la miricetina, quercetina, apigenina, rutina, kaempferol, isovitexina, crisoeriol, luteolina, vitexina, entre otros [9]. Adicionalmente, los ácidos fenólicos, son unos de los compuestos químicos más frecuentes en las plantas, además, su actividad biológica es fundamental para las mismas, debido a que las protege contra los microbios. Estos compuestos se constituyen por anillos fenólicos, ácidos hidroxibenzoico y ácidos hidroxicinámico [9]. Por último, los terpenoides se caracterizan por ser estructuras volátiles que brindan el olor y sabor a las plantas. Además, pueden exhibir una importante actividad antibacteriana a la flor. En general, estos metabolitos se representan por la unión de 5 átomos de carbono que dan pie a un isopreno, existen variedades de terpenos con características estructurales diferentes, entre las más comunes se encuentran sesquiterpenos, esteroides, triterpenos y politerpenos [9]. A continuación, se ejemplifican las estructuras y propiedades de algunos metabolitos secundarios mencionados anteriormente (ver tabla 2).

Tabla 2. Estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios presentes en la *Bugambilia*.

Metabolitos secundarios	Nombre del compuesto	Actividad Biológica
Betacianinas	 Gonfrenina I (15S-betanidina-6-O-b-glucosido)	Antioxidante [12]
Flavonoides	 Quercetina	Antiinflamatorio [13]

Capítulo 2. Marco Teórico

Ácidos Fenólicos	 <p>Ácido Gálico</p>	Antioxidante Antifúngico Antimicrobiano [14]
Terpenos	 <p>Fitol</p>	Antibacteriano Antioxidante Antiinflamatorio [15]

2.2.2. Extracción, caracterización y aplicaciones de los productos naturales

Las extracciones y subsecuentes estrategias analíticas para caracterizar metabolitos secundarios dependen de varios factores, el principal de ellos se basa en la estructura química del compuesto, ya que de esto depende su polaridad y comportamiento frente a diferentes tipos de solventes; es decir, si logra solubilizarse adecuadamente. Este hecho permite establecer estrategias de purificación que favorezcan la adecuada separación de los metabolitos secundarios, lo que conlleva a la identificación correcta de cada compuesto químico. Por lo tanto, las estrategias de extracción y elucidación se pueden llevar a cabo teniendo en cuentas los siguientes factores:

Preparación de extractos: La elaboración de extractos se debe realizar con solventes que sean benignos y amigables con el medio ambiente y que reduzcan los efectos secundarios para la salud humana. De acuerdo a esto, una buena metodología para la preparación de los mismos debe partir de la limpieza del material, secado a temperatura ambiente de las plantas, maceración, y extracción de los metabolitos secundarios utilizando etanol y/o agua, los cuales se consideran solventes amigables y no peligrosos para el entorno.

Pruebas cualitativas: Los estudios fitoquímicos de las plantas se puede realizar por medio de pruebas específicas que brindan información sobre el grupo funcional o metabolito secundario presente. Para eso, a cada extracto realizado se le adicionan algunas gotas de soluciones específicas cómo: FeCl₃, reactivo de Bayer, reactivo de Benedict, reactivo de

Capítulo 2. Marco Teórico

Killer-Killani, NaOH, entre otros; los cuales a través del cambio de color del extracto proporcionan información de la presencia de compuestos como taninos, fenoles, carbohidratos, glicósidos cardiacos, quinonas, cumarinas, etc.,

Purificación por cromatografía en columna de sílice gel, preparativa y/o HPLC: Esta etapa es una de las más importantes, debido a que la purificación de los compuestos sin trazas o residuos permiten obtener una elucidación de la estructura química de manera eficaz y sin ruidos en los espectros. Para esto, es necesario implementar cromatografía en placa fina (TLC) a los extractos para conocer la fase móvil adecuada y llevar a cabo la purificación de las muestras. Posteriormente, se prepara la columna con sílice gel o alguna otra fase estacionaria que facilite la separación de los metabolitos según su polaridad. Luego, se debe realizar un seguimiento de los compuestos por TLC donde se revelan por lámpara UV-Vis o reveladores colorimétricos como FeCl_3 , reactivo universal, vainillina, etc., los cuales indican la presencia de grupos funcionales. Por último, se unifican las muestras que exhiban R_f (factor de retención) similares. Cabe resaltar que la utilización de equipos como isolera y/o HPLC, favorecen la eliminación de residuos o subproductos presentes en los extractos de las plantas, de este modo se obtiene una mejor determinación de los compuestos purificados.

Los metabolitos secundarios que se encuentran en la *Bugambilia glabra* han sido aplicados en diferentes campos científicos con el objetivo de aprovechar sus actividades biológicas y poder lograr un mejoramiento en los productos fabricados derivados de estos. Tal es el caso de los ácidos fenólicos, los cuales son usados en los productos alimenticios porque ayudan a eliminar los radicales libres existentes en el metabolismo, logrando la protección celular [10]. Por otro lado, las betacianinas presentan un buen potencial antibacteriano frente a cepas de bacterias *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *E. coli*. Mostrando una alta actividad contra las dos primeras, mientras que para *E. coli* su potencial se considera moderado [10]. De acuerdo con esto, se establece que cantidades específicas de betacianinas aisladas de *Bugambilia glabra* pueden ser utilizadas como un posible fármaco para el tratamiento de múltiples enfermedades. También pueden ser funcionalizadas con NPs metálicas (Zn, Cu, Ag, Se, etc.) con el fin de mejorar su actividad biológica, o en la

Capítulo 2. Marco Teórico

industria de detergentes como principal ingrediente activo para aumentar su actividad bactericida [10].

2.3. Técnicas de caracterización para metabolitos secundarios

Para el análisis de metabolitos secundarios se utilizan técnicas de caracterización que ofrecen información precisa de los grupos funcionales que constituyen la estructura química del compuesto activo. Además, se complementan entre sí, generando señales características que permiten la identificación de la posible sustancia. Las técnicas de caracterización más comunes para complejos orgánicos son las siguientes:

2.3.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

En la técnica FT-IR, las moléculas son irradiadas por un haz infrarrojo donde una parte de la radiación es absorbida por el compuesto y la otra se transmite [16], este hecho permite que los enlaces que conforman la estructura molecular experimenten movimientos vibracionales, traslacionales y rotacionales de un estado basal a un estado excitado, dándose así la absorción de energía en la región infrarroja en una zona de 4000 a 650 cm^{-1} . De modo que, se generan señales (bandas) características de los diferentes grupos funcionales que constituyen las moléculas, lo cual se conoce como huella dactilar molecular [17]. Aunque esta técnica brinda información relevante sobre la estructura química, no es suficiente para elucidar correctamente el compuesto debido a que una sola señal puede pertenecer a diferentes grupos funcionales; por lo que se necesitan de otras técnicas de caracterización como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para la identificación exacta de la estructura molecular. Por otro lado, los movimientos vibracionales que pueden experimentar las moléculas son tensión (simétricos y antisimétrico) y flexión (tijereteo, balanceo, aleteo y torsión), las cuales se pueden evidenciar a través de las señales específicas de un espectro y pueden adjudicarse a uno o varios movimientos vibracionales de los grupos funcionales.

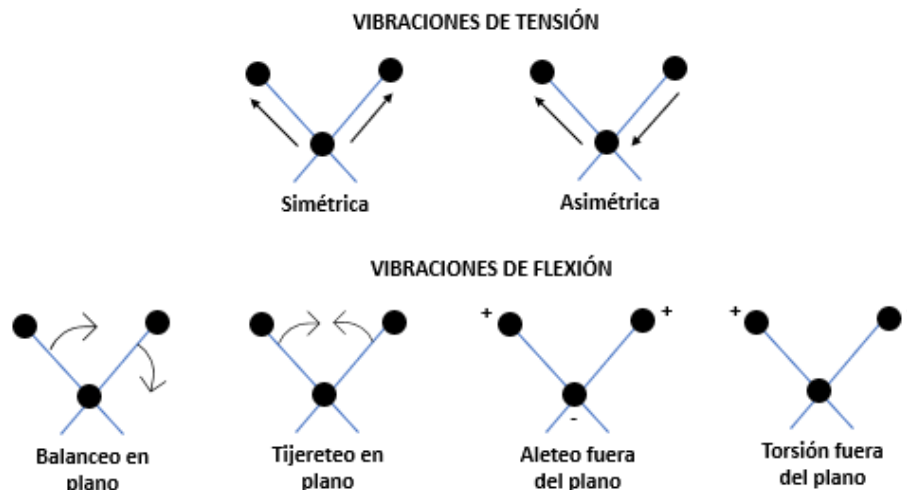


Figura 3. Modos vibracionales de las moléculas.

2.3.2. Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectroscopia de masas (UHPLC-MS)

La cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada con espectroscopia de masas (UHPL-MS), se considera una técnica de separación eficaz con alta sensibilidad en la detección e identificación de compuestos orgánicos tanto cuantitativamente como la de sus propiedades fisicoquímicas [18]. Para realizar la separación por UHPLC, se deben tener en cuenta dos métodos basados en elución isocrática y/o en gradiente. De acuerdo a lo anterior, el primer proceso consiste en la variación del volumen de inyección y el caudal de la fase móvil [19], donde el volumen de inyección se comprende entre el 1% al 5% del volumen de la columna con el objetivo de garantizar el no ensanchamiento de la misma. Por otro lado, el proceso de elución en gradiente se basa en que la proporción de la elución fuerte, el modificador orgánico de fase reversa aumente desde un valor mínimo hacia un valor más grande, lo que conlleva a un aumento en la fuerza de elución del componente, permitiendo la separación de los mismos [19]. De esta manera, la separación y cuantificación de analitos por UHPLC se establece con los siguientes pasos: a) definir el método por elución isocrática o por gradiente, b) establecer el tamaño de la columna, puede ser cromatografía en fase normal, inversa, etc., c) especificar la fase móvil del corrimiento y d) realizar la inyección de la muestra al equipo. Estos pasos se especifican con

Capítulo 2. Marco Teórico

el objetivo de obtener la separación de diferentes picos característicos según las polaridades de los metabolitos frente a la fase estacionaria y móvil, logrando la cuantificación e identificación de los analitos de manera rápida, eficaz y precisa. Por otro lado, el acoplamiento de esta técnica con la espectrometría de masas (UHPLC-MS) se fundamenta en la ionización por electrospray (ESI), donde se proporciona una cantidad de solvente aplicando un voltaje para el capilar y el orificio del instrumento con un flujo de gas inerte. Posteriormente, las gotas del spray se evaporan y garantiza la formación de iones en la fase gaseosa logrando fragmentaciones para originar núcleos de menor tamaño molecular que precisen el valor de m/z de cada estructura [20]. Cabe resaltar que la fragmentación de la molécula se lleva a cabo por rompimiento homolítico o heterolítico, los cuales presentan valores específicos de m/z . Además, para esta técnica espectroscópica, las moléculas se unen a través de enlaces covalentes de coordinación a aductos moleculares como: H, Na, K, entre otros, que logran favorecer a la identificación de los metabolitos separados previamente por UHPLC.

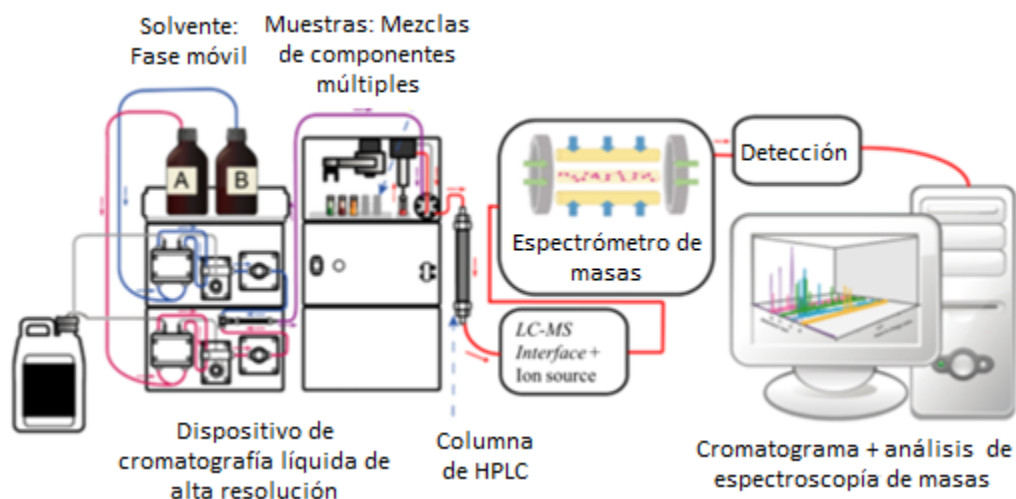
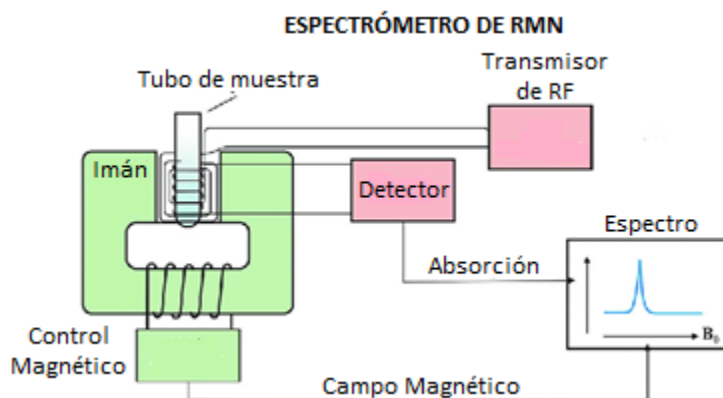


Figura 4. Equipo de cromatografía de ultra alto rendimiento acoplado a espectroscopia de masas (UHPLC-MS) [21].

2.3.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN):

Esta técnica de caracterización se fundamenta en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos. Estos poseen un espín nuclear que pueden rotar sobre su propio eje, asimismo, sus momentos magnéticos se orientan de diferentes maneras, debido a que están influenciados bajo un campo magnético externo B_0 . Cuando una molécula está expuesta a un campo magnético, sus núcleos establecen frecuencias específicas debido a su entorno químico. Una vez los núcleos son irradiados con energía, estos pueden realizar transiciones a diferentes niveles energéticos produciendo un fenómeno de resonancia que conlleva a una señal característica en el espectro [22].

Este tipo de espectroscopia se implementa para la elucidación de una variedad de metabolitos secundarios como lo son: flavonoides, terpenoides, alcaloides, antocianinas, entre otros. De este modo, los grupos funcionales indican señales específicas dentro de un espectro de resonancia el cual depende de su ambiente químico. Para lograr una identificación más precisa de una estructura molecular, se debe tener en cuenta los siguientes espectros de resonancia: ^1H , ^{13}C , COSY, DEPT, HSQC, HMBC y NOESY. Los dos primeros, se caracterizan por ser espectros unidimensionales (1D) que permiten reconocer y cuantificar los núcleos presentes en las estructuras químicas [22]. Los otros espectros, son considerados multidimensionales y se encargan de brindar una mayor información sobre la correlación que presentan los núcleos entre sí, es decir, donde están ubicados uno del otro y establecer sus enlaces vecinales u ortogonales conllevando a la elucidación completa del metabolito [22].



Capítulo 2. Marco Teórico

Figura 5. Diagrama del funcionamiento de un espectrómetro de resonancia magnética nuclear [23].

2.4. Síntesis verde de nanopartículas

La síntesis de NPs se puede llevar a cabo través de dos enfoques de crecimiento: de arriba hacia abajo (*top-down*) y de abajo hacia arriba (*bottom-up*). En el primer enfoque, se parte de materiales a granel para ser transformados en fragmentos más pequeños y finalmente obtener las NPs con tamaño dimensional entre 1 a 100 nm. El segundo proceso, se efectúa a partir de precursores moleculares que conllevan a la formación de clúster que permiten la síntesis de NPs. Estos procesos están ligados a métodos físicos, químicos y biológicos, como: ultrasonicación, sol-gel, reducción con agentes orgánicos e inorgánicos y uso de microorganismos o extractos de plantas respectivamente [24] (ver figura 6).

Recientemente ha incrementado el interés por desarrollar enfoques de síntesis verde de NPs, debido a la facilidad de los procesos que permiten la obtención de nanomateriales con tamaños apropiados e ideales para aplicaciones en procesos biológicos entre otras. Además, se pueden implementar solventes no tóxicos, que no permiten la generación de residuos peligrosos para la salud humana y medio ambiente, es decir, se pueden realizar la funcionalización de las NPs con medios como alcohol etílico y agua, lo que también favorece la disminución de costos en la síntesis. Por otro lado, las técnicas de síntesis de convencionales posibilitan un control del tamaño y la morfología de las nanopartículas. Sin embargo, estos métodos suelen considerarse en algunos aspectos pocos ventajosos debido a la manipulación de reactivos o solventes peligrosos, generación de residuos tóxicos, uso de equipos de alto costo y tiempos de síntesis prolongados, lo que conlleva a que este tipo de procesos sean poco accesibles.

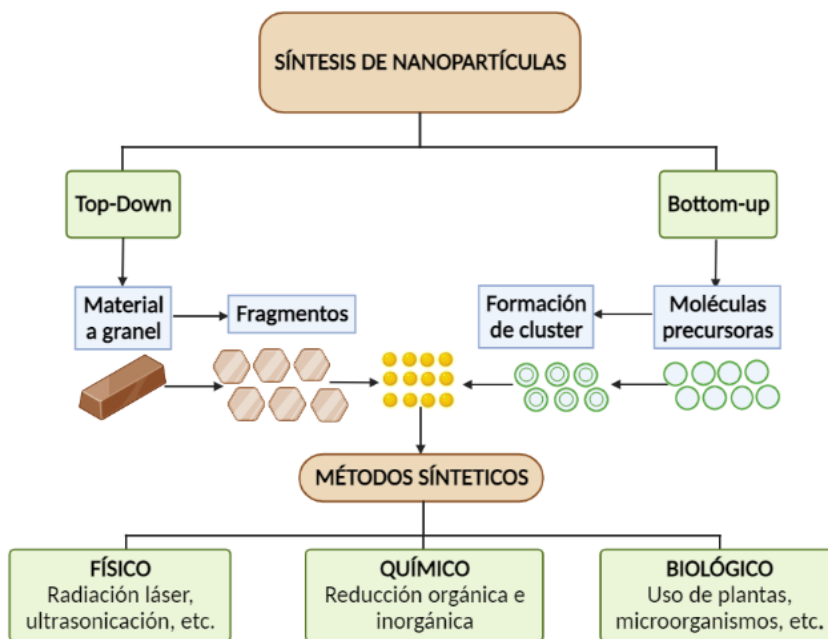


Figura 6. Procesos metodológicos para la síntesis de nanopartículas (NPs) [24].

El proceso para la funcionalización de NPs con extractos naturales ha generado grandes soluciones a problemas relacionados con la baja solubilidad, liberación sostenida y controlada de compuestos activos, mayor estabilidad, mejora de biodisponibilidad, entre otros aspectos importantes enfocados en el tratamiento de enfermedades y compuestos para la industria química [25]. La reacción redox entre los cationes de los metales precursores y los extractos de plantas ha llamado la atención a nivel científico en los últimos años, por lo que se han implementado materiales metálicos con buenas propiedades físicas y químicas que logren favorecer un tamaño deseado para la síntesis del nanomaterial, los más comunes son: zinc (Zn), cobre (Cu) y plata (Ag). Estos metales suelen ser biocompatibles con células eucariotas y procariotas, puesto que logran una buena interacción con las biomoléculas que componen las células favoreciendo el mejoramiento de los procesos biológicos o conllevando a la muerte celular. Un ejemplo se puede visualizar con el Zn, considerado como un cofactor fundamental para muchas proteínas, tal es el caso de la ARN polimerasa, la cual es una enzima que tiene un dominio que se encuentra enlazada al metal, y aunque la función específica de este metal no se ha logrado identificar de manera

Capítulo 2. Marco Teórico

concreta, los reportes indican que dicho dominio se caracteriza por la unión del ácido nucleico a diferentes proteínas. Además, contribuye en los procesos de regulación de la transcripción [26]. De acuerdo a esto, se presentan tres etapas para realizar la síntesis de NPs por métodos biológicos:

Etapas 1: Preparación de extractos acuosos y/o etanólicos a partir de plantas, flores y/o frutos.

Etapas 2: Síntesis verde de nanopartículas a partir de extractos naturales (proceso de óxido-reducción). Este método se puede realizar con condiciones de reacción específicas que están ligadas a las propiedades del nanomaterial como: temperatura ambiente (controla la morfología), pH (afecta el tamaño, forma y agregados), presión (contrasta la relación tamaño/forma), agentes estabilizantes (potencial zeta de las soluciones coloidales), entre otros.

Etapas 3: Caracterización de las NPs mediante: UV-Vis, FT-IR, DLS, SEM, EDS, AFM, entre otros. Estas técnicas permiten la verificación adecuada caracterización de la composición química, morfología, tamaño, área y volumen del nanomaterial.

2.4.1. Síntesis verde de nanopartículas de plata (Ag-NPs)

La plata (Ag), es un metal de transición el cual es considerado como el más abundante de la naturaleza, perteneciente al grupo 11 de la tabla periódica. Este metal presenta buenas propiedades fisicoquímicas que pueden favorecer su aplicación en áreas como la bionanotecnología. Las nanopartículas de plata (Ag-NPs), se consideran nanomateriales con propiedades biológicas predominantes como antifúngicos, anticancerígenos, antibactericidas y antiinflamatorias; permitiendo una mayor utilidad de las NPs en campos farmacéuticos, químicos, cosméticos, e industriales [27]. Hoy en día, los avances en este tipo de síntesis a través de extractos de plantas han crecido exponencialmente, brindando una variedad de metodologías ecológicas que conllevan a resultados excepcionales y reproducibles. Un ejemplo claro, se evidencia en la síntesis de Ag-NPs con extractos de neem, donde se partió de un precursor como el nitrato de plata (AgNO_3) con concentración específica. Posteriormente, se adicionaron volúmenes precisos del extracto de la planta en

Capítulo 2. Marco Teórico

condiciones de reacción ideales (temperatura ambiente y agitación constante) dando como resultados tamaños de partícula entre 14 nm a 101 nm [28]. La mayoría de estos procedimientos, implementan las mismas condiciones de reacción para considerarse sostenible, solo varían las concentraciones de los precursores y extractos acuosos de las plantas, y en el tiempo de la reducción del nanomaterial. De esta manera, se puede considerar que el método es rentable y amigable con el medio ambiente.

2.4.2. Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre ($\text{Cu}_x\text{O-NPs}$)

El cobre es un metal perteneciente al grupo 11 de la tabla periódica, se considera un elemento de transición 3d, el cual posee una alta capacidad de conducir calor y electricidad, además de tener una buena ductilidad [27]. Las investigaciones relacionadas sobre las NPs de cobre (Cu , CuO y Cu_2O), manifiestan que presentan propiedades biológicas como antibacterianas, anticancerígenas, fotocatalíticas, entre otras [29]. Esto permite ampliar la visión de cómo se pueden funcionalizar materiales que aporten beneficios en sus aplicaciones al sistema humano, lo que conlleva a la realización de síntesis verde de Cu-NPs o $\text{Cu}_x\text{O-NPs}$, ya que se considera un metal muy versátil, económico y con buen desempeño frente a diferentes cepas de microorganismos. La mayoría de las metodologías verdes para la síntesis de $\text{Cu}_x\text{O-NPs}$ se basan en condiciones ideales, las cuales son temperatura ambiente o en dado caso se requiera calentamiento no mayor a $80\text{ }^\circ\text{C}$, agitación constante y presión de 1 atm. Para la fabricación del nanomaterial, se implementan extractos de plantas que sirven a la vez como reductores y estabilizadores de soluciones coloidales. Sin embargo, se sabe que el cobre tiende a oxidarse de manera inmediata al entrar en contacto con el oxígeno presente en el ambiente, por lo que es necesario utilizar sistemas herméticos y en lo posible con vacío para controlar el proceso de oxidación. Un ejemplo, es la síntesis verde de Cu-NPs por medio del extracto de *Jatropha curcas*, partiendo de un precursor de cloruro de cobre al 3 mM, al cual le adicionaron una cantidad exacta de extracto y dejaron en agitación constante por 24 h, después de transcurrido el tiempo se observa un cambio de color de marrón oscuro a marrón amarillento, lo que indica la formación de Cu-NPs u $\text{Cu}_x\text{O-NPs}$ [29].

Capítulo 2. Marco Teórico

2.5. Técnicas de caracterización para NPs

Actualmente, en el ámbito científico existe una amplia variedad de técnicas de caracterización para compuestos metálicos, que corroboran diferentes características del material como tamaño de NP, forma, rugosidad de la superficie, estabilidad coloidal, entre otros. De acuerdo a lo anterior, las técnicas utilizadas para conocer las propiedades de las NPs son UV-Vis, DLS, SEM, EDS, y AFM, por mencionar algunos ejemplos.

2.5.1. Espectroscopia ultravioleta visible (UV-VIS)

La espectroscopia UV-Vis, es una técnica de caracterización en el cual las moléculas que tienen electrones π o electrones no enlazantes que pueden absorber luz en el rango UV-visible. En este proceso, los electrones se excitan y logran hacer saltos energéticos de un nivel de poca energía a uno de más alta energía. Esto cambios energéticos se ven reflejados en las moléculas orgánicas que contienen grupos funcionales llamados cromóforos, los cuales tienen electrones en niveles de baja energía capaces de absorber luz UV-visible [30]. Esta técnica de caracterización se rige por la ley de Beer-Lambert:

$$A = \text{Log}_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon c L$$

Donde: A es la absorbancia de los analitos, I_0 es la intensidad de la luz, I la intensidad transmitida, ϵ es la constante de la absortividad molar, c concentración de las especies absorbidas y L, longitud de la celda. De esta manera, se puede determinar y cuantificar compuestos químicos por medio de señales características que corresponden a la absorbancia de cada especie con una longitud de onda determinada. De modo que, el espectro UV-Vis proporciona información relevante para identificar la concentración, cinética, o el rango de longitud de onda de un analito.

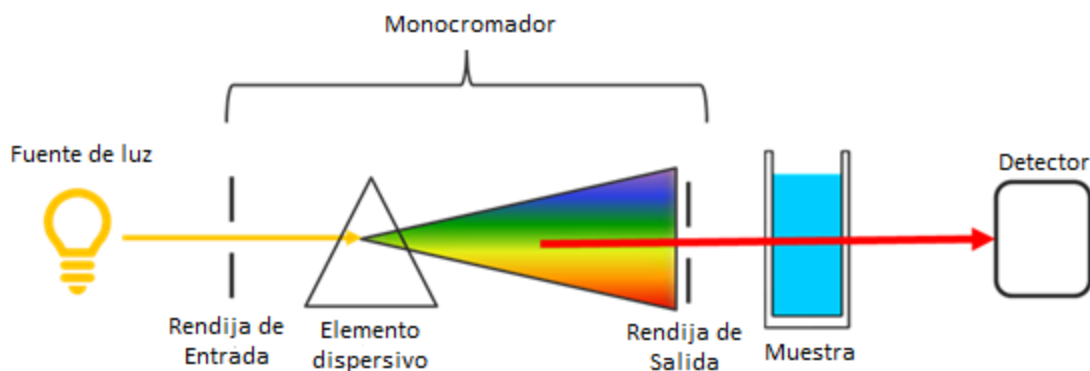


Figura 7. Diagrama de funcionamiento de la espectroscopia UV-Vis para compuestos químicos [31].

2.5.2. Dispersión de luz dinámica (DLS)

La DLS es una técnica de caracterización capaz de medir la distribución del tamaño de partícula de una solución coloidal por medio de la dispersión de la luz de un láser. Esta metodología de análisis permite medir el diámetro hidrodinámico de la NP, el cual se relaciona con su movimiento browniano, y refleja la relación de la intensidad de la luz en función del tiempo [32]. El DLS, no solo analiza el tamaño de partícula, sino que también brinda información sobre la estabilidad coloidal localizando las aglomeraciones presentes en la solución. Estas mediciones se pueden observar a través del potencial zeta, polaridad, movilidad y conductividad de la partícula. Estos datos son fundamentales para lograr un mejoramiento en las condiciones de reacción, para obtener tamaños más pequeños y estabilidades de solución en los rangos establecidos (mayores a ± 30 mV).

Para la obtención de la distribución del tamaño de partícula, los softwares de los equipos integran la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta Rh}$$

Donde: D es coeficiente de difusión, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η es la viscosidad del solvente y, Rh el radio reodinámico de la solución de partículas. Además, los softwares logran una precisión óptima en la medición del tamaño de partícula, generando mediciones rápidas, sensibles y efectivas para cualquier materia.

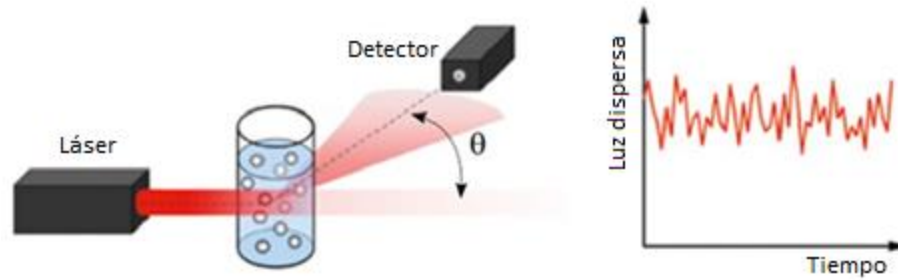


Figura 8. Diagrama de funcionamiento de la técnica de DLS [33].

2.5.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El fundamento físico de la microscopía SEM consiste en irradiar la superficie de un material sólido con un haz de electrones primarios energéticos enfocados, derivados de un cañón de electrones, lo que conlleva a la obtención de imágenes sobre la morfología del material dando especificidad de la forma y tamaño de la NP [30]. Para realizar la caracterización se utilizan dos tipos de electrones, conocidos como: electrones secundarios y electrones retrodispersados. En el caso de los primeros, se consideran electrones de baja energía que se expulsan mediante dispersión inelástica, los cuales son detectados y atraídos a una red polarizada eléctricamente; posteriormente, emitidos hacia un centellado lo que provoca un destello de luz que percibida en forma de imágenes digitales [30]. Los electrones retrodispersados, se califican como electrones de alta energía que se reflejan por dispersión elástica con el sustrato. Es importante tener en cuenta, que los mejores elementos para observar imágenes más claras y definidas son aquellos que presentan número atómico alto, ya que los electrones se retrodispersan más eficazmente y producen imágenes de la superficie más nítidas [30]. Una vez el proceso de irradiación se lleve a cabo, los resultados de las imágenes se observarán en contrastes diferentes dependiendo del material a analizar, si es un metal emitirán luz y si es una biomolécula no se percibirá opaca.

Capítulo 2. Marco Teórico

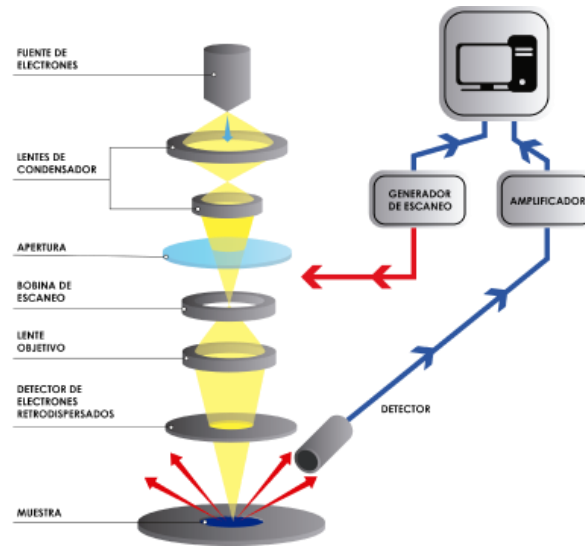


Figura 9. Diagrama del funcionamiento del microscopio SEM [34].

2.5.4. Espectroscopia de rayos-X de energía dispersiva (EDS)

La espectroscopia de rayos-X de energía dispersiva, se fundamenta en la localización de rayos x provenientes de los electrones primarios de la muestra analizada. La emisión de rayos x, se debe a que una vez irradiada a la muestra sus electrones de niveles más bajos de energía se excitan y pasan a un estado de energía mayor, lo que deja un espacio en el orbital de baja energía conllevando a que un electrón de la capa externa del átomo pueda ocupar el orbital vacío [32]. Este proceso genera un diferencial energético entre los orbitales de mayor y menor energía, más conocidos como orbital HOMO-LUMO, produciendo rayos. A partir de esto, se puede calcular la energía de los rayos x emitidos por la muestra, la cual es específica de cada estructura atómica, y, por ende, calcular su composición química elemental.

Los espectros de EDS, se expresan graficando energía en unidades de kilo-electronvolts (KeV) vs Intensidad de los fotones de rayos X donde se evidencia la posición de los picos característicos de los elementos químicos y la intensidad de la señal, que brinda información sobre la cantidad del elemento que contiene la muestra [32].

Capítulo 2. Marco Teórico

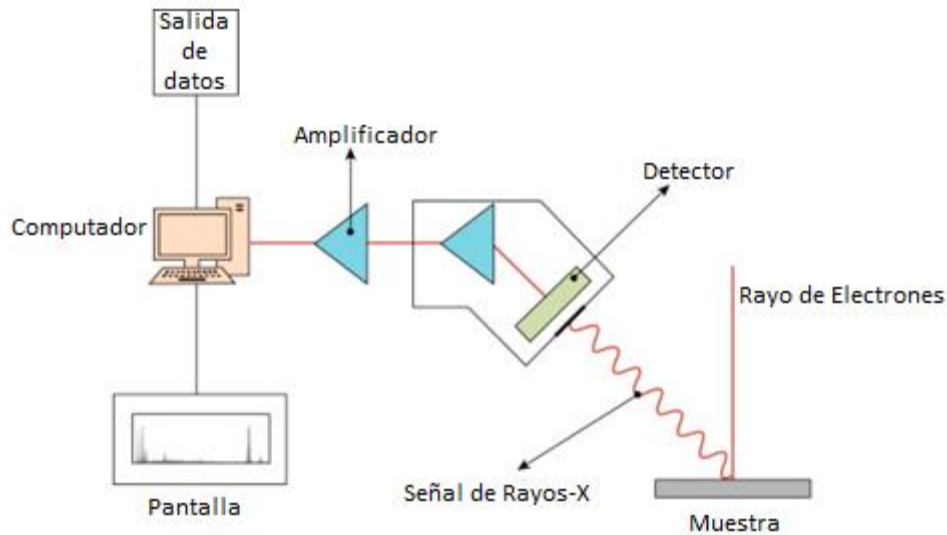


Figura 10. Diagrama de funcionamiento de la espectroscopia de rayos-X de energía dispersiva (EDS) [35].

2.5.5. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El AFM es una técnica de barrido que se basa en la detección de diferentes fuerzas como: la fuerza de adhesión y la fuerza magnética; dependiendo de esto se implementa un tipo de punta capaz de mapear la superficie de un material [36]. El equipo de AFM puede trabajar de dos formas, que consisten en modo contacto y tapping. Para el primero, la sonda está en contacto permanente con la superficie de la muestra, generando un mapeo más sensible al no reconocimiento de la morfología del material, debido a que la punta no tiene un control preciso del tamaño de la superficie, es decir, se puede encontrar tamaños más grandes de lo que ha evidenciado durante el proceso de rastreo lo que conlleva a daños en la sonda y a ruidos en la imagen. Para el caso del modo tapping, la punta entra en contacto con la muestra de manera intermitente, generando movimientos más tardíos en el reconocimiento de la superficie. Este modo suele ser el más recomendado para generar las imágenes 2D y 3D de la superficie.

El movimiento de las puntas se debe a la interacción que se presenta entre la punta y la superficie del material, el cual se analiza por el enfoque de un rayo láser con un fotodiodo. Por otro lado, los tamaños aproximados de la sonda son de 10 a 20 nm y se encuentran

Capítulo 2. Marco Teórico

unidas a un voladizo [36]. Esta técnica de caracterización proporciona información sobre las propiedades del material como: rugosidad, textura de la superficie, tamaño y morfología.

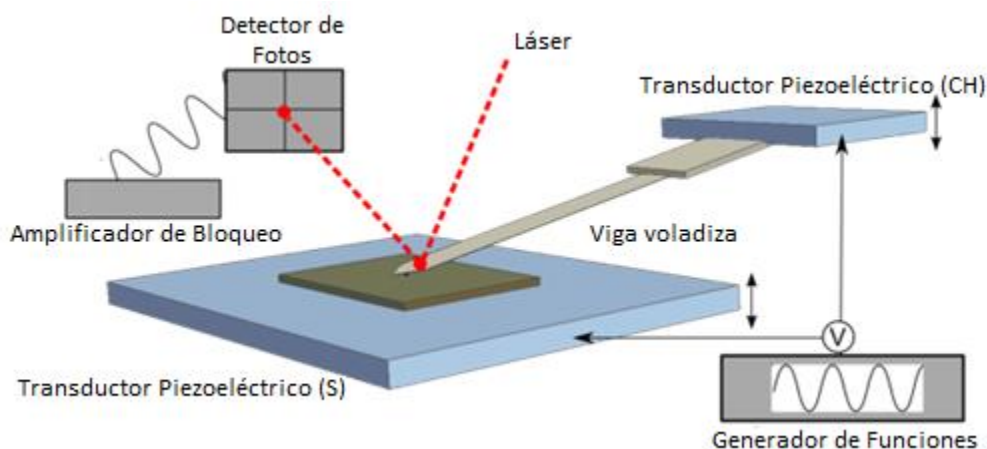


Figura 11. Diagrama de funcionamiento de microscopia de fuerza atómica AFM [37].

2.6. Análisis microbiológico

Los análisis microbiológicos han hecho que la ciencia de pasos importantes a nivel farmacéutico, alimenticio, cosmético y químico permitiendo la verificación de propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales, entre otras para los diferentes materiales obtenidos en el laboratorio. Un caso en particular se centra en la síntesis de NPs metálicas a las que se les otorga características propias según la naturaleza de cada elemento. Para las Ag-NPs y Cu_xO-NPs, muchos reportes científicos, demuestran que estos metales de transición se consideran antimicrobianos por si solos. Estas propiedades tienden a aumentar una vez que se da la formación de NPs debido a la relación superficie/volumen del nanomaterial. De acuerdo a lo anterior, los estudios microbiológicos de este tipo de materiales, se lleva a cabo la mayoría de las veces frente a cepas bacterianas gramnegativas y grampositivas (*Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*) y hongos (*Cándida albicans*), entre otros; con el objetivo de observar el comportamiento del material, es decir, si este presenta una alta o baja capacidad antimicrobiana frente dichos patógenos.

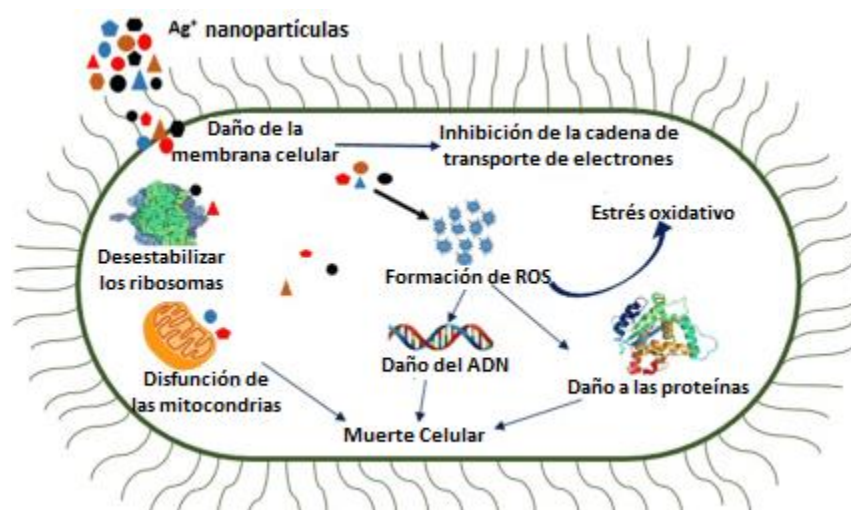
Por otro lado, se ha demostrado que la influencia del tamaño y la morfología de las NPs conlleva a la muerte celular, lo que indica que entre menor sea el diámetro de la forma del

Capítulo 2. Marco Teórico

nanomaterial es más factible que se dé la liberación de los iones dentro de la célula bacteriana permitiendo la inhibición del crecimiento del patógeno, debido a que entre menor es el tamaño de partícula, mayor será su área superficial [38].

Las bacterias gramnegativas están más propensas a la muerte celular cuando se encuentran expuestas a las Ag-NPs. Esto es debido a que las cepas gramnegativas se constituyen por una pared celular más delgada que las bacterias grampositivas, donde el rango de espesor se registra alrededor de ~ 8 nm y ~ 80 nm respectivamente. La pared celular de las bacterias gramnegativas se compone por una capa delgada de peptidoglicanos y por una recubierta de lipopolisacáridos que presentan una carga negativa. Mientras que las bacterias grampositivas están formadas por una capa gruesa de moléculas de peptidoglicano, lo que hace más difícil que las nanopartículas penetren la pared celular [39].

Actualmente, los estudios científicos relacionados las Ag-NPs han establecido que el mecanismo de acción de dichos metales se debe a la atracción electrostática entre las cargas positivas del nanomaterial y las moléculas que forman la pared celular. Además, existe una afinidad entre los iones de plata frente a las proteínas que contiene azufre, ya que los metales adheridos a la pared celular pueden intensificar la permeabilidad hacia la membrana citoplasmática e inducir la ruptura de la bacteria conllevando a la muerte de la misma [39].



Capítulo 2. Marco Teórico

Figura 12. Mecanismo de acción de las nanopartículas de plata en bacterias gramnegativas [39].

Para el caso de las Cu_xO -NPs, las investigaciones relacionadas exponen que estos nanomateriales presentan una mejor inhibición frente a cepas gramnegativas. Algunas de las razones se enlazan a la formación de moléculas ROS dentro de la célula, puesto que estas desencadenan el estrés oxidativo lo que puede conllevar a la muerte de *E. coli*. Mientras que, para las bacterias grampositivas, el grosor de la pared celular es mucho y las moléculas que la conforman como los carotenoides, favorecen a que la célula sea más difícil de penetrar protegiéndola del estrés oxidativo [40].

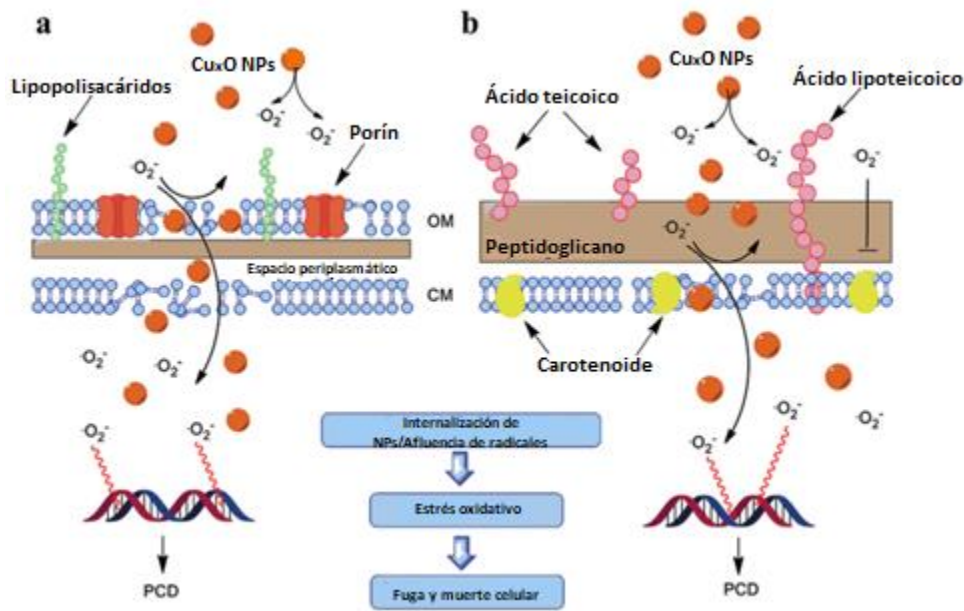


Figura 13. Mecanismo de acción de las Cu_xO -NPs en a) bacterias gramnegativas como *E. coli* y b) bacterias grampositivas como *S. aureus* [40].

Para llevar a cabo los análisis microbiológicos se debe tener en cuenta varios factores que favorezcan la obtención de resultados confiables y reproducibles. Estos factores están ligados a la manipulación adecuada de los materiales de laboratorio, medios de cultivo que estén en condiciones óptimas para el análisis, es decir, que los microorganismos se encuentren vivos y no contaminados al momento de realizar la siembra y, que los tiempos y temperaturas de preparación del agar hayan sido precisos para lograr una buena inoculación [41].

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1. Extracción e identificación de metabolitos secundarios.

Fecha: 31 de agosto de 2021

Lugar: Universidad Autónoma de Baja California (Mexicali, Baja California-México)

Tipos: Se realizó la recolección de cuatro (5) tipos de colores de la planta *Bugambilia glabra*: fucsias, rosadas, naranjas-amarillas, coloridas y rojas

3.1.1. Preparación de extractos de *Bugambilia*.

Las plantas se lavaron tres veces con agua y una vez con una solución de hipoclorito de sodio para eliminar la suciedad contenida en las hojas. Luego, se dejaron secando a temperatura ambiente por 24 horas, una vez secas, se realizó la preparación de los extractos, tomando 10 g de hojas por 100 mL de agua destilada o 100 mL de etanol. Se cubrieron con papel aluminio y se mantuvieron a temperatura ambiente por 24 horas. Por último, con un papel filtro Whatman (No. 42), los extractos se filtraron por gravedad, se almacenaron en frascos ámbar rotulados y se llevaron a refrigerar a 4 °C para su posterior análisis fitoquímico y síntesis verde de Ag-NPs y Cu_xO-NPs.

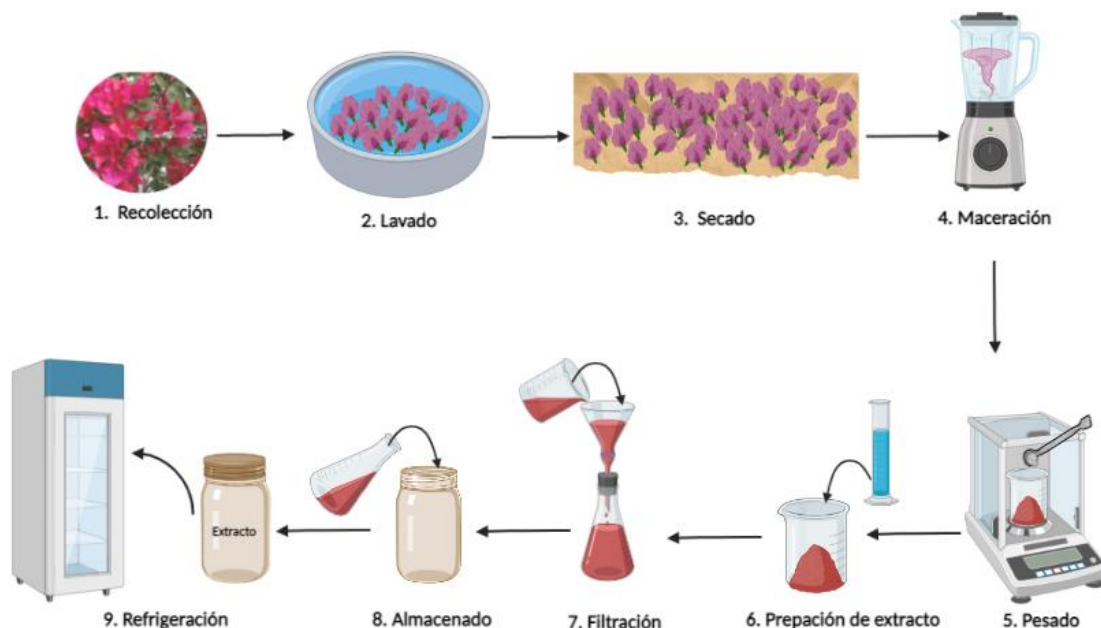


Figura 14. Proceso de preparación de los extractos para las flores de *Bugambilia glabra*.

3.1.2. Pruebas cualitativas.

En las pruebas cualitativas se emplearon reactivos específicos que permitieron la identificación de grupos funcionales que componen los principales metabolitos secundarios provenientes de las plantas. Para las pruebas, se adicionó 1.0 mL a 2.0 mL de extractos de las diferentes hojas en tubos de ensayo. Posteriormente, se añadieron unas cuantas gotas o cantidades establecidas de los reactivos indicadores en las soluciones acuosas y se observaron los cambios de colores para cada prueba. A continuación, se especifican los nombres de los reactivos y procedimientos llevados a cabo para cada análisis fitoquímico.

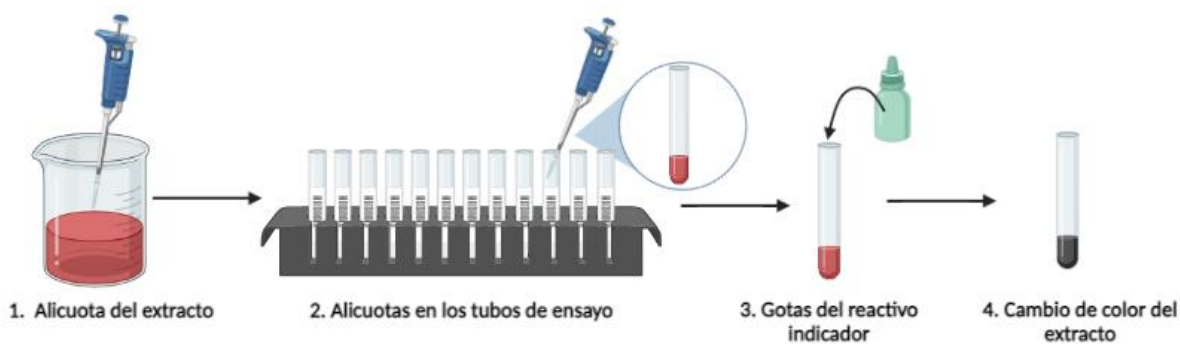


Figura 15. Metodología para la aplicación de las pruebas cualitativas al extracto de la planta *Bugambilia glabra*.

Alcaloides:

- **Prueba de Wagner:** Se adicionan unas cuantas gotas del reactivo de Wagner (yoduro de potasio), si se observa un precipitado café rojizo indica la presencia de alcaloides.
- **Prueba de Hager:** Se agrega unas gotas del reactivo de Hager (solución saturada de ácido pícrico). Si existe la presencia de alcaloides se formará un precipitado de color amarillo.

Capítulo 3. Metodología

- **Prueba de ácido tánico:** A 1.0 mL de extracto se debe adicionar 2 gotas de la solución de ácido tánico, la presencia de un precipitado amorfo o cristalino en la solución indica la existencia de alcaloides.

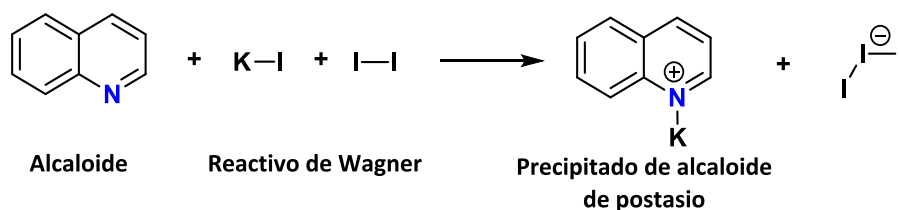


Figura 16. Esquema de reacción de la prueba de Wagner para alcaloide.

Flavonoides:

- **Prueba de NaOH:** A la cantidad de extracto seleccionado, se debe adicionar 2.0 mL de NaOH_(ac) y diluir con HCl. El cambio de color de amarillo-naranja a incoloro indica la presencia de flavonoides.
- **Prueba de H₂SO₄:** La fracción de extracto tomada, se le agrega H₂SO₄ concentrado, cuando se da un cambio de color de la solución a naranja se concluye que es positivo para flavonoides.
- **Prueba de amonio:** Adicionar algunas gotas de 1% de una solución de NH₄OH, se debe formar una coloración amarilla lo cual indica la aparición de flavonoides.

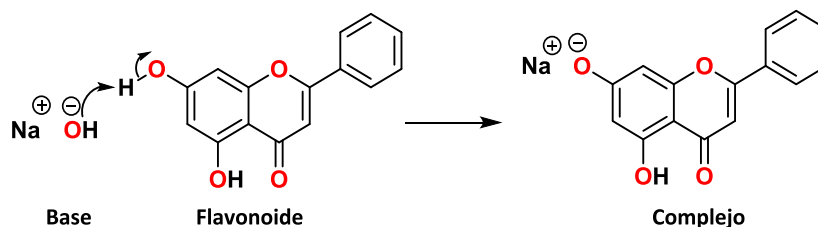


Figura 17. Esquema de reacción de la prueba de NaOH para flavonoide.

Capítulo 3. Metodología

Saponinas:

- **Prueba de Froth:** Tomar una cantidad específica del extracto y agitarlo vigorosamente por unos cuantos segundos para obtener una espuma persistente en la solución. Si la espuma se mantiene estable por unos segundos se establece positivo para saponinas.

Fenoles:

- **Prueba de Bayer:** Se debe adicionar al extracto 3 o 4 gotas de tricloruro férrico (FeCl_3). La formación de un color negro azulado en la solución indica la presencia de fenoles.

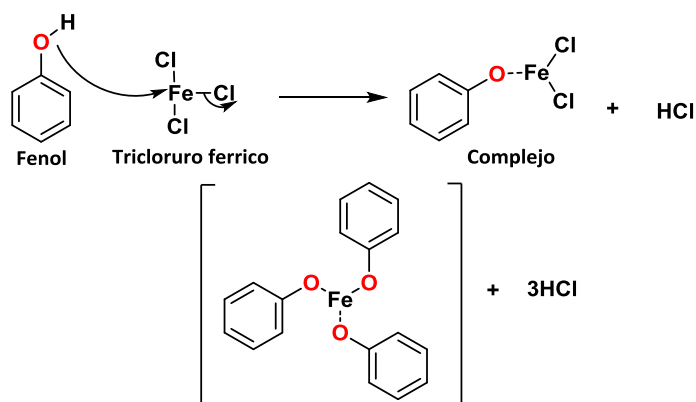


Figura 18. Esquema de reacción de la prueba de Bayer para fenoles.

Taninos:

- **Prueba de FeCl_3 :** Al extracto se le agregan algunas gotas de 0.1% de tricloruro férrico (FeCl_3). Para que indique la existencia de taninos, la solución debe cambiar de color a café verdoso o negro azulado.

Capítulo 3. Metodología

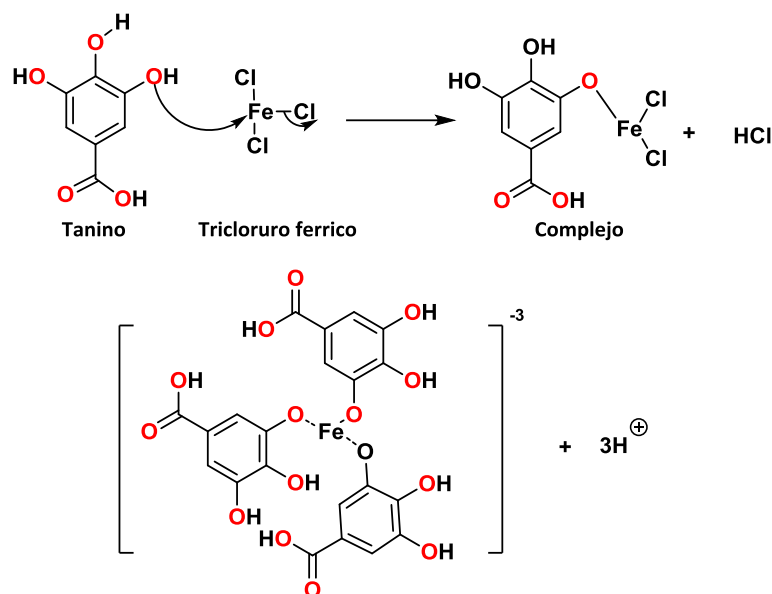


Figura 19. Esquema de reacción de la prueba de tricloruro férrico para taninos.

Esteroides:

- **Prueba de Salkowski:** Para 1.0 mL de extracto se debe adicionar 1.0 mL de cloroformo (CHCl_3) y 1.0 mL de H_2SO_4 . Posteriormente, se debe agitar la solución y observar la formación de una capa roja debido al cloroformo y una capa fluorescente amarilla-verdosa de la solución ácida; lo cual indica positivo para esteroides.

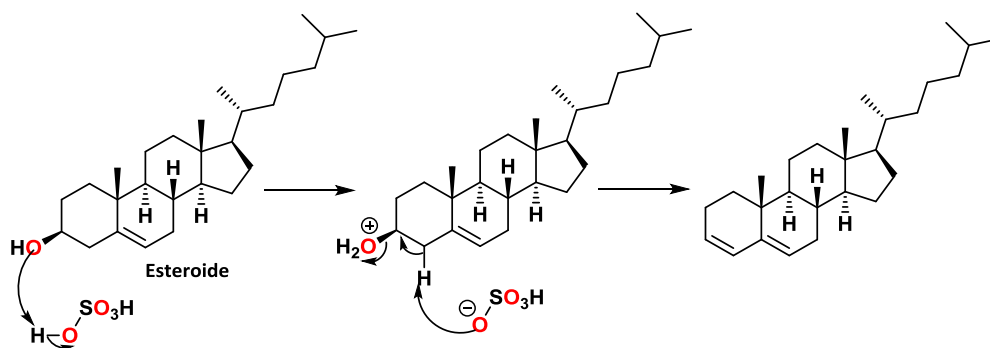


Figura 20. Esquema de reacción de la prueba de Salkowski para esteroides.

Capítulo 3. Metodología

Terpenos:

- **Prueba de terpenoides:** Tomar una cantidad exacta de extracto y disolver 1.0 mL de cloroformo (CHCl_3), se deja evaporar hasta sequedad (en caso de ser necesario utilizar calentamiento). Luego, se debe adicionar 1.0 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y calentar por 2 minutos. La formación de un color grisáceo en la muestra señala la presencia de terpenoides.

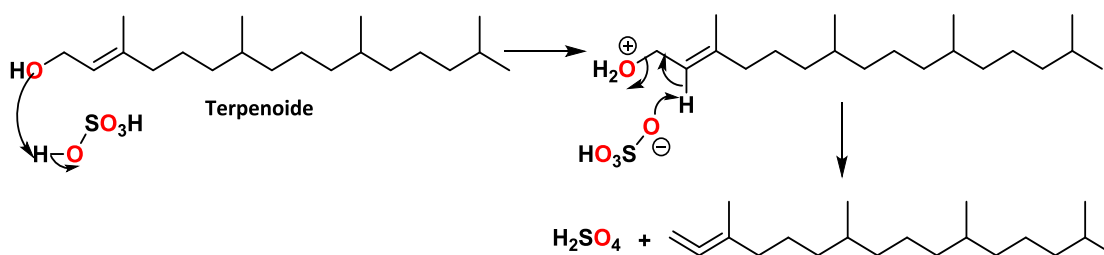


Figura 21. Esquema de reacción de la prueba ácida para terpenoides.

Antraquinonas:

- **Prueba de Bortrager:** Adicionar 5.0 mL de cloroformo (CHCl_3) al extracto, agitar por 5 minutos y filtrar la solución. Al filtrado, se le debe agregar 1.0 mL de una solución de hidróxido de amonio al 10% (v/v). El extracto debe convertirse a un color rosa, rojo o verde para establecer que la prueba es positiva para antraquinonas.

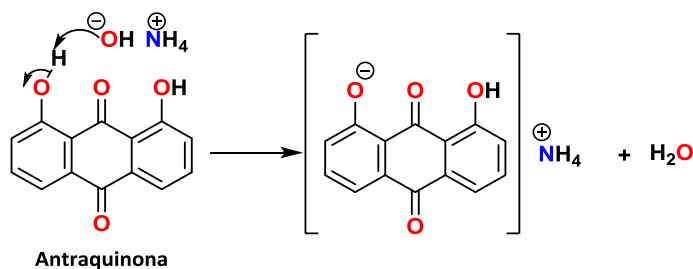


Figura 22. Esquema de reacción de la prueba de Bortrager para antraquinonas.

Capítulo 3. Metodología

Glicósidos cardiacos:

- **Prueba de Keller-Killani:** En un tubo de ensayo agregar 2.0 mL del extracto acuoso de *Bugambilia*, luego se debe agregar un 1.0 mL de ácido acético glacial con una gota de cloruro férrico. A la solución, se debe adicionar 1.0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Es importante observar los cambios en la mezcla, dado que si aparece un anillo marrón en la interfase corresponde a compuestos desoxiazucarados de los cardenólidos. Además, puede apreciarse un anillo violeta debajo del anillo marrón, y también, se puede visualizar una capa delgada de color verdoso en la fase del ácido acético indicando la presencia de glicósidos cardiacos.

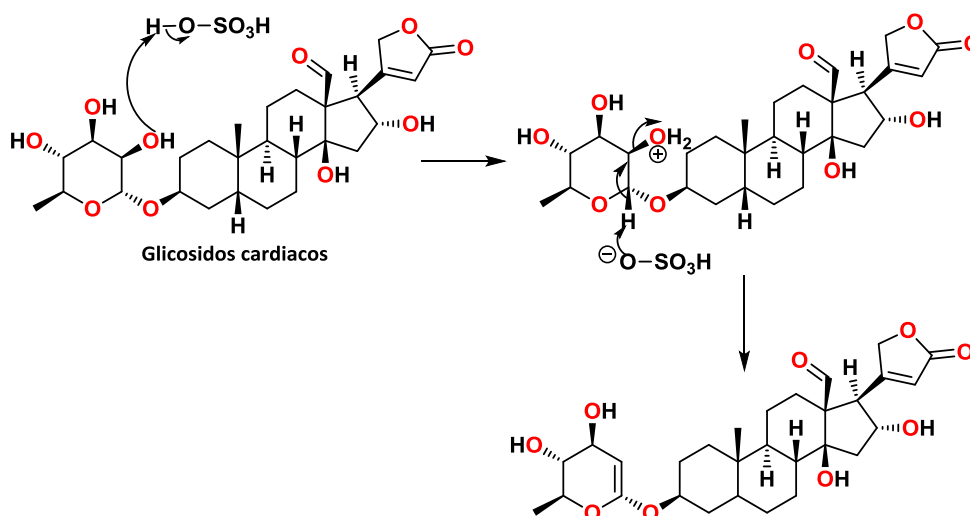


Figura 23. Esquema de reacción de la prueba de Keller-Killani para glicósidos cardiacos.

Quinonas:

- **Prueba de NaOH:** Adicionar unas cuantas gotas de NaOH al extracto. Si la solución cambia de color a azul verdoso o rojo, indica la presencia de quinonas.
- **Prueba de HCl:** Tomar una pequeña cantidad de extracto y agregarle HCl concentrado. Se debe observar la formación de un precipitado en el tubo de ensayo de color amarillo que establece la presencia de quinonas.

Capítulo 3. Metodología

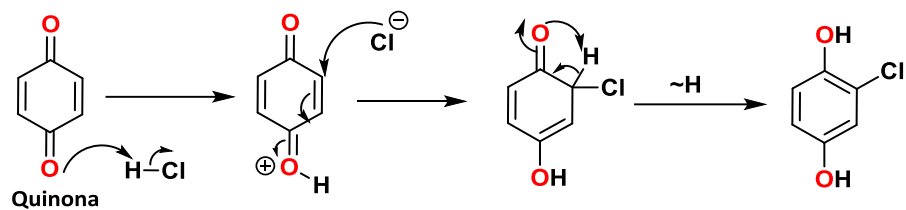


Figura 24. Esquema de reacción de la prueba de básico para quinonas.

Cumarinas:

- **Prueba de NaOH:** Al extracto se le debe adicionar unas gotas de una solución de NaOH al 10% (m/v) y unas gotas de cloroformo, hasta percibir un cambio de color de la solución a amarillo, lo cual manifiesta la existencia de cumarinas.

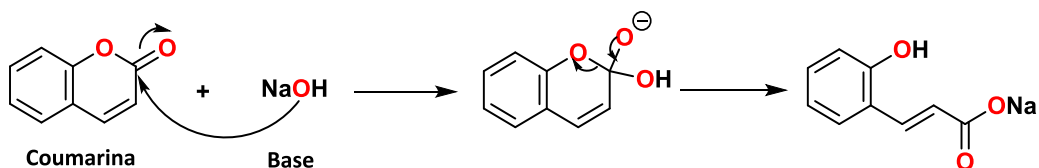


Figura 25. Esquema de reacción de la prueba de hidróxido de sodio para cumarinas.

Antocianinas:

- **Prueba de antocianinas:** Agregar a la cantidad de extracto establecida, 2.0 mL de una solución 2.0 N de HCl y amonio. El cambio de color de rosa-rojo a azul-violeta indica la presencia de antocianinas.

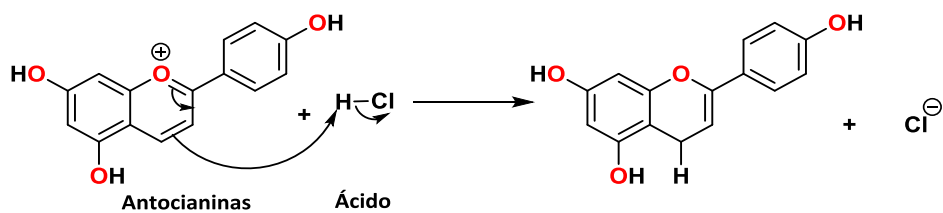


Figura 26. Esquema de reacción de la prueba de antocianinas.

Capítulo 3. Metodología

Carbohidratos:

- **Test de Benedict:** Adicionar 2.0 mL de extracto acuoso de *Bugambilia* en un tubo de ensayo, posteriormente, agregar unas cuantas gotas del reactivo de Benedict y colocar en calentamiento la mezcla hasta visualizar un precipitado de color rojo anaranjado que indica positivo para carbohidratos.

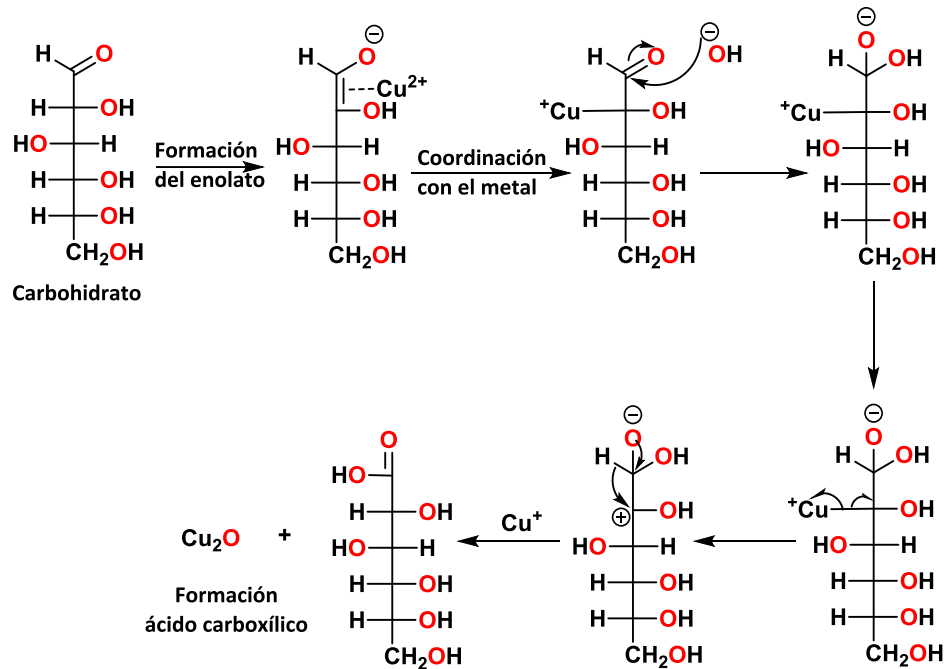


Figura 27. Esquema de reacción de la prueba de Benedict para carbohidratos.

Betacianinas:

- **Test de betacianinas:** Adicionar al extracto 1.0 mL de una solución 2.0 N de NaOH y calentar por un tiempo de 5 minutos a 100°C (precaución: reacción exotérmica). La formación de un color amarillo refleja la aparición de betacianinas.

Capítulo 3. Metodología

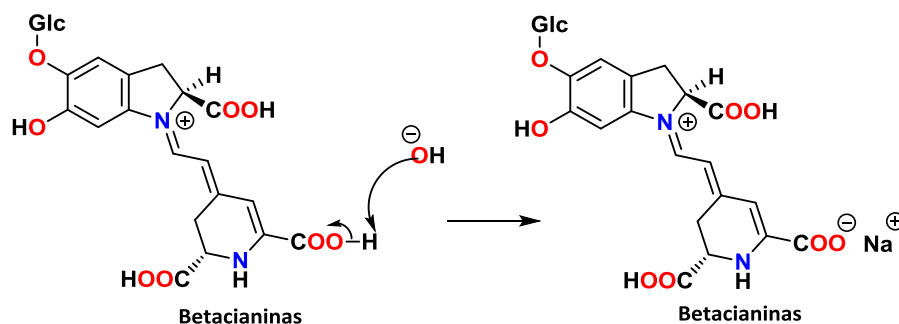


Figura 28. Esquema de reacción de la prueba básica para betacianinas.

3.1.3. Separación y purificación de los metabolitos secundarios de la *Bugambilia*.

3.1.3.1. Cromatografía en capa fina (TLC): La cromatografía en capa fina (TLC), brinda mayor información sobre el comportamiento de los metabolitos secundarios frente a solventes con diferentes polaridades. De este modo, se realizó TLC para los diferentes extractos etanólicos y acuosos de las flores de *Bugambilia* (fucsia, rosado, naranjas-amarillas y coloridas). Para este proceso, se tomó una cantidad específica de cada extracto con una capilar y se sembraron en placas pequeñas de TLC. Luego, cada placa se llevó dentro de cámaras cromatográficas que contenían distintas fases móviles con el objetivo de observar quien permite una mayor separación de los compuestos presentes en los extractos. Por último, todas las TLC se revelaron a través de una lámpara UV-Vis para determinar sus factores de retención y la separación entre ellos. Las fases móviles que se usaron para realizar el seguimiento de los extractos etanólicos y acuosos se presentan en la tabla 3 y 4.

Tabla 3. Fases móviles implementadas para la TLC de los extractos etanólicos.

No	Fase móvil	Proporción
1	Éter: AcOEt	2: 1
2	Éter: AcOEt	1: 3
3	Éter: AcOEt	1: 1
4	DCM: MeOH	1: 1

Capítulo 3. Metodología

Tabla 4. Fases móviles implementadas para la TLC de los extractos acuosos.

No	Fase móvil	Proporción
1	Éter: AcOEt	1: 4
2	Éter: MeOH	1: 4
3	DCM: MeOH	1: 2
4	DCM: MeOH	1: 3
5	DCM: MeOH	1: 4
6	DCM: MeOH	1: 5
7	DCM: AcOEt: MeOH	1: 2: 3

Las fases móviles que brindaron mayor separación de los compuestos presentes en los diferentes extractos son: extracto etanólico (éter: AcOEt (1:1)) y extracto acuoso (Diclorometano (DCM): MeOH (1:3)).

3.1.3.2. Cromatografía en columna de sílice gel: Para llevar a cabo la cromatografía en columna de sílice gel, se prepararon las fases móviles (eluyente) para los dos extractos etanólicos y acuosos, las cuales fueron éter: AcOEt (1:1) y DCM: MeOH (1:3) respectivamente. Estas se determinaron según lo demostrado en la TLC, ya que lograron mayor diferencia en los factores de retención (R_f) de los metabolitos secundarios de los extractos. Para la purificación se eligieron el extracto etanólico rosado y acuoso fucsia. De acuerdo a esto, para la realización de la cromatografía en columna por sílice gel se aplicó el siguiente procedimiento:

- a. Se midió la cantidad de sílice gel (Sigma-Aldrich) con tamaño de poro de 63-200 μm , la cual se adicionó a la columna con el objetivo de tomar la cantidad exacta para la purificación.
- b. De la cantidad medida de sílice (fase estacionaria), se escogió una cantidad pequeña y se realizó una cabeza de la muestra a purificar. Esta se adicionó a una caja Petri y se agregaron 12 mL de cada extracto tanto etanólico como acuoso, y se llevó a calentamiento ($\approx 72\text{ }^\circ\text{C}$) hasta total evaporación del solvente.

Capítulo 3. Metodología

- c. Posteriormente, se preparó la fase móvil éter: AcOEt (1:1) con un volumen de 200 mL de solvente total (100:100). Luego, se agregó una cantidad a la sílice con el objetivo de que se impregnará totalmente con la fase móvil.
- d. Se adicionó la mezcla de sílice gel y solvente a la columna, luego, se adicionó la cabeza con ayuda de un embudo de tallo largo. Posteriormente, se agregaron 5.0 mL de fase móvil (x3 veces) hasta que la cabeza se unificará con la fase estacionaria.
- e. Por último, se agregó la fase móvil en cantidades de 50 mL para comenzar el corrido de la columna y obtener la separación y purificación de los compuestos.
- f. Las muestras se recolectaron en tubos de ensayo rotulados y se realizó el seguimiento de la purificación por TLC utilizando las mismas fases móviles de la columna. Donde, las muestras con el mismo factor de retención se unieron en un balón de fondo redondo y se concentraron por presión reducida en el rotoevaporador.
- g. Los tubos con mismo el R_f para el extracto etanólico fueron: (5-7); (8); (9-10); (11-23); (33); (34-37) y (38-41). Y, para el extracto acuoso fueron: (3-5); (6); (7-17); (20-27); (28-29) y (31-34).

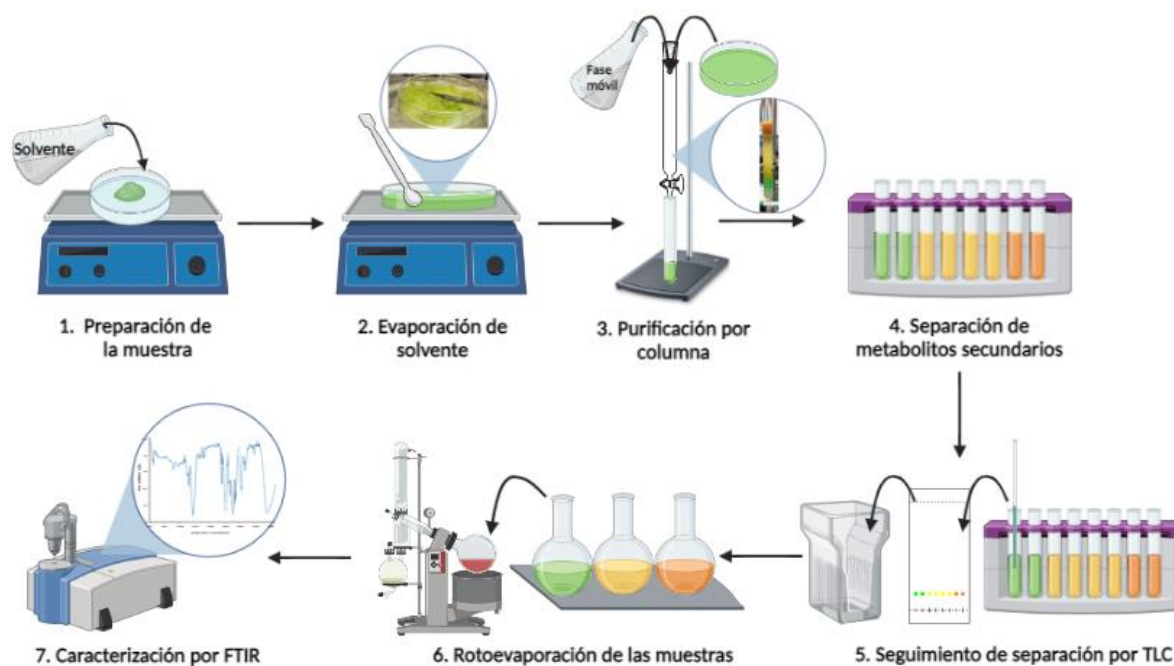


Figura 29. Preparación de la columna cromatográfica del extracto etanólico de la *Bugambilia glabra* rosada.

Capítulo 3. Metodología

3.1.3.3. Purificación por preparativa: La elaboración de la purificación de los compuestos por preparativa, se realizaron con el objetivo de separar aquellos que presentaron un factor de retención similares. Este tipo de procedimiento se llevó a cabo para los tubos de ensayo del extracto etanólico rosado, anteriormente purificado. A continuación, se especifica la metodología realizada.

- a. La muestra de los tubos (11-23) se disolvió en acetato de etilo.
- b. Se realizó TLC con diferentes fases móviles hasta obtener una separación óptima de los compuestos. De acuerdo a esto, la fase móvil indicada fue éter: AcOEt (1:4). Estas muestras fueron reveladas con una lámpara UV-Vis y reveladores colorimétricos como I_2 y $(KMnO_4)$. Por último, las fases móviles que se implementaron experimentalmente se pueden ver en la tabla 5.
- c. Después, se preparó la fase móvil éter: AcOEt (1:4) con una cantidad de 50 mL (40 mL AcOEt y 10 mL éter).
- d. La muestra se depositó en una placa cromatográfica (20x20) de sílice (60 F₂₅₄) con la ayuda de un capilar. La deposición se realizó tres veces (x3) y la muestra se dejó secar hasta la evaporación total del solvente.
- e. La fase móvil se agregó a la cámara cromatográfica y se colocó la preparativa dentro de esta para comenzar el corrimiento de la muestra. Este procedimiento se llevó a cabo por un tiempo de 2.5 horas.
- f. Finalizado el tiempo, la preparativa se reveló con lámpara de UV-Vis, identificando los factores de retención de cada compuesto en la muestra. Estos se señalaron y se enumeraron en orden descendente para su obtención.
- g. Para la obtención de los compuestos, se rasparon en la sílice donde se enumeraron cada uno. Posteriormente, el polvo de sílice se adicionó a un vaso de precipitados y se disolvieron las muestras con metanol. Para esto, se utilizaron filtros de 0.22 μ m, buscando eliminar la sílice y poder recolectar el compuesto totalmente limpio.
- h. Una vez terminado el proceso de filtración, las muestras se llevaron a rotoevaporación para eliminar el solvente. Luego, los compuestos se adicionaron en frascos ámbar rotulados y se almacenan para su posterior caracterización.

Capítulo 3. Metodología

Tabla 5. Fases móviles implementadas para la TLC de los tubos (11-23).

No	Fase móvil	Proporción
1	Éter: AcOEt	1: 1
2	Éter: AcOEt	1: 4
3	Éter: AcOEt	1: 3
4	DCM: MeOH	1: 1

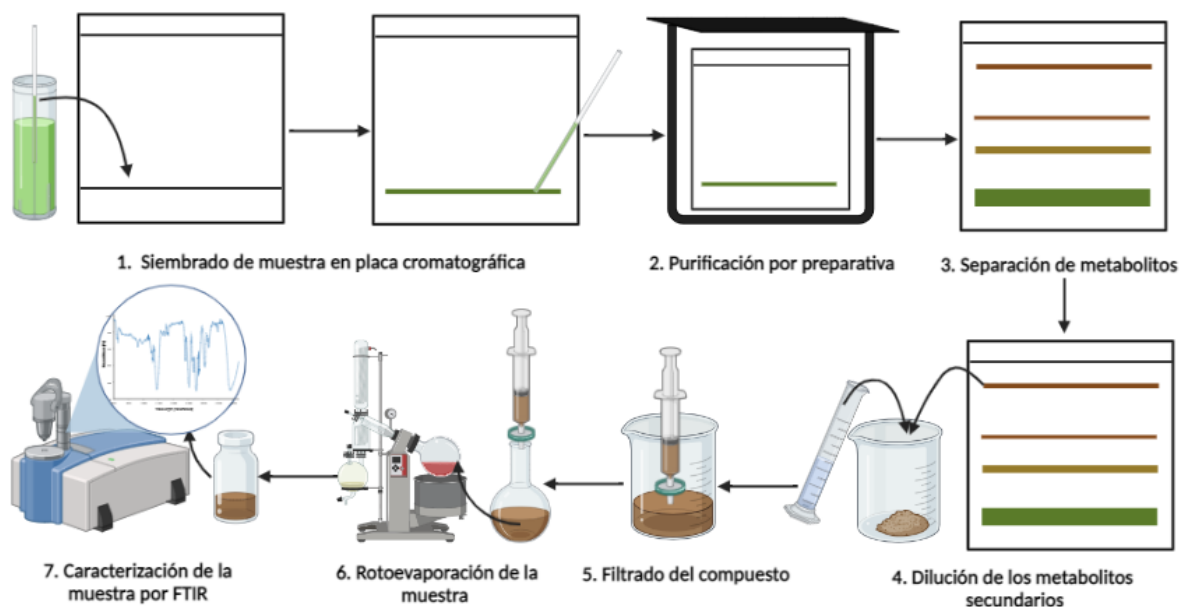


Figura 30. Metodología general para la purificación por preparativa de los metabolitos secundarios de la planta *Bugambilia glabra*.

3.2. Síntesis verde de NPs

Para la síntesis verde de NPs se trabajó con los extractos acuosos de las plantas de *Bugambilia glabra* rojas y con soluciones de AgNO_3 y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como precursores metálicos para la obtención de Ag-NPs y Cu_xO -NPs respectivamente.

3.2.1. Síntesis verde de Ag-NPs

La metodología de síntesis para la formación de Ag-NPs se basó en adicionar 10 mL de una solución 1.0 mM de AgNO_3 en un vaso de precipitado, el cual se cubrieron sus paredes con papel aluminio para evitar daños por fotosensibilidad. Posteriormente, la solución se dejó

Capítulo 3. Metodología

a temperatura ambiente y con agitación constante por 5 minutos. Luego se agregó con la ayuda de un capilar y pipeta Pasteur una gota de extracto acuoso de las flores de *Bugambilia* rojas con un tiempo de reacción de 1 hora y 3 horas; cabe resaltar, que estos tiempos se llevaron a cabo para las dos metodologías de la gota extracto. Después de transcurrida la duración de la reacción, las soluciones coloidales se filtraron por gravedad con papel de filtro Whatman No.42 y se guardaron en tubos Falcon rotulados y cubiertos con papel aluminio para su posterior caracterización por UV-Vis, FT-IR, DLS, SEM y EDS. A continuación, se presentan las condiciones de reacción llevadas a cabo para las diferentes metodologías de síntesis verde de las Ag-NPs (ver tabla 6).

Tabla 6. Formación de nanopartículas de plata con el extracto acuoso de *Bugambilia rojas*.

Muestras de AgNO_3 (1.0 mM)	Cantidad de AgNO_3 (mL)	Gotas de extracto acuoso de <i>Bugambilia</i>	Tiempo de reacción (h)
1	10	1 (gotero)	1
2	10	1 (gotero)	3
3	10	1 (capilar)	1
4	10	1 (capilar)	3

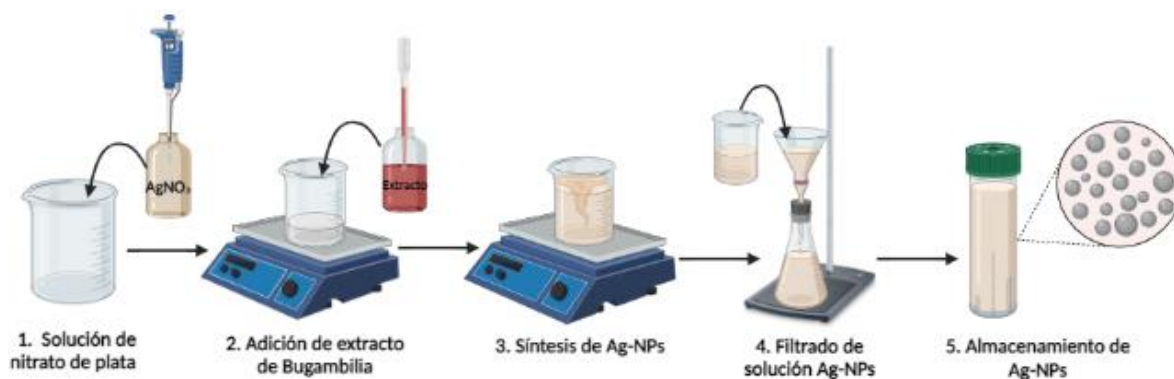


Figura 31. Metodología de síntesis de las Ag-NPs utilizando como precursor AgNO_3 .

Capítulo 3. Metodología

3.2.2. Síntesis verde de Cu_xO -NPs

La metodología consistió en tomar una alícuota de 20 mL de una solución 1.0 mM de sulfato de cobre pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ el cual se agregó a un vaso de precipitado y se colocó en agitación constante. Después se adicionaron 5 gotas del extracto acuoso de *Bugambilia* rojas y se dejó reaccionando a temperatura ambiente con agitación constante por un tiempo de 30 min. Inmediatamente, se procedió a la filtración de la reacción por gravedad utilizando papel filtro Walmart No.42. La solución se guardó por 24 horas en tubos de ensayo rotulados y sellados. Una vez se culminó el tiempo, la solución de NPs se le midió la estabilidad coloidal, la cual arrojó un valor de 16 mV considerándose inestable, debido a esto se tomó una alícuota de 10 mL de solución y se le agregó 1.0 gota de tween-80 llevándose a calentamiento por 1 hora a 80°C con agitación constante. Por último, se filtró por gravedad y se almacenaron las soluciones coloidales en tubos de ensayo rotulados para su próxima caracterización y realización de pruebas microbiológicas (ver figura 32).

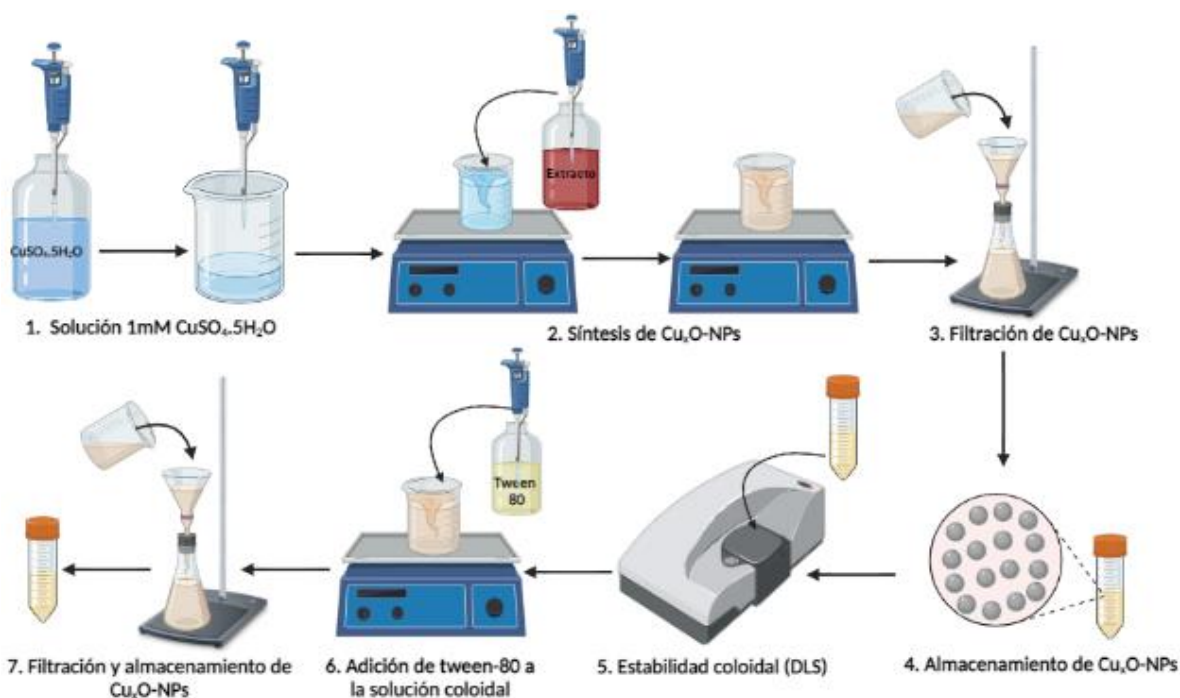


Figura 15. Metodología de síntesis de Cu_xO -NPs utilizando como precursor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Capítulo 3. Metodología

3.3. Caracterización de los extractos de *Bugambilia glabra* y Ag-NPs y Cu_xO-NPs

La caracterización de los metabolitos secundarios obtenidos por cromatografía en sílice gel, preparativa y las Ag-NPs y Cu_xO-NPs se realizaron con las siguientes técnicas.

3.3.1. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

Para corroborar la existencia de los grupos funcionales presentes en los metabolitos secundarios y la funcionalización de las Ag-NPs y Cu_xO-NPs, se realizó FT-IR para las diferentes muestras. Las mediciones se realizaron en un espectrómetro FT-IR (Perkin Elmer Frontier), para ello se depositó una gota del extracto en el cristal del aditamento ATR (Attenuated Total Reflectance). Luego, se esperó un tiempo determinado hasta la evaporación del solvente. Posteriormente, la muestra fue analizada en un rango de longitud de onda de 4000 a 400 cm⁻¹ a una velocidad de paso de 0.5 cm⁻¹.

3.3.2. Espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia UV-Vis se implementó para comprobar la existencia de las NPs metálicas en las soluciones coloidales. Para esto, se tomó una alícuota de 1.0 mL de agua destilada determinada como blanco y se agregó en una celda de cuarzo con dimensiones de (1 cm x 1 cm) que se introduce en un espectrofotómetro de la marca Shimadzu UV-2600, para correr una línea base en un rango de longitud de onda de 200 a 800 nm. Una vez establecido el blanco, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, para la determinación de las longitudes de onda donde absorben las soluciones coloidales, para corroborar los rangos obtenidos con los datos establecidos en la literatura.

3.3.3. Dispersión de luz dinámica (DLS)

Para la caracterización por DLS, se realizó la medición de la distribución de tamaño de partícula y la estabilidad coloidal de las soluciones estableciendo un rango de 2 a 500 nm teniendo en cuenta el radio hidrodinámico de la muestra. Para este proceso, se agregó una alícuota de 1.0 mL de las muestras en un porta muestras y se colocaron en el equipo de DLS Nanotracs Wave II, luego, se introdujeron los parámetros requeridos para llevar a cabo la medición.

Capítulo 3. Metodología

3.3.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La determinación del tamaño y forma de las Ag-NPs y Cu_xO-NPs realizó por SEM. Para esto, se tomaron 1.5 mL de las soluciones coloidales y se llevaron a centrifugación por 10 minutos a una velocidad de 12,500 rpm. Una vez terminado el tiempo, se retiró el sobrenadante y se agregó agua destilada, este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, las muestras obtenidas se analizaron en un microscopio (FIB-SEM; LYRA 3, Tescan), donde se tomó una gota de cada solución coloidal, y se dispusieron en un portaobjetos de grafito. El solvente se dejó evaporar y se procedió al análisis.

3.3.5. Espectroscopía de rayos-X de energía dispersiva (EDS)

La determinación de la composición química de las Ag-NPs y Cu_xO-NPs se realizó por detector de rayos X, integrado en SEM Tescan. Esta técnica proporcionó información sobre la composición elemental de la muestra y semi-cuantitativa sobre la concentración en la que se encuentra cada elemento en el nanomaterial

3.4. Análisis microbiológicos de Ag-NPs y Cu_xO-NPs a través de síntesis verde de extractos de *Bugambilia*

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de las Ag-NPs y Cu_xO-NPs, se llevaron a cabo las pruebas frente a bacterias gramnegativas y grampositivas. Para este estudio en particular los microorganismos implementados fueron: *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 25923). El método empleado se basó en la técnica de difusión en agar con el objetivo de observar la capacidad bactericida de las NPs frente a dichas cepas bacterianas. Para las pruebas de difusión en agar de cada muestra de Ag-NPs etiquetadas como: M1_{Ag}, M2_{Ag}, M3_{Ag} y M4_{Ag}, se evaluaron por triplicado, obteniendo las mediciones de los halos de inhibición, posteriormente se evaluaron los datos y se graficaron en el programa (Graph Pad Prism Versión 8). Para las Cu_xO-NPs etiquetadas como M2_{CuO} y M4_{CuO} se realizó el mismo ensayo por duplicado para observar la formación de halos de inhibición, concentrándonos en estas Cu_xO-NPs, pues fueron las que mostraron una mayor capacidad de inhibición bacteriana.

Capítulo 3. Metodología

3.4.1. Metodología para la preparación de las muestras para difusión en agar

Para la preparación del medio de cultivo, se colocó a esterilizar el agar nutritivo (BD Bioxon, México) por un tiempo de 30 min) con una presión de 15 psi en la autoclave. Una vez terminado el proceso, se vertieron 15.0 mL del agar nutritivo en cajas Petri y se dejaron en campana de extracción por 24 horas, para culminar su proceso de gelificación. Posteriormente, se efectuó la inoculación de las bacterias de *E. coli* y *S. aureus* para el cual se llevó a cabo un procedimiento estandarizado, que consistió en tomar 40 μ L de cada caldo de bacterias para cada muestra de solución coloidal de NPs. Luego, se adicionaron 1.0 mL de caldo de soya en un tubo Eppendorf y se agregó una colonia aislada de bacterias (máximo 3 colonias) para garantizar la pureza del cultivo. Es importante resaltar, que por cada colonia de bacterias aisladas se debió esterilizar el material utilizado. Por último, se tomaron 10 μ L de cada caldo de bacterias y se mezclaron con 900 μ L de caldo de soya en un tubo Eppendorf. Una vez se establecieron las concentraciones del caldo de bacterias, se procedió a determinar la densidad óptica de los inóculos. Donde, deben estar aproximadas a 0.1 para conocer la cantidad de colonias de bacterias que deben ser sembradas en los medios. De este modo, se tomó la densidad óptica del blanco que en este caso es el caldo de soya; una vez estipulado el valor, se determina la concentración de bacterias en 1.0 mL de caldo. Las condiciones del equipo para las mediciones son las siguientes:

- Longitud de onda para las bacterias: 600 nm
- Modo de medición: UV-Vis

Seguidamente, se procedió a la centrifugación de los inóculos de las diferentes bacterias (*E. coli* y *S. aureus*) a una velocidad de 4000 rpm por un tiempo de 5 minutos (min). Luego, se retiraron los sobrenadantes del medio para dejar los precipitados de las bacterias. A estos inóculos, se les adicionaron un 1.0 mL de PBS y se mezclaron las muestras hasta observar homogeneidad. Esta metodología se llevó a cabo tres veces para garantizar la pureza del caldo. Una vez se realizaron los procesos de centrifugación, se ajustaron nuevamente la densidad óptica de los inóculos a 0.05.

Capítulo 3. Metodología

Por último, el proceso sembrado de las Ag-NPs y Cu_xO-NPs consistió en estriar el agar nutritivo con las bacterias de *E. coli* y *S. aureus*. Luego, con la ayuda de unas puntillas limpias se hicieron 4 pozos distribuidos en zonas iguales de cada caja Petri compuesta por el medio y las bacterias. Seguidamente, se agregaron por cada pozo 40 µL de las soluciones coloidales de nanopartículas y se dejaron en reposo por 1 hora para que el agar pueda absorber las muestras correctamente. Una vez transcurrido el tiempo, las siembras se colocaron en incubación por 24 horas, donde se observó si presentaron potencial antibacteriano a través de la medición de los halos.



Figura 16. Metodología general de las pruebas microbiológicas para las Ag-NPs y Cu_xO-NPs frente a bacterias de *E. coli* y *S. aureus*.

CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Identificación de los metabolitos secundarios de la *Bugambilia*

Los reportes científicos han demostrado que la flor de papel conocida también como *Bugambilia* está compuesta por una variedad de metabolitos secundarios que le dan ciertas propiedades a la planta, como ya se ha mencionado anteriormente. Se realizaron varios análisis que permitieron la identificación de los compuestos presentes en la planta y sus posibles grupos funcionales que los componen, con el objetivo de reconocer como se llevaría a cabo una posible reacción redox ente los metabolitos secundarios y los cationes metálicos para la formación de NPs y que grupos podrían estar implicados tanto en las reacciones como en la actividad biológica de los nuevos nanomateriales. A continuación, se exponen los resultados obtenidos a través de las pruebas cualitativas realizadas a los extractos acuosos de la plata y la caracterización por FT-IR de los compuestos purificados por columna en sílice gel y preparativa.

4.1.1. Pruebas Cualitativas

Las pruebas cualitativas realizadas a los extractos etanólicos y acuosos de la planta *Bugambilia* (fucsias, rosadas, naranjas y coloridas) mostraron resultados similares a los reportados en la literatura. Estos ensayos indicaron la presencia de compuestos que aportan importantes propiedades terapéuticas a la planta, además, contribuyen al color característico de cada una. Para el caso de los extractos etanólicos, los reactivos indicadores implementados lograron manifestar la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, antraquinonas, quinonas, cumarinas, carbohidratos y betacianinas (ver tabla 7). Por otro lado, los extractos acuosos, arrojaron resultados positivos a compuesto como alcaloides, flavonoides, saponinas, fenoles, taninos, terpenoides y carbohidratos (ver tabla 8). Sin embargo, se evidenció la ausencia de metabolitos secundarios en ambos extractos como esteroides, glicósidos cardiacos y antocianinas. De acuerdo a lo anterior, aunque existen similitudes en los resultados obtenidos en ambas muestras, no se tiene certeza alguna de la cantidad específica de los compuestos químicos y que sus estructuras en ambos casos sean las mismas, ya que puede haber variación en sus grupos funcionales.

Capítulo 4. Análisis de Resultados

Afortunadamente, estas ligeras variaciones no afectaron en la síntesis de las NPs ni en el control de los parámetros fisicoquímicos buscados en los nanomateriales desarrollados.

Tabla 7. Resultados de las pruebas cualitativas para los extractos etanólicos de las plantas de *Bugambilia glabra*.

Fitocompuestos	Prueba	Etanol			
		Fucsia	Rosadas	Naranjas	Coloridas
Alcaloides	Wagner	+	+	+	+
	Hager	+	+	+	+
	Ácido tánico	±	±	±	±
Flavonoides	NaOH	+	+	+	+
Saponinas	Froth	-	-	-	-
Fenoles	Bayer	+	+	+	+
Taninos	FeCl ₃	+	+	+	+
Esteroides	Salkowski	-	-	-	+
Terpenoides	Terpenoides	-	-	-	-
Antraquinonas	Borntrager	+	+	+	+
Glicósidos cardiacos	Keller-Killani	-	-	-	-
Quinonas	NaOH	+	+	+	+
Coumarinas	NaOH	+	+	+	+
Antocianinas	Antocianinas	-	-	-	-
Carbohidratos	Benedict	+	+	+	+
Betacianinas	Betacianinas	+	+	+	+

Tabla 8. Resultados de las pruebas cualitativas para los extractos acuosos de las plantas de *Bugambilia glabra*.

Fitocompuestos	Prueba	Acuoso			
		Fucsia	Rosadas	Naranjas	Coloridas
Alcaloides	Wagner	+	+	+	+
	Hager	+	+	+	+
Flavonoides	NaOH	+	+	+	+
Saponinas	Froth	+	+	+	+
Fenoles	Bayer	+	+	+	+
Taninos	FeCl ₃	+	+	+	+
Esteroides	Salkowski	-	-	-	-
Terpenoides	Terpenoides	+	X	X	X
Antraquinonas	Borntrager	-	-	-	-
Glicósidos cardiacos	Keller-Killani	-	-	-	-
Quinonas	NaOH	-	-	-	-
Coumarinas	NaOH	-	-	-	-
Antocianinas	Antocianinas	-	-	-	-
Carbohidratos	Benedict	+	+	+	+

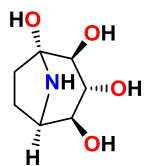
Capítulo 4. Análisis de Resultados

Betacianinas	Betacianinas	-	-	-	-
--------------	--------------	---	---	---	---

La mayoría de los metabolitos secundarios que componen la planta se consideran con altos potenciales de inhibición frente a microorganismos o para tratamientos de enfermedades crónicas o degenerativas como lo son: la diabetes, el Alzheimer, el cáncer, las enfermedades respiratorias y cardiovasculares, entre otros [10]. A partir de esto, se permite hacer un enlace entre algunos productos naturales identificados en las pruebas cualitativas de la *Bugambilia glabra* con los reportados en la literatura, haciendo énfasis en sus propiedades biológicas. Para el caso de los alcaloides, se encuentra la calistegina B2, considerada como un antimicrobiano [10]. Por otro lado, uno de los metabolitos secundarios con mayor índice de concentración en la planta son los flavonoides con más de 45 compuestos reportados. En nuestras pruebas cualitativas, se obtuvieron resultados positivos tanto para el extracto acuoso como el etanólico, demostrando la existencia de dichos productos naturales. Un ejemplo claro, es el de la quercetina la cual se reconoce como un antiinflamatorio [13]. Otro compuesto presente son los fenoles, como el ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido coumarico, etc.; estos tienden a acelerar la eliminación de los radicales libres en el cuerpo, comportándose como excelentes antioxidantes [10]. También, los resultados arrojaron positivo para betacianinas, las cuales son las encargadas del color característico de cada bráctea de las plantas. Estas contienen alcaloides en su estructura y son derivadas de las betalaínas, se pueden descomponer si se encuentran expuestas por tiempos prolongados a la luz y/o temperaturas extremas. La mayoría de estos compuestos químicos manifiestan actividades antimicrobianas, anticancerígenas y antioxidantes como es el caso de la gonfrenina I [42]. Otros metabolitos que se exhiben en los resultados son los terpenoides, que, según los reportes científicos, estas moléculas aisladas de la *Bugambilia glabra* se caracterizan por manifestar actividades antibacterianas *in vitro*. Entre los compuestos más comunes con dichas propiedades están el fitol y el escualeno [10].

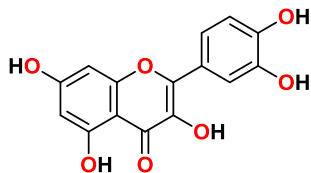
Capítulo 4. Análisis de Resultados

-Alcaloides



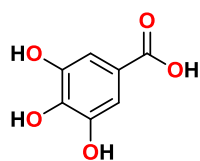
Calistegina B2

- Flavonoides

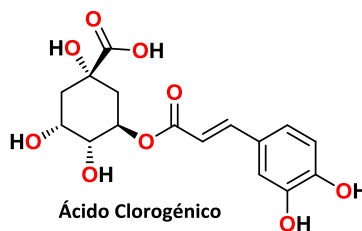


Quercetina

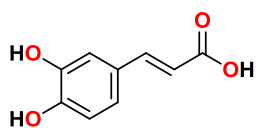
-Fenoles



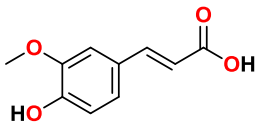
Ácido gálico



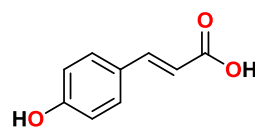
Ácido Clorogénico



Ácido cafeico

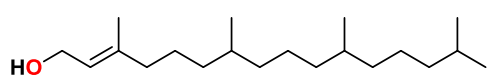


Ácido Ferúlico

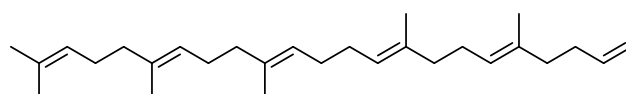


Ácido coumarico

-Terpenoides

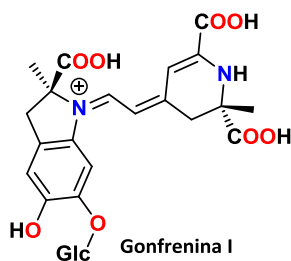


Fitol



Escualeno

-Betacianinas



Gonfrenina I

Figura 17. Estructuras químicas de los posibles metabolitos secundarios presentes en la planta de *Bugambilia glabra*.

Capítulo 4. Análisis de Resultados

La variación de los productos naturales revelados en cada extracto de la planta se debe a la composición química de cada metabolito secundario, es decir, los diferentes grupos funcionales que los componen tienen distintas polaridades permitiendo que sean más o menos solubles en etanol y agua. Además, le brindan propiedades específicas a la flor capaces de actuar como agentes reductores de metales debido a la cantidad de grupos hidroxilos, carbonilos, aminas, entre otros; que la conforman. Además, estos compuestos son los encargados de donar y aceptar electrones permitiendo que se lleven a cabo las reacciones de óxido-reducción de manera rápida sin necesidad de implementar otro tipo de reactivos químicos que conllevan a residuos tóxicos, como es el caso del borohidruro de sodio (NaBH_4).

4.1.2. Obtención de metabolitos secundarios por purificación.

El proceso de purificación por sílice gel y preparativa de los extractos de la *Bugambilia glabra* manifestó que los cuatro extractos etanólicos y acuosos de las flores fucsias, rosadas, naranjas y coloridas poseen metabolitos secundarios, con los mismos factores de retención al entrar en contacto con la fase estacionaria y fase móvil. Esto se demostró a través de un seguimiento de los compuestos por medio de TLC. Sin embargo, los factores de retención de los compuestos no pueden demostrar si estos presentan la misma estructura química, o si se encuentran solapados entre sí. Es decir, debido a la reactividad de sus grupos funcionales pueden variar su estereoquímica y estereoselectividad, lo que conlleva a la suposición que existen más metabolitos secundarios que no se pueden observar o revelar por medio de una lámpara UV-Vis o reactivos colorimétricos. A continuación, se ilustra la placa de seguimiento de TLC de los extractos etanólicos y acuosos de la planta *Bugambilia* (ver figura 35).

Capítulo 4. Análisis de Resultados

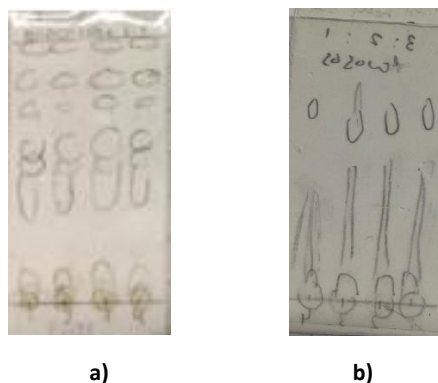
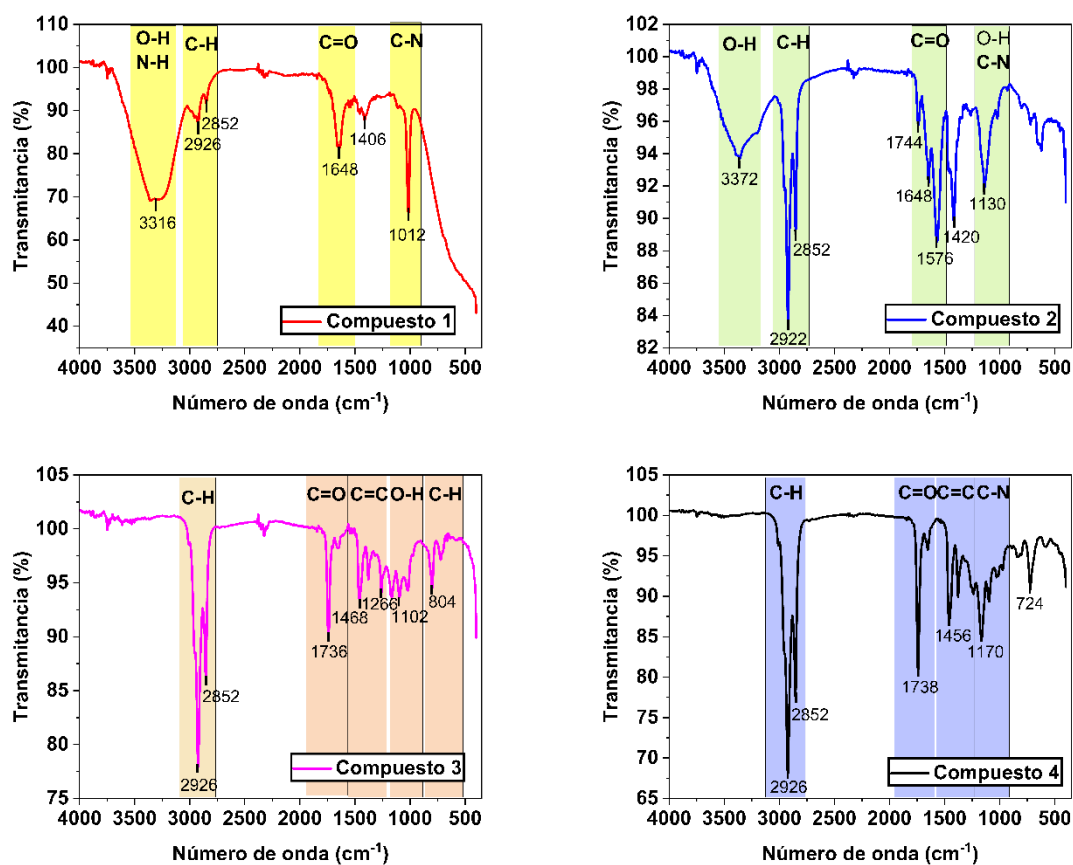


Figura 18. Seguimiento por TLC de la separación de los metabolitos secundarios en los extractos de *Bugambilia glabra* a) etanólicos y b) acuosos; donde 1) fucsias, 2) rosadas, 3) naranjas y 4) coloridas.

4.1.3. Caracterización por FT-IR de los metabolitos secundarios de la *Bugambilia glabra*

La caracterización de los compuestos obtenidos por purificación en columna de sílice gel y preparativas se realizaron a través de FT-IR. Además, cabe resaltar que los espectros de FT-IR no permiten elucidar de manera concreta la estructura química correspondiente a cada muestra, solo nos proporciona información de manera general de los posibles grupos funcionales que conforman cada compuesto químico presente en la flor *Bugambilia glabra*. Este hecho nos favorece al momento de interpretar el proceso de reducción entre el extracto y los metales, debido a que se puede conocer los grupos funcionales que conllevan a la reducción metálica. De acuerdo lo anterior, se trae a colación los diferentes espectros FT-IR de los analitos purificados (ver gráficas 1 y 2).

Capítulo 4. Análisis de Resultados



Gráfica 1. Espectros FT-IR de los metabolitos secundarios purificados a través de preparativa.

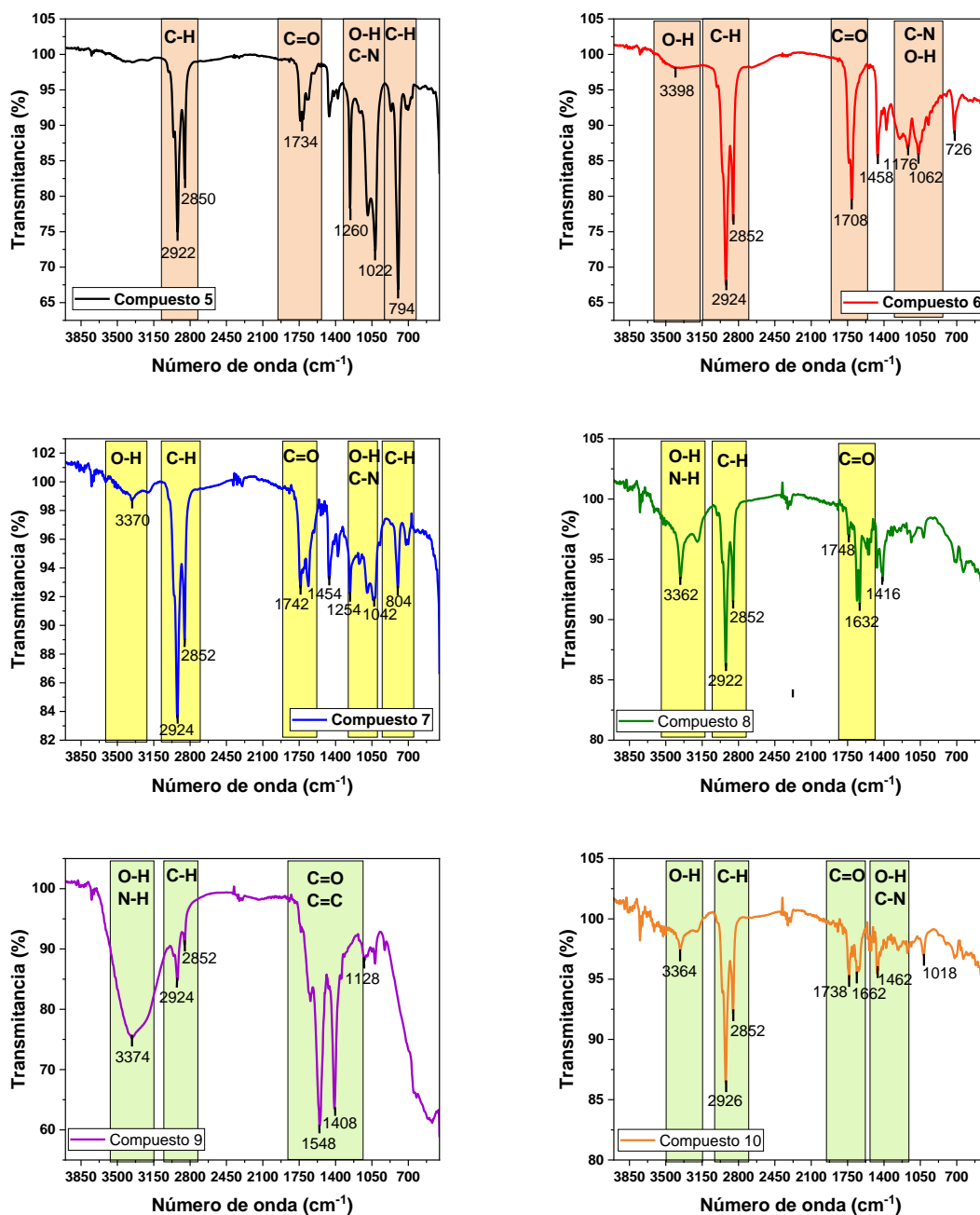
Los espectros FT-IR representados en la gráfica 1, muestra picos específicos para diferentes grupos funcionales que componen las estructuras químicas de las muestras analizadas. De este modo, para los compuestos 1 y 2, se especifican bandas anchas entre 3316 a 3372 cm⁻¹ características de grupos hidroxilos (-OH) para modos vibracionales de tensión [43]. Por otro lado, para los cuatro compuestos, se evidencia señales en 2926 y 2852 cm⁻¹ específicas de los grupos CH que se relaciona con el modo de vibración de extensión asimétrica [43]. Los números de onda en aproximadamente 1744 a 1576 cm⁻¹ confirma la posible presencia de un grupo carbonilo (C=O) en la estructura química de los cuatro compuestos analizados; aunque no se puede establecer con certeza a que grupo funcional corresponde, teniendo en cuenta las pruebas cualitativas se podría asociar a carbonilos de esteres, cetonas o ácido carboxílicos. Para los picos visualizados en el rango de 1500 a 1400 cm⁻¹ pueden relacionarse

Capítulo 4. Análisis de Resultados

a dobles enlaces pertenecientes a grupos aromáticos, posiblemente de los metabolitos secundarios como flavonoides y/o fenoles.

Para el caso de los espectros de los compuestos 3 y 4, tienden presentar similitudes en los números de onda de sus picos, por lo que se puede observar señales en 2926 y 2852 cm^{-1} asociadas a movimiento de extensión asimétrica de los enlaces (C-H) de los grupos metilos y/o metilenos [43]. Además, presenta un pico delgado en 1576 cm^{-1} el cual se relaciona con la extensión de un grupo carbonilo (C=O). Por lo que se puede sugerir, que los compuestos químicos representados en dicho espectro pueden comprender la misma estructura orgánica o tener variaciones en sus sustituyentes.

Capítulo 4. Análisis de Resultados



Gráfica 2. Espectros FT-IR de los metabolitos secundarios purificados a través de columna en sílice gel.

Los espectros FT-IR de la gráfica 2, están ligados a los metabolitos secundarios de los extractos purificados por columna en sílice gel, por lo que se aclara que muchas de estas muestras analizadas son mezclas de varios compuestos. De acuerdo a esto, se puede observar que los espectros pertenecientes a los compuestos 5, 6, 7 y 8 tienen picos similares

Capítulo 4. Análisis de Resultados

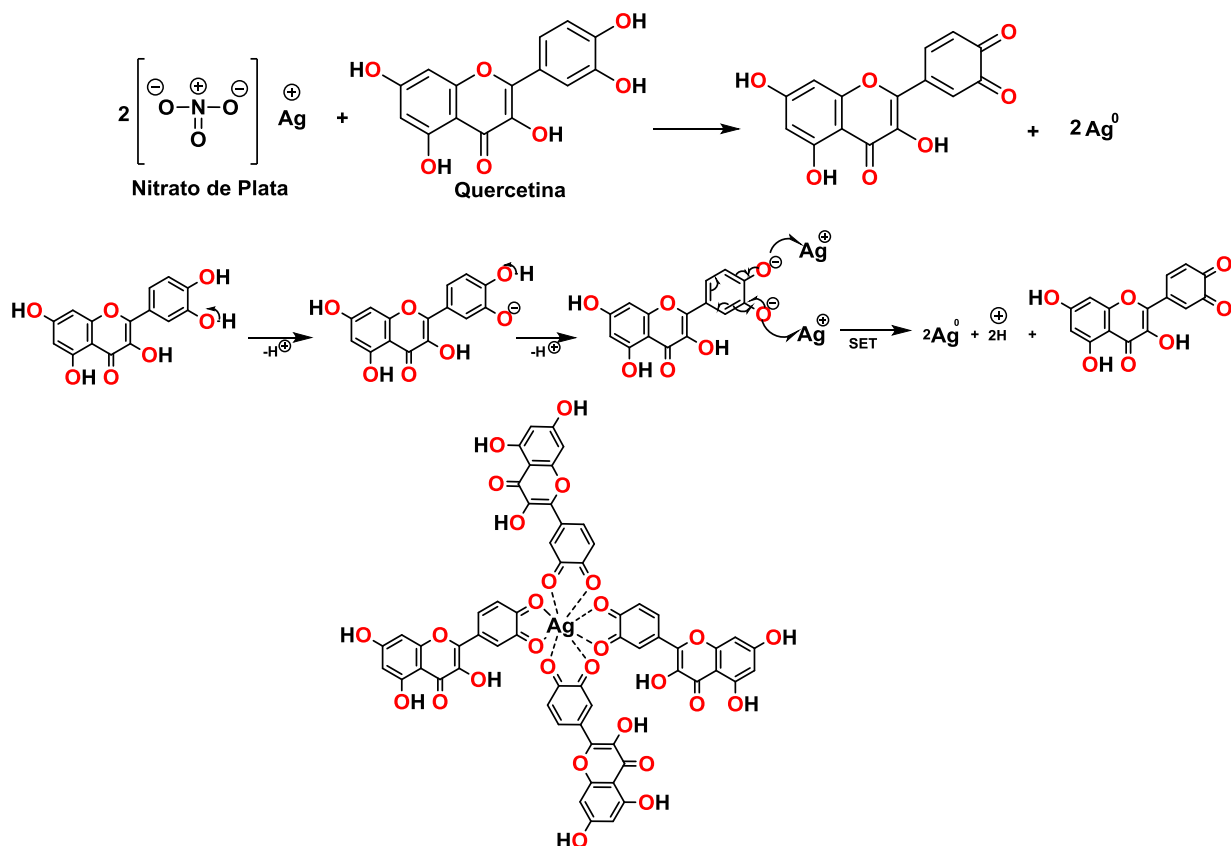
en los diferentes rangos de número de onda. Un caso particular, se evidencia en las señales entre 2924 y 2852 cm^{-1} correspondientes a los enlaces (C-H) de los grupos metilenos y metilos asociándose a modos vibracionales de extensión asimétrica [43]. También, se presentan picos en los rangos de los 1700 cm^{-1} posiblemente característico a la extensión de un grupo carbonilo (C=O). En los espectros de los compuestos 5 y 7, se visualiza un pico largo y delgado en 1452 cm^{-1} correspondiente a un movimiento de tensión de un enlace (C-H), asimismo, para la señal entre 1253 y 1260 cm^{-1} se asocia a la extensión de aminas aromáticas desplazadas por efecto de resonancia (C-N) o por el movimiento asimétrico de los enlaces (C-O) [43]; y el pico en 804 cm^{-1} es representativo de un modo vibracional de flexión fuera del plano establecido para el enlace (C-H). En referencia al compuesto 8, se observa una señal ancha cercana a 3362 cm^{-1} , la cual puede pertenecer al estiramiento del enlace (N-H) de un grupo amida o amina, asociado a un alcaloide o a betacianinas. Por otro lado, para los compuestos 9 y 10, se tienen espectros con distinciones en sus números de onda, por ejemplo, el compuesto 9, presenta un pico ancho y fuerte en 3374 cm^{-1} referido a los puentes de hidrogeno pertenecientes al grupo funcional hidroxilo (O-H) con modo vibracional de tensión [43]. Además, se visualizan dos picos en 1548 cm^{-1} los cuales confirman la presencia de un grupo carbonilo (C=O) y/o dobles enlaces (C=C) probablemente de los grupos aromáticos de las moléculas o asociadas a los grupos metilos (C-H₂) con énfasis a un modo vibracional tijereteo respectivamente. Para el espectro FT-IR aludido al compuesto 10, se visualiza un pico débil en 3364 cm^{-1} correspondiente a un grupo hidroxilo (O-H) o posiblemente a una amina o amida (N-H₂) representando el modo vibracional de estiramiento [43]. Los dos picos débiles entre los números de onda 1738 a 1662 cm^{-1} son representativos del grupo carbonilo (C=O). Sin embargo, se puntualiza que el espectro de este compuesto presenta señales similares al compuesto 8, de esta manera, se puede asociar que los dos espectros hacen énfasis a la misma estructura química o presenta trazas del mismo.

4.2. Caracterización de las Ag-NPs y Cu_xO-NPs

4.2.2. UV-Vis

4.2.2.1 UV-Vis de las Ag-NPs

La síntesis verde de las Ag-NPs revela un resultado positivo a medida que la solución acuosa de AgNO₃ va cambiando de color cuando entra en contacto con el agente reductor y estabilizante que en este caso es el extracto acuoso de *Bugambilia glabra*. El color de la muestra se va transformando de un tono incoloro a un amarillo-marrón, lo que indica la presencia de nanopartículas de plata (Ag⁺¹→Ag⁰) en solución. Este mecanismo de reacción involucra los grupos donadores de electrones (e⁻) presentes en los metabolitos secundarios (hidroxilos, carbonilos, aminas, etc.) de los extractos de la planta, los cuales interactúan con el metal permitiendo que los electrones se exciten y puedan pasar de un estado menor en energía a uno mayor, llevando a cabo la reducción de los iones de plata y la formación de enlaces de coordinación entre el metal y los grupos funcionales (ver figura 36) [44].



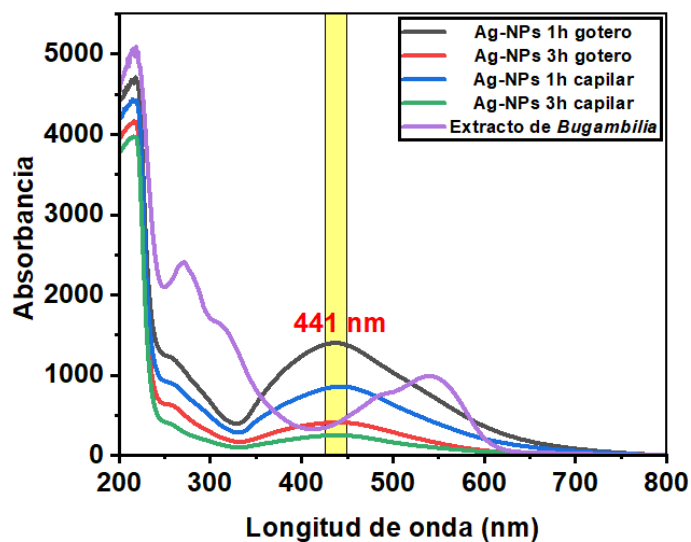
Capítulo 4. Análisis de Resultados

Figura 19. Mecanismo de reacción de la reducción de la plata a partir de los metabolitos secundarios de la *Bugambilia glabra*.

Los analitos obtenidos en la reducción de plata ($\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$) se caracterizaron por medio de espectroscopia UV-Vis, con el objetivo de corroborar la formación de las NPs, a partir de un pico características en un rango de 380 nm a 450 nm según lo reportado en la literatura científica. La longitud de onda de las NPs depende de las características morfológicas, estructurales y del tamaño de partícula [45]. A partir de lo anterior, en la gráfica 3 se observan picos de absorción en aproximadamente 441 nm para las cuatro rutas sintéticas implementadas (1h gotero, 3h gotero, 1h capilar y 3h capilar), lo que confirma la existencia de nanopartículas de plata en las soluciones coloidales [46].

Por otro lado, al comparar las señales específicas de cada espectro de las Ag-NPs con el espectro UV-Vis del extracto acuoso de *Bugambilia*, se distingue una gran diferencia entre los picos que aparecen entre 400 nm a 800 nm, debido a que la presencia del metal en la muestra permite un desplazamiento a menores longitudes de onda. Esto se relaciona al hecho que las Ag-NPs presentan dos tipos de bandas de energía que se dividen en: banda de conducción y banda de valencia. Estas se encuentran muy cercanas entre sí, lo que permite que los electrones se muevan libremente generando una banda de absorción que se lleva a cabo por la oscilación continua de los electrones del nanomaterial en resonancia con la onda de la luz [47]. También, se observa en los espectros UV-Vis que los mejores tiempos de reducción de la plata son de 1 hora para la adición de las gotas por medio de gotero, debido a que su pico es más fino y menos achatado en comparación de las otras muestras. Esto demuestra que las Ag-NPs tienden a presentar mayor estabilidad enfocada en una menor descomposición o aglomeración del metal.

Capítulo 4. Análisis de Resultados



Gráfica 3. Espectro UV-Vis de las diferentes metodologías de las Ag-NPs comparadas con el extracto de *Bugambilia glabra* donde línea negra (1h gotero), línea roja (3h gotero), línea azul (1h capilar), línea verde (3h capilar) y línea morada (extracto de *Bugambilia*).

4.2.2.2. UV-Vis de las Cu_xO -NPs

Para el caso de la síntesis de reducción del cobre, se puede determinar la formación de nanopartículas por medio del cambio de color de la solución de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Es decir, a medida que el precursor entra en contacto con extracto acuoso de *Bugambilia*, la tonalidad de la solución se modifica de un color azul a amarillo-verdoso lo que permite demostrar la presencia de nanopartículas de cobre. Ahora bien, es relevante resaltar que la exposición de la solución coloidal de cobre al ambiente conlleva a la oxidación de las NPs. Por lo que se puede interpretar que la reducción de cobre con estado de oxidación (Cu^{+2}) a (Cu^{+1} o Cu^0) se ve alterada por la presencia de oxígeno del ambiente, por lo que se forman Cu_xO -NPs (II) ($Cu^{+2}O^{-2}$) (ver figura 37). Este mecanismo se fundamenta en las propiedades químicas del cobre y de los metabolitos secundarios que contiene el extracto, y es que el cobre por ser un metal de transición con orbitales “d” parcialmente llenos, le permite al metal aceptar electrones o donarlos para formar nuevos enlaces con otros átomos. En este caso, los grupos funcionales con alta reactividad química capaces de donar y aceptar electrones debido a su electronegatividad química, como lo son los grupos hidroxilos (OH), aminas (NH_2), tioles (SH_2), carboxilos (C=O), entre otros, presentes en una amplia gama de productos naturales con diversas estructuras como los flavonoides, taninos, betacianinas,

Capítulo 4. Análisis de Resultados

etc. [48]. Los reportes sobre la síntesis verde de NPs han identificado que la mayoría de los flavonoides manifiestan excelentes propiedades quelantes con la capacidad de aceptar electrones de los metales y formar enlaces de coordinación, principalmente aquellos metales divalentes como (Cu^{+2}) [48].

Este fenómeno se evidencia en el espectro UV-Vis de la reacción (ver gráfica 4), donde se puede contemplar un pico en aproximadamente 273 nm, que se encuentra dentro de los rangos establecidos por la literatura, el cual es característicos para CuO o Cu_2O [49]. Sin embargo, la señal que se observa en el espectro no presentó gran intensidad considerándose como un pico débil, lo cual puede atribuirse a las condiciones de reacción donde se puede correlacionar la baja intensidad del pico a la leve concentración Cu_xO -NPs en solución o que el tiempo/temperatura de la reacción redox debió ser mayor para lograr un mejor control en la reducción del metal.

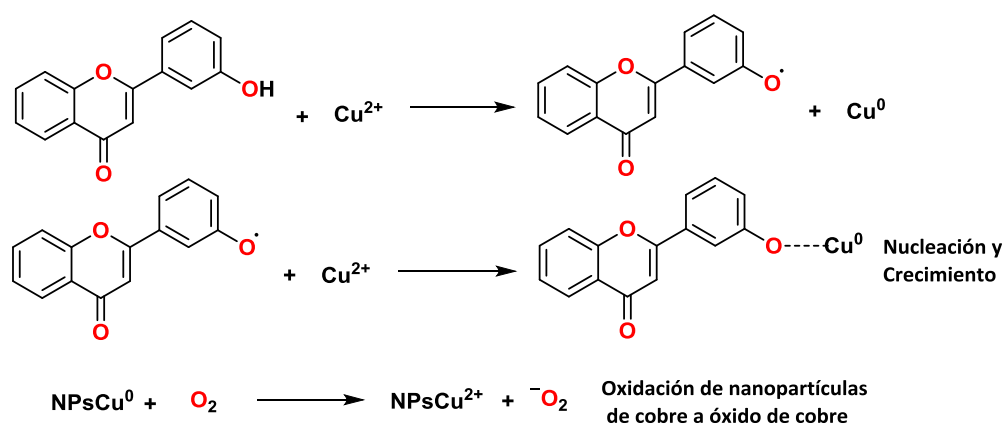
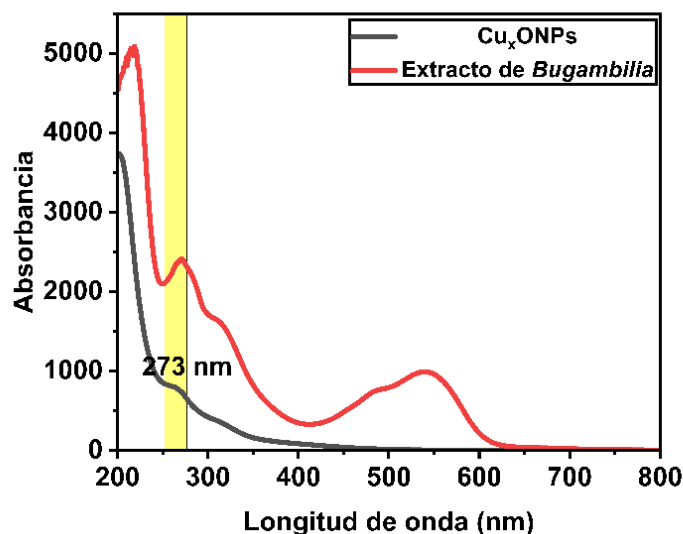


Figura 20. Posible mecanismo redox entre el extracto acuoso de *Bugambilia glabra* y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para la formación de Cu_xO -NPs.

Por otro lado, aunque a través del espectro no se puede identificar correctamente la composición química del nanomaterial, si se puede comprobar la no presencia de Cu -NPs (Cu^0) debido a que estas son detectadas en la banda de resonancia de plasmones superficiales cercanas a 573 nm [50].

Capítulo 4. Análisis de Resultados



Gráfica 4. Espectro UV-Vis de las diferentes metodologías de las Cu_xO-NPs comparadas con el extracto de *Bugambilia glabra* donde línea roja (extracto de *Bugambilia*) y línea gris (Cu_xO-NPs).

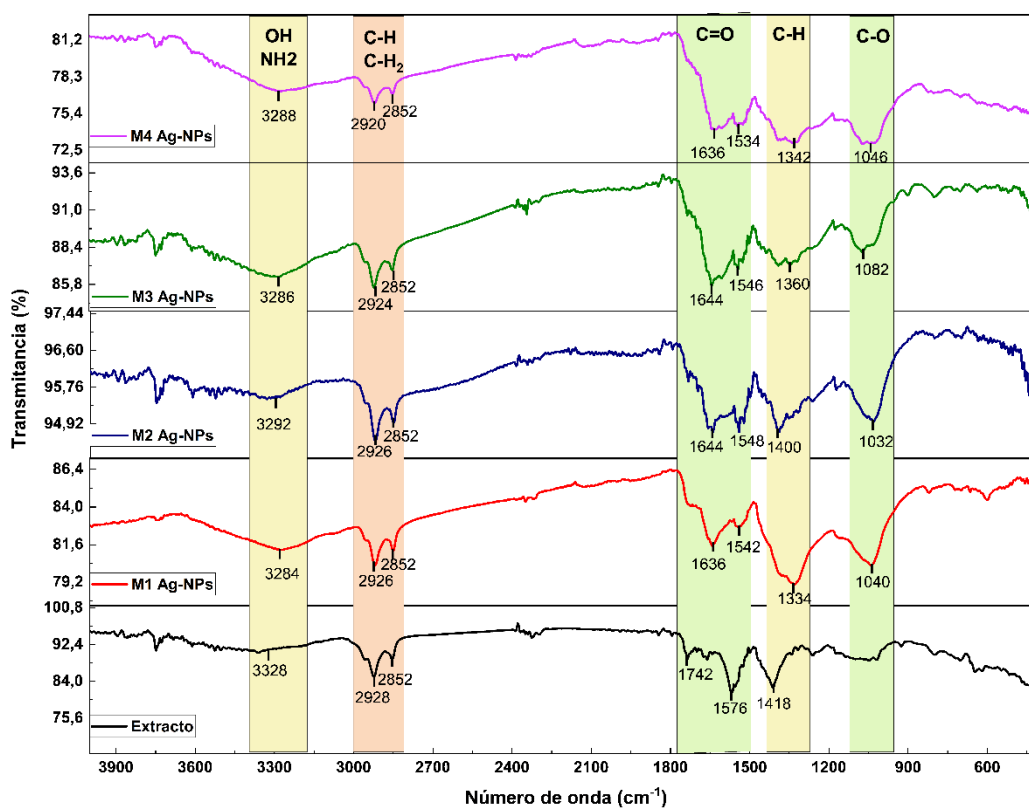
4.2.3. FT-IR

4.2.3.1. FT-IR de las Ag-NPs

En la gráfica 5, se demuestra la similitud que existe entre los espectros FT-IR del extracto de *Bugambilia glabra* y los métodos diseñados para la síntesis de (Ag-NPs). La señal característica del espectro entre 3326 cm^{-1} a 3284 cm^{-1} se puede asociar al modo de estiramiento de los grupos hidroxilos (O-H) pertenecientes a flavonoides o compuestos fenólicos; y a grupos aminos referentes de las betacianinas [51]. De este modo, se interpreta que la presencia de estas señales en todos los espectros de las muestras de las Ag-NPs manifiesta el posible acaparamiento de estos grupos funcionales al metal de plata debido a la reacción de reducción. Por otro lado, los picos específicos en aproximadamente 2852 cm^{-1} a 2926 cm^{-1} se relaciona a los modos vibracionales de extensión asimétrica de los grupos metilos y/o metilenos (C-H) [51]. Una señal particular, se encuentra en el número de onda cercano a los 1644 cm^{-1} perteneciente a los grupos carbonilos (C=O) [51]. Sin embargo, los picos del espectro del extracto presentan una diferencia en su forma atribuyendo dos señales más vecinales en 1750 cm^{-1} , mientras que la señal del nanomaterial exhibe un pico cercano en 1680 cm^{-1} . La representación de estas nuevas señales se puede ligar a un posible

Capítulo 4. Análisis de Resultados

enlace de coordinación entre el metal de plata en su forma reducida y el grupo carbonilo. Por último, los valores cercanos entre 1418 cm^{-1} a 1342 cm^{-1} y de 1032 a 1082 cm^{-1} se deben a los modos vibracionales de estiramiento de los enlaces C-H y C-O de los grupos aromáticos y alcoholes de los metabolitos secundarios presentes en lo extracto acuoso de la *Bugambilia glabra* [51].



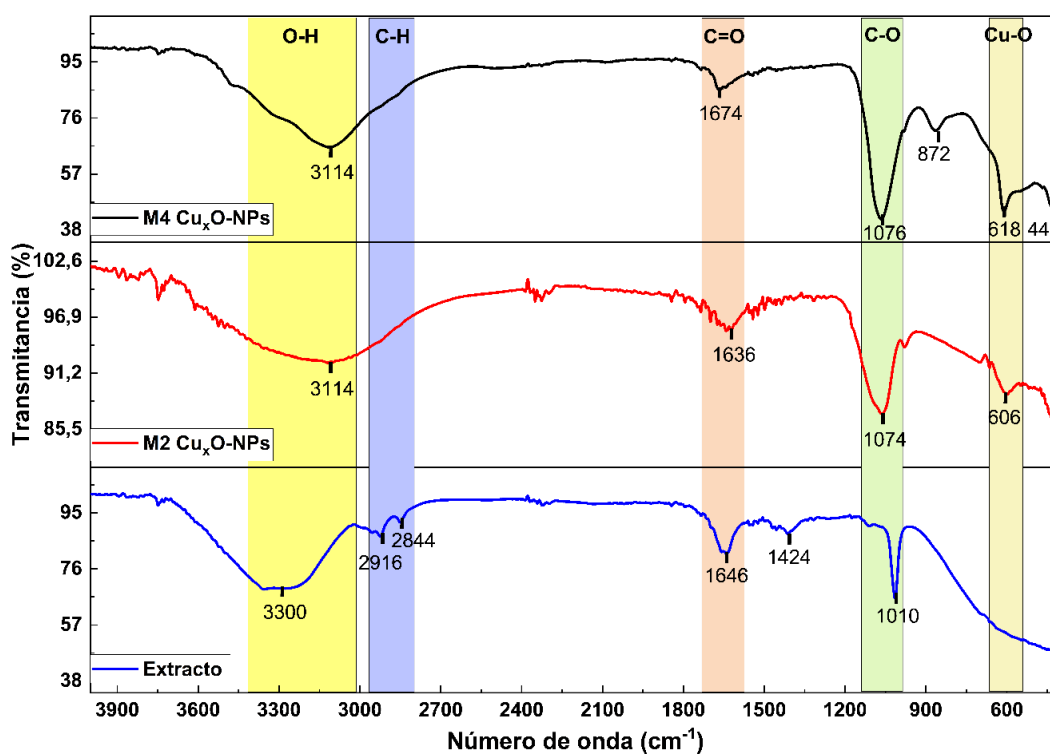
Gráfica 5. Espectros de FT-IR de la planta *Bugambilia glabra* y las Ag-NPs, donde: línea negra (extracto), línea roja (M1: 3h gotero), línea azul (M2: 3h capilar), línea verde (M3: 1h gotero) y línea rosada (M4: 1h capilar).

4.2.3.1. FT-IR de las Cu_xO -NPs.

Los espectros FT-IR comparativos entre el extracto de *Bugambilia glabra* y las Cu_xO -NPs se visualiza en la gráfica 6. A partir de estos resultados, se puede establecer la formación del enlace entre los grupos funcionales de los metabolitos secundarios y el Cu-O con una señal característica en aproximadamente 618 cm^{-1} correspondiente al modo de estiramiento que revela la formación de las NPs [52]. Además, se observa que dicha señal no aparece en el

Capítulo 4. Análisis de Resultados

espectro correspondiente extracto acuoso de la planta (línea negra). Por otro lado, se detectaron picos cercanos en 1010 a 1076 cm^{-1} y 1036 a 1674 cm^{-1} representativos de movimientos asimétricos y de extensión de los enlaces C-O y C=O respectivamente [52]. Estos picos se encuentran en los tres espectros elucidados, por lo que se infiere que las señales pertenecen a los grupos funcionales de los metabolitos secundarios de la *Bugambilia glabra*. Un número de onda importante se presenta en 3114 cm^{-1} de los espectros de las muestras M4 y M2 correspondiente a la banda de estiramiento del enlace hidroxilo O-H [52]. Manifestando un desplazamiento menor para los espectros de las muestras de óxido de cobre (línea roja y azul), mientras que la señal en el extracto acuoso se posiciona en rangos cercanos a los 3300 cm^{-1} , lo que permite inferir que el desplazamiento del pico se debe a la reducción y al nuevo enlace formado entre Cu-O. A partir de estos resultados, se puede corroborar la información suministrada en el espectro ultravioleta visible (UV-Vis) de las nanopartículas de óxido de cobre (ver gráfica 4), donde se demuestra una señal característica del plasmón de CuO.



Gráfica 6. Espectros de FT-IR de la planta *Bugambilia glabra* y las $\text{Cu}_x\text{O-NPs}$, donde: M4 $\text{Cu}_x\text{O-NPs}$ con tween-80 (línea negra), M2 $\text{Cu}_x\text{O-NPs}$ sin tween-80 (línea roja) y extracto (línea azul).

Capítulo 4. Análisis de Resultados

4.2.4. DLS

4.2.4.1. DLS de las Ag-NPs

La distribución de tamaño de partícula y la estabilidad coloidal de las soluciones de Ag-NPs se evaluaron a través de DLS. Las cuatro muestras sintetizadas por química verde (3h gotero; 1h gotero; 3h capilar y 1h capilar), mostraron resultados variados entre ellos, indicando que la distribución de los tamaños de partícula es menor a 100 nm. Además, manifestaron una buena estabilidad coloidal permitiendo una confiabilidad y reproducibilidad del sistema coloidal por medio del proceso de síntesis verde.

Tabla 9. Resultados de DLS de las Ag-NPs sobre tamaños de partícula, estabilidad coloidal y carga superficial.

Reacción	Tiempo (h)	Tamaño mínimo de nanopartículas (nm)	Tamaño máximo de nanopartículas (nm)	Potencial Zeta (mV)	Polaridad
M1: Ag gotero	3	11.81	75.4	34.8	Negativa
M2: Ag gotero	1	17.86	—	92.8	Positiva
M3: Ag capilar	3	7.88	47.4	89.6	Negativa
M4: Ag capilar	1	64.4	—	42.9	Positiva

La tabla 9 muestra datos específicos de los tamaños de partícula, potencial zeta y polaridad de cada una de las muestras sintetizadas, las cuales arrojaron, tamaños más pequeños para las reacciones 2 y 3 con valores de 17.86 nm y 7.88 nm a 47.4 nm respectivamente. De acuerdo a estos resultados, se infiere que el tamaño del nanomaterial es dependiente del tiempo de reacción y del tamaño de la gota del extracto que se adicionó al precursor de nitrato de plata. Es decir, que entre mayor sea el tiempo de reacción la distribución de tamaño aumenta, tal es el caso de la muestra 3, que manifiesta tamaños hasta 47.4 nm a comparación de la muestra 2, que solo presenta una distribución de 17.86 nm. No obstante, para la reacción 3, se puede establecer que las partículas más pequeñas actúan como nutrientes para las partículas más grandes lo que permite la formación de nanopartículas de mayor tamaño conllevando a soluciones coloidales con menor estabilidad, debido a que con el paso del tiempo se pueden dar precipitaciones del material [53]. Estos hechos se ven

Capítulo 4. Análisis de Resultados

reflejados en el potencial zeta, donde las muestras 2 y 3 obtuvieron valores de 92.8 mV y 89.6 mV respectivamente, lo cual demuestra que a mayor distribución de tamaños la estabilidad coloidal disminuye. Sin embargo, los rangos exhibidos en la tabla se encuentran entre los estipulados por la literatura científica, mayores a ± 30 mV, indicando que todas las Ag-NPs sintetizadas en las diferentes condiciones de reacción conllevaron a la obtención de una buena estabilidad coloidal. Además, cada metodología realizada manifestó una cierta polaridad al metal permitiendo cargas superficiales específicas dependiendo del tiempo de reacción, por lo que las soluciones coloidales con mayores tiempos de reacción se les indica una carga neta negativa mientras aquellas con tiempos de reacción menores sus cargas netas fueron positivas [54]. Este hecho se debe en gran medida al contacto que tenga directamente el extracto con el precursor, puesto que los metabolitos secundarios se encuentran en una competencia constante de quien llevara a cabo el proceso de reducción, es decir, aquellos que presenten una mayor reactividad de sus heteroátomos (O, N, S, entre otros) así se orientarán sus estructuras frente al metal. En la figura 38 muestra un esquema representativo de las posibles orientaciones de los grupos funcionales de los compuestos orgánicos en la NP formada, donde metabolitos como flavonoides, fenoles, taninos, entre otros, pueden ser capaces de brindarle a la molécula una carga superficial negativa debido a la cantidad de grupos hidroxilos y carbonilos que contienen. Por otro lado, las betacianinas y/o alcaloides, conocidos por ser compuestos nitrogenados, pueden proporcionarle a la estructura una carga neta positiva, según las reacciones intermoleculares que se llevan a cabo. Otro punto a resaltar es el tiempo de nucleación y crecimiento de las NPs durante la reacción, puesto que, según los resultados, entre mayor tiempo se proporcione a la reducción, las NPs obtienen un mayor tamaño. En ese sentido, se puede deducir que un tiempo mayor a 3 h conlleva a que la estabilidad del nanomaterial disminuye debido a que se pueden dar mayores aglomeraciones que generan la precipitación de las NPs. Por otra parte, algunos reportes científicos han demostrado que las biomoléculas que componen los extractos naturales no solo ejercen el papel de reductores químicos, sino que son considerados como agentes de protección contra diferentes microorganismos [54].

Capítulo 4. Análisis de Resultados

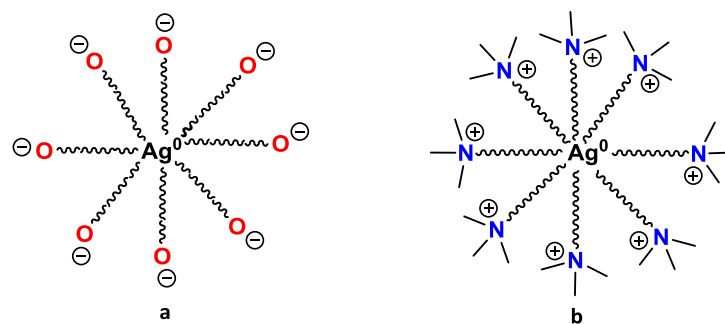
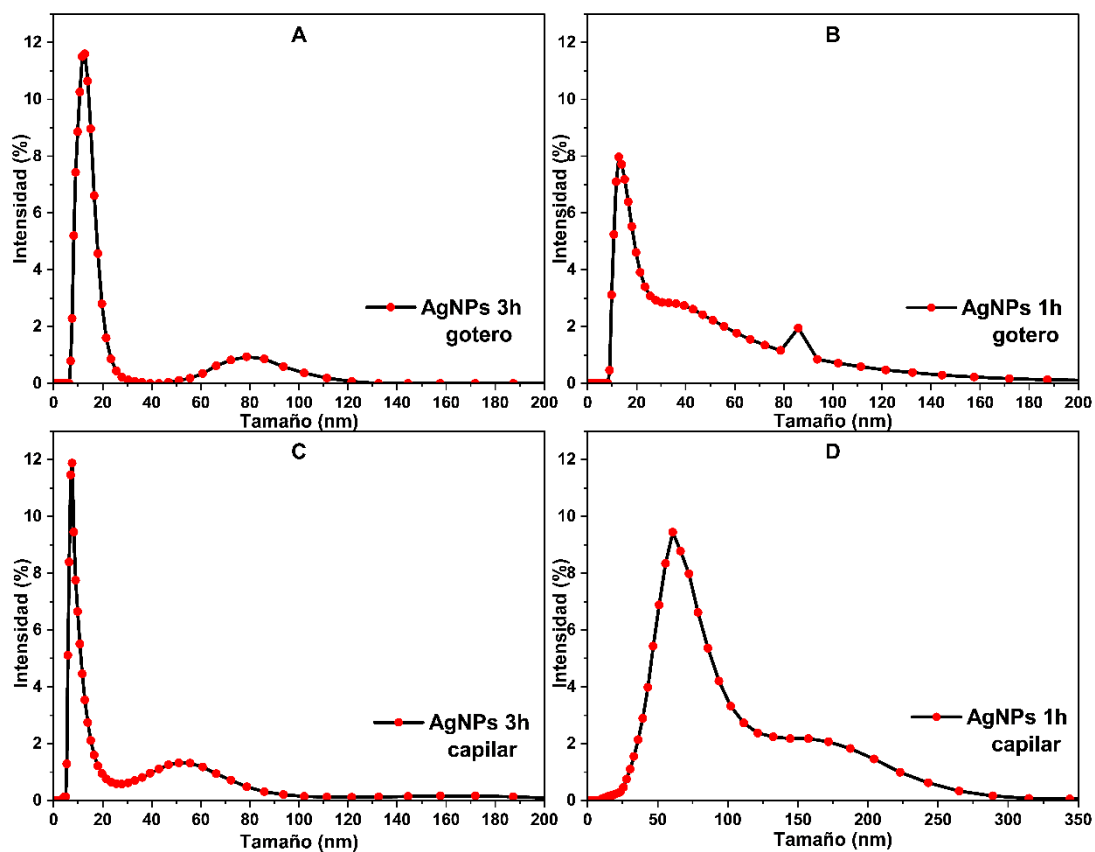


Figura 21. Esquema de ejemplificación de posible acaparamiento de los fitocompuestos de la planta sobre el metal de plata donde: a) NPs con carga superficial negativa y b) nanopartícula con carga superficial positiva.



Gráfica 7. Tamaño de partículas para las diferentes metodologías de las Ag-NPs donde: a) 3h gotero, b) 1h gotero, c) 3h capilar y d) 1h capilar.

Capítulo 4. Análisis de Resultados

4.2.4.2. DLS de las Cu_xO-NPs

El análisis de DLS para las Cu_xO-NPs mostró que el tamaño de partícula promedio se estableció en aproximadamente 9.09 nm con un potencial zeta de 64.4 mV dando una carga superficial a la NP positiva. Estos resultados resaltan que la solución del nanomaterial presenta una buena estabilidad coloidal, ya que el valor estipulado se encuentra en los rangos establecidos superiores a 30 mV. Además, le confiere una mayor repulsión de cargas en la molécula permitiendo que no se lleve a cabo la aglomeración del nanomaterial evitando así el aumento de tamaño y por ende la precipitación.

Por otro lado, para la síntesis de reducción de cobre se implementó como agente estabilizador del sistema coloidal al tween-80, dado que el extracto acuoso de *Bugambilia* no logró una estabilización adecuada y estable de las NPs proporcionando valores de potencial zeta menores a ± 30 mV, exactamente de 16 mV. Lo que conllevaba a la aglomeración y posterior precipitación del nanomaterial. Aunque, el objetivo del trabajo se centraba en buscar alternativas limpias y amigables con el medio ambiente, sin la ayuda de agentes estabilizadores externos, cabe resaltar que la empleabilidad de tween-80 fue mínima y benefició en gran medida al tamaño de partícula y la estabilidad de la muestra por más de 4 meses. En la figura 39, se observa la posible estructura formada una vez el sistema coloidal entra en contacto con el surfactante, este proceso se genera con la formación de un enlace de coordinación entre los grupos éteres pertenecientes al tween-80 y el metal de cobre logrando proporcionar una mayor estabilización del nanomaterial [55]. Sin embargo, es importante puntualizar que una adición de tween-80 al experimento tiende a generar un aumento en el tamaño de la NP, ya que se da un recubrimiento al metal en la zona superficial, es decir, se establecen nuevos enlaces de coordinación con el óxido de cobre generando mayor volumen a la estructura de la NP.

Capítulo 4. Análisis de Resultados

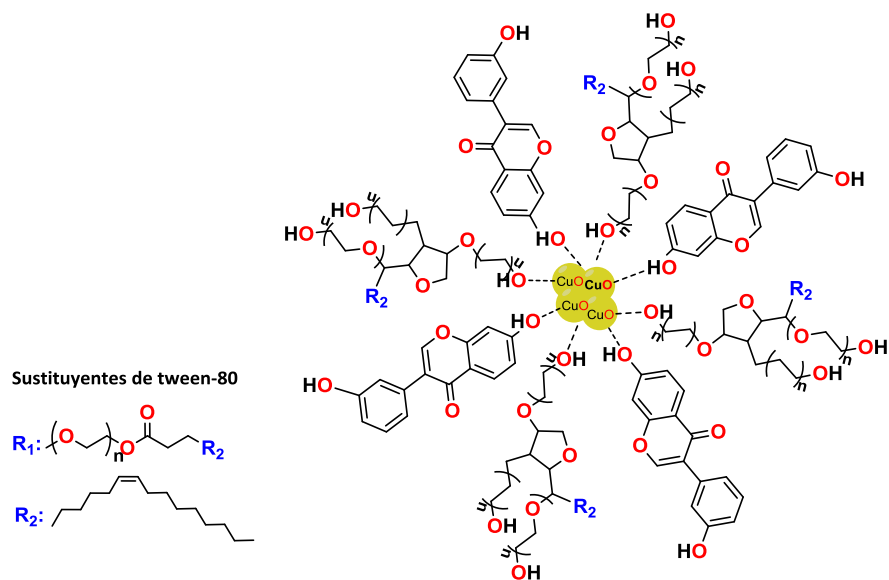
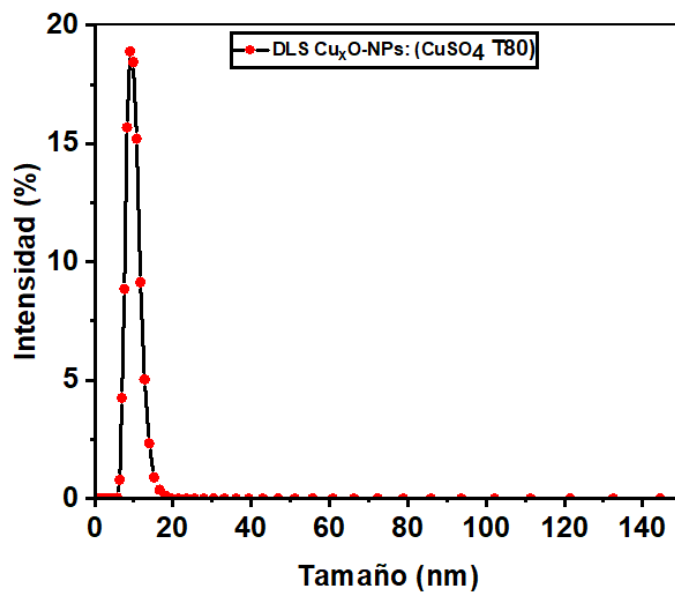


Figura 22. Posible estructura química de las Cu_xO -NPs con tween-80 como estabilizante, donde la carga superficial de la NP la confiere el óxido metálico (+1 o +2).



Gráfica 8. Tamaño de partículas de las Cu_xO -NPs estabilizadas con Tween 80.

4.2.5. SEM

4.2.5.1. SEM de las Ag-NPs

La morfología y el tamaño de las Ag-NPs se examinaron SEM (ver figuras 40 y 41). Para esta caracterización se escogieron las muestras 2 y 3 de la síntesis verde de las Ag-NPs, debido a

Capítulo 4. Análisis de Resultados

que los valores de tamaño de partícula arrojados a partir del DLS demostraron tamaños pequeños a comparación de las otras muestras; dando valores entre 17.86 nm y 7.88 nm a 47.4 nm respectivamente. De esta manera, las imágenes de SEM muestran que las Ag-NPs tienen morfología esférica que tienden a aglomerarse y formar clúster al pasar el tiempo (Figura 40.d) [56]. Este hecho se puede atribuir al proceso de preparación de las muestras, puesto que se centrifugaron con el objetivo de obtener un precipitado adecuado para la caracterización; lo que posiblemente en el tiempo de evaporación del solvente pudo conllevar a la aglomeración de las NPs; lo cual se puede comparar con la figura 40. (a); que corresponde a la solución coloidal de la muestra donde se manifiesta una mayor dispersión del metal. Por otro lado, para el caso de los tamaños de partícula se especifican valores entre 27.03 nm a 81.09 nm para la muestra 2, y para la muestra 3, los tamaños variaron entre 43.25 nm a 118.94 nm. Los datos proporcionados por las micrografías de SEM, se encuentra entre los rangos estipulados por el DLS, sin embargo, se indica la existencia de tamaños más grandes del metal adjudicándose al acaparamiento del metal con los metabolitos secundarios presentes en el extracto *Bugambilia* y al tiempo de vida media de las NPs en suspensión [56]. En un estudio similar, donde se realizaron síntesis de Ag-NPs con extractos de *Bugambilia Glabra*, el tamaño de partícula estimó valores entre 21 nm a 53 nm, de modo que, los resultados de la muestra 2 se pueden vincular a los datos dados por la literatura científica. Teniendo en cuenta, que el tamaño depende del proceso de síntesis y de los metabolitos presentes en los extractos [57].

Capítulo 4. Análisis de Resultados

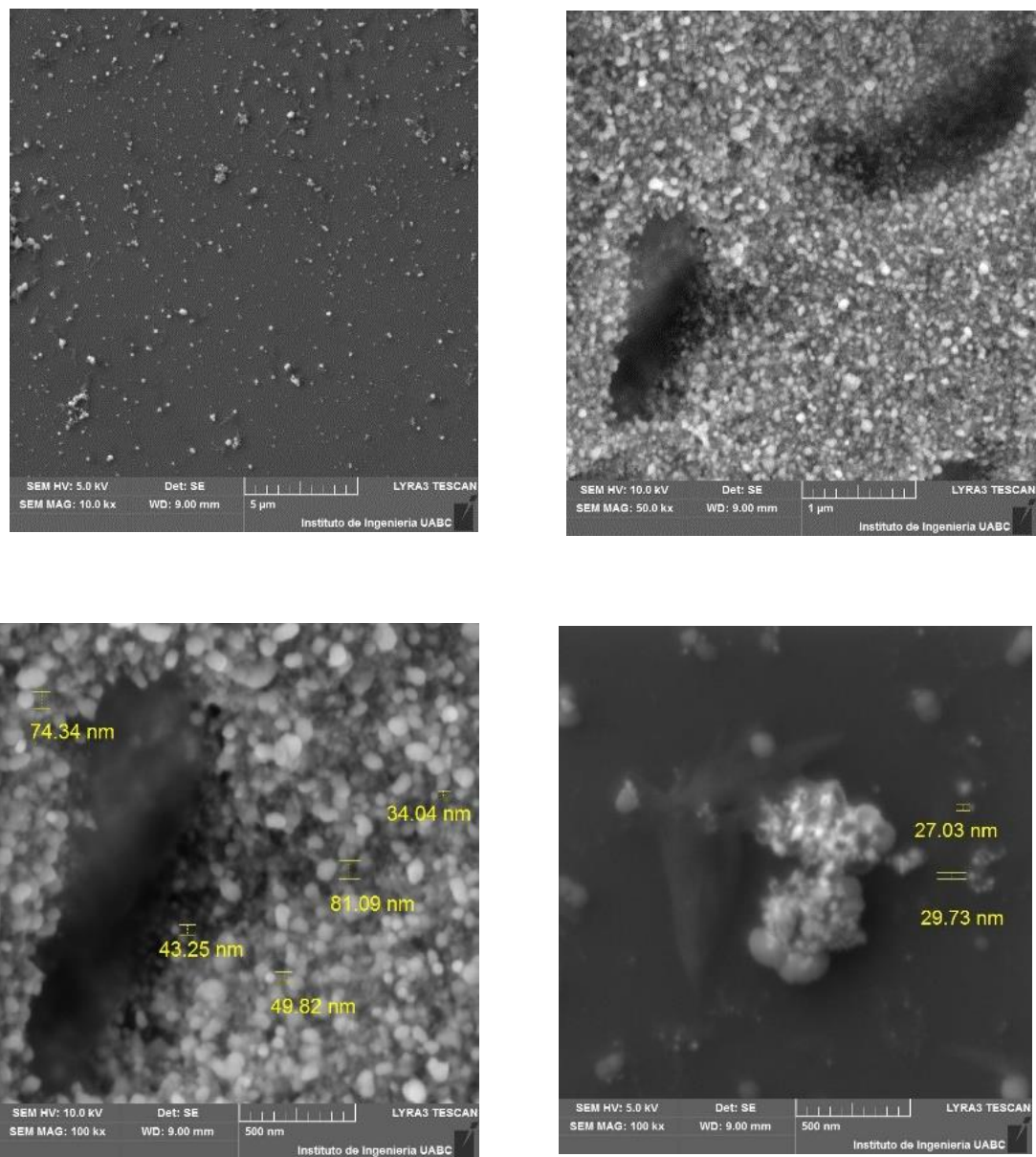


Figura 23. Imágenes SEM de las Ag-NPs obtenidas mediante síntesis verde (muestra 2).

Capítulo 4. Análisis de Resultados

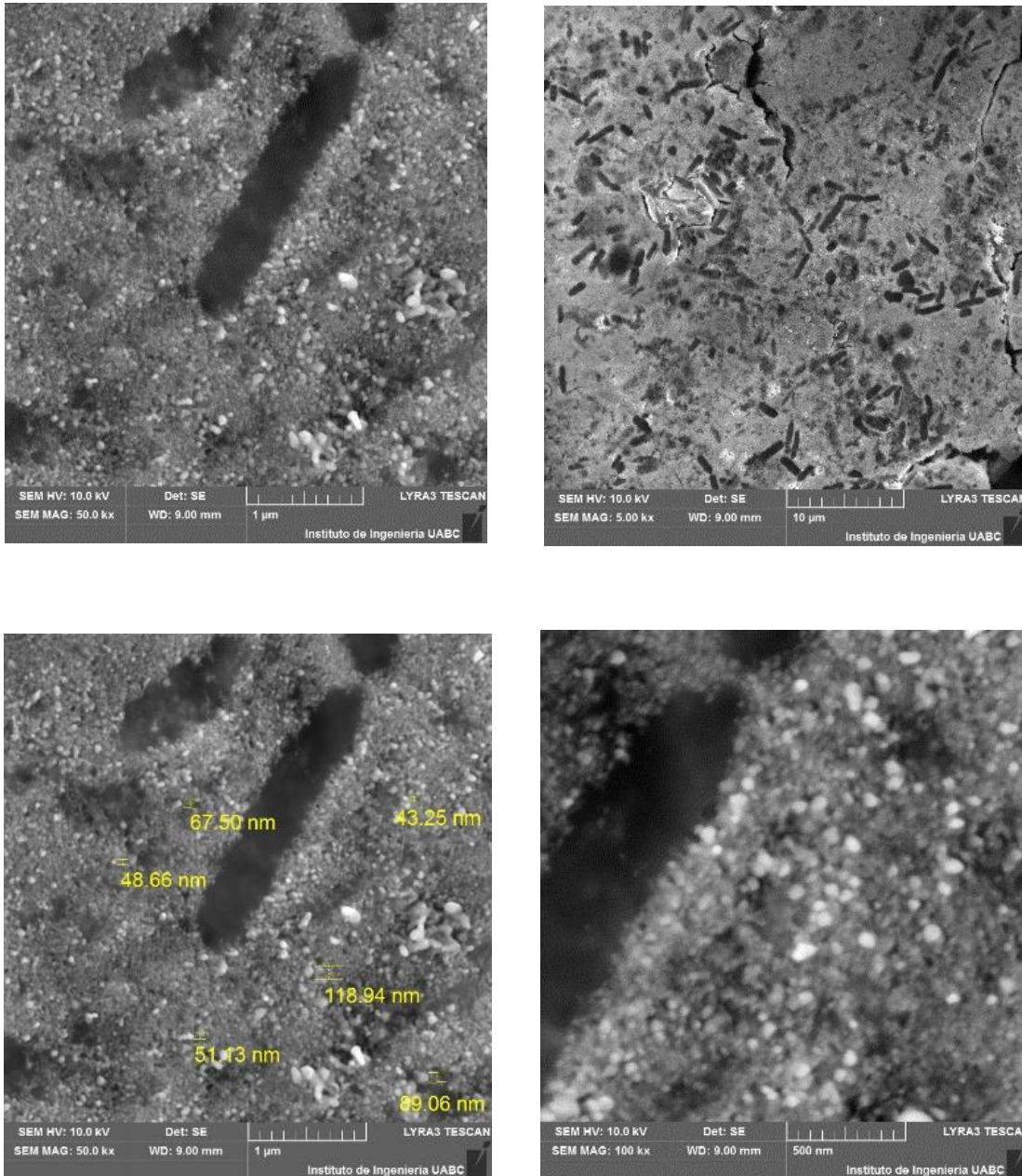


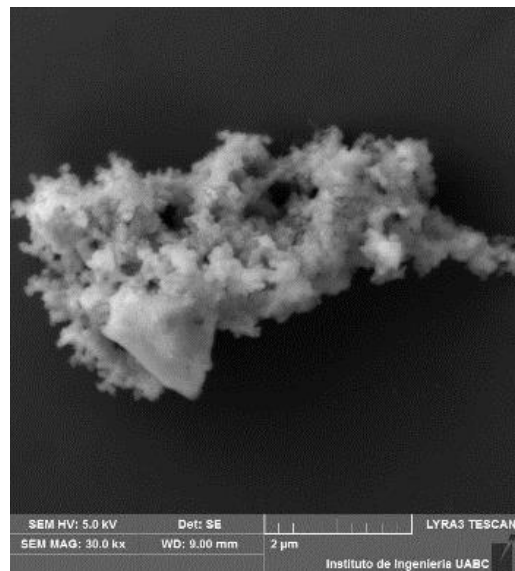
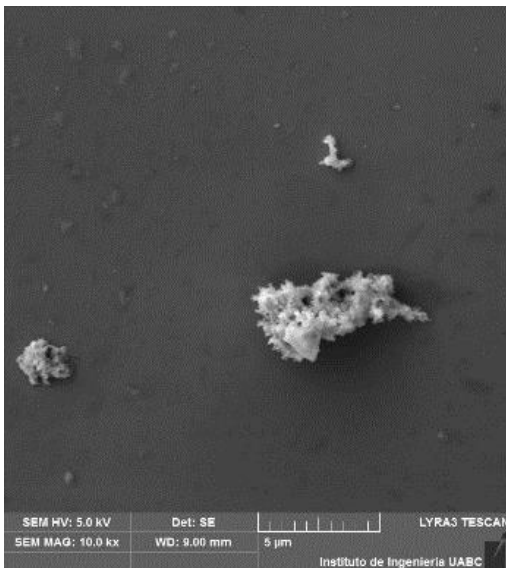
Figura 24. Imágenes SEM de las Ag-NPs obtenidas mediante síntesis verde (muestra 3).

4.2.5.2. SEM de las Cu_xO -NPs

La caracterización por SEM para las Cu_xO -NPs manifestaron aglomeraciones del metal en forma de clúster, debido a esto la forma que adoptó el nanomaterial en la solución coloidal no se puede visualizar de manera específica; pero se le puede atribuir una forma esférica con ciertas irregularidades en su morfología. Al comparar dichos resultados con los datos

Capítulo 4. Análisis de Resultados

reportados en la literatura científica, se demuestra que se obtuvieron Cu_xO -NPs puesto que a este compuesto se le atribuye una estructura esférica que tienden a aglomerarse entre las mismas nanopartículas para adoptar una forma de espuma como se visualiza en la figura 24 [58]. Por otro lado, el tamaño de partícula asociado al óxido de cobre se encontró entre 51.56 nm a 83.80 nm dando valores en los rangos establecidos para considerarse como nanomaterial, es decir, de 1 nm a 100 nm. Estos resultados no se encuentran relacionados con el mencionado anteriormente en el DLS, debido a que el tamaño estipulado fue de 9.09 nm, un resultado demasiado predominante y deseado para cualquier método de reducción verde. Además, existe una particularidad en la metodología, y se adjudica a que la solución coloidal del compuesto fue estabilizada con tween-80; el cual permite un aumento de tamaño en la superficie del nanomaterial, lo que conlleva a sufrir una mayor aglomeración con el paso del tiempo.



Capítulo 4. Análisis de Resultados

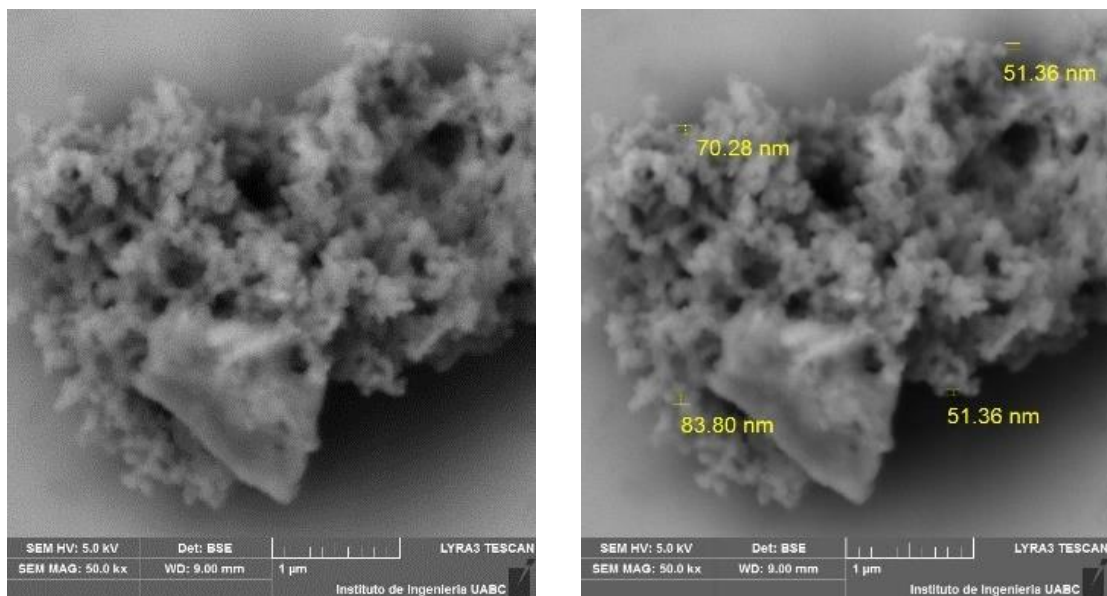


Figura 25. Imágenes SEM de la síntesis verde de las Cu_xO -NPs para la muestra M4 con tween-80.

4.2.6. EDS

4.2.6.1 EDS de las Ag-NPs

El análisis de EDS de las Ag-NPs para las reacciones 2 y 3, logra evidenciar de manera cualitativa la composición elemental de las soluciones coloidales sintetizadas en el proceso de reducción de la plata ($\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$). A partir de las figuras 43 y 44, se establece la presencia del metal de plata con un pico de absorción óptico en aproximadamente 3 keV para las muestras No. 2 y 3 [56]. Por otro lado, en las (tablas 10 y 11) se confirma los elementos químicos presentes en el nanomaterial, además de otros que pertenecen al soporte universal donde se colocaron las soluciones coloidales para la caracterización por EDS. De acuerdo a esto, los análisis demuestran que la mayor proporción elemental es atribuida a la plata con 87.37% y 84% respectivamente. Posteriormente, se encuentra el carbono y oxígeno con proporciones menores al 5% los cuales pueden pertenecen a las biomoléculas del extracto de *Bugambilia*. Al compararse estos resultados con los reportados en investigaciones científicas, se confirma que las Ag-NPs aparecen en señales cercanas al 3 keV [56]. Por otro lado, la muestra No.2, reveló la presencia de elementos como Si, Al, S y P, los cuales se encontraron en cantidades más pequeñas. Además, presentó un porcentaje de plata mayor que la muestra No.3. Sin embargo, la muestra 3 manifestó la presencia de

Capítulo 4. Análisis de Resultados

otros elementos, lo que permite inferir, que el tiempo de reacción y la cantidad de gotas de extracto influyen en la proporción cuantitativa del metal y en la pureza del nanomaterial; atribuyendo esto a que la nucleación del metal sería más homogénea y mayoritaria en la solución coloidal.

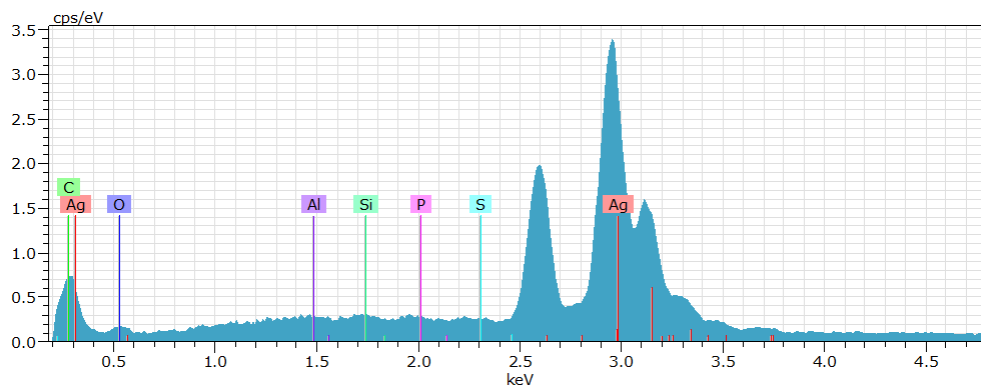


Figura 26. Caracterización por EDS de la muestra 2 de Ag-NPs.

Tabla 10. Datos de la composición atómica de la muestra 2 de Ag-NPs.

Átomo	Número atómico	Serie	unn. (wt. %)	C. norm. (wt. %)	C. Atom (at. %)	C.Error (1 Sigma) (wt. %)
Ag	47	L-series	87.37	89.25	56.50	2.95
C	6	K-series	3.98	4.07	23.11	0.63
O	8	K-series	2.42	2.47	10.54	0.53
Si	14	K-series	1.27	1.29	3.14	0.09
Al	13	K-series	1.00	1.03	2.59	0.08
S	16	K-series	0.97	0.99	2.12	0.07
P	15	K-series	0.88	0.90	1.99	0.07
TOTAL:			97.90	100.00	100.00	

Capítulo 4. Análisis de Resultados

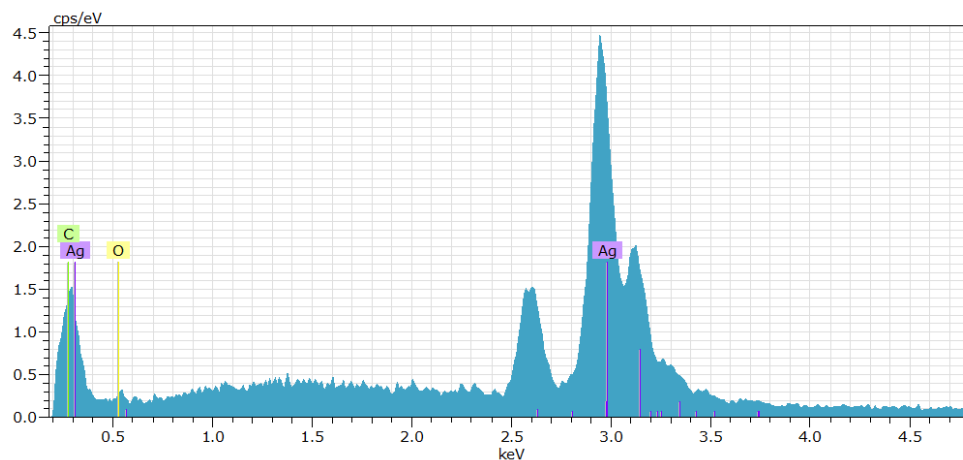


Figura 27. Caracterización por EDS de la muestra 2 de Ag-NPs.

Tabla 11. Datos de la composición atómica de la muestra 3 de Ag-NPs.

Átomo	Número atómico	Series	unn. (wt. %)	C. norm. (wt. %)	C. Atom (at. %)	C.Error (1 Sigma) (wt. %)
Ag	47	L-series	84.00	92.82	61.03	2.93
C	6	K-series	4.41	4.87	28.74	0.90
O	8	K-series	2.09	2.31	10.23	0.75
TOTAL:			90.49	100.00	100.00	

4.2.6.2. EDS de las Cu_xO-NPs

La caracterización de las Cu_xO-NPs por EDS, mostraron la presencia diferentes elementos químicos donde se dieron a conocer sus proporciones cualitativas en el nanomaterial reducido por química verde. Los elementos estipulados con mayores proporciones fueron el carbono (44.86%), oxígeno (14.50%) y cobre (11.37%) y la presencia de otros metales como sodio, silicio y potasio en cantidades menores al 10%. A partir de estos datos suministrados por la tabla 12, se deduce que el cobre formado posiblemente no se encuentra en su forma elemental, es decir, pasando de Cu²⁺ a Cu⁰, reiterando una vez más la presencia de oxígeno como parte del material formado, derivando así la conformación de las Cu_xO-NPs como se ha señalado anteriormente; esta premisa se atribuye a la presencia

Capítulo 4. Análisis de Resultados

que existe de oxígeno en la muestra evaluada. La señal de cobre elemental se puede visualizar en la figura 45, donde se muestra un pico de absorbancia óptica de poca intensidad en aproximadamente 0.92 keV, esto se puede relacionar con la información suministrada en la literatura; donde se especifica que las señales de cobre aparecen cercanas a 1 keV [59]. Por otro lado, los otros elementos químicos con picos débiles que se visualizan en el espectro pueden conformar la estructura de los metabolitos secundarios que se encuentran enlazados a la superficie de las NPs.

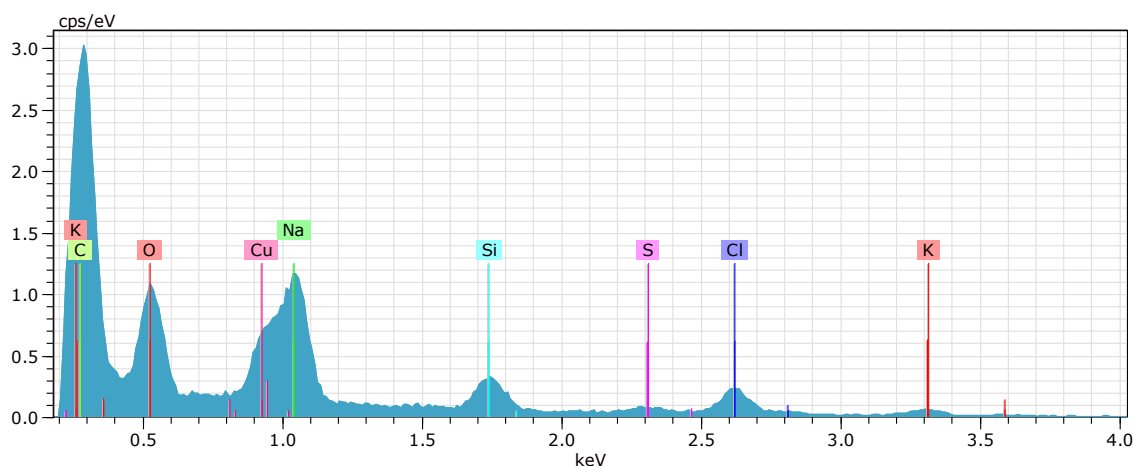


Figura 28. Caracterización por EDS de las Cu_xO-NPs.

Tabla 12. Datos de la composición atómica de las Cu_xO-NPs.

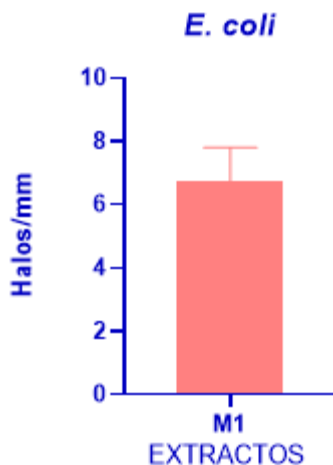
Átomo	Número atómico	Series	unn. (wt. %)	C. norm. (wt. %)	C. Atom (at. %)	C.Error (1 Sigma) (wt. %)
C	6	K-series	44.86	47.15	65.52	5.55
O	8	K-series	14.50	15.24	15.90	2.04
Cu	29	L-series	11.37	11.95	3.14	1.72
Na	11	K-series	9.05	9.51	6.91	0.55
Cl	17	K-series	7.48	7.86	3.70	0.47
Si	14	K-series	6.79	7.14	4.24	0.38
S	16	K-series	1.09	1.15	0.60	0.11
K	19	L-series	0.00	0.00	0.00	0.00

TOTAL:	95.15	100.00	100.00
---------------	--------------	---------------	---------------

4.3. Pruebas microbiológicas de las Ag-NPs y Cu_xO-NPs frente a *E. Coli* y *S. Aureus*

Muchos estudios afirman que los microorganismos como *E. Coli* y *S. Aureus* tienden a generar enfermedades crónicas en el sistema humano. De modo que, la bacteria gramnegativa, conlleva al padecimiento de enfermedades en el tracto urinario, meningitis neonatal, enteritis, entre otros daños intestinales [60]. Por otro lado, la bacteria grampositiva, se enlaza a infecciones de la piel, cardiovasculares como endocarditis, entre otros padecimientos [61]. Estos patógenos suelen ser muy resistentes a condiciones ambientales dependiendo de la cepa bacteriana. Para conocer si prevalece o se inhibe el crecimiento bacteriano, se implementó la difusión de disco, para el extracto acuoso de *Bugambilia* y las Ag-NPs y Cu_xO-NPs frente a las bacterias de *E. coli* y *S. aureus*. En este sentido, los resultados arrojaron que tanto las concentraciones de los extractos y de las NPs implementadas en el experimento presentan una zona de inhibición notable contra el crecimiento de las bacterias. En la gráfica 9 se observa que el extracto acuoso de *Bugambilia glabra* roja inhibición frente a las bacterias de *E. coli*, mientras que no presentaron poder inhibitorio contra *S. aureus*. En los resultados se demuestra una inhibición de aproximadamente 7 mm, lo cual se atribuye a los grupos funcionales de los metabolitos secundarios de la planta, como es el caso de las betacianinas que posiblemente tienen relevancia en el proceso de la muerte celular debido a su actividad antibacteriana [62].

Capítulo 4. Análisis de Resultados



Gráfica 9. Halos de inhibición del extracto de *Bugambilia glabra* roja frente a cepas bacterianas de *E. coli*.

Las evaluaciones con las Ag-NPs arrojaron resultados llamativos a la investigación, donde se pudo comprobar el potencial antibacteriano que presentan dichos nanomateriales frente a las bacterias de *E. coli* y *S. aureus* (ver gráfica 10). Estos resultados mostraron los siguientes datos de los halos de inhibición para las pruebas contra *E. coli* de: (M1: 10.825; M2: 13.425; M3: 11.475 y M4: 11.85) y contra *S. aureus* de: (M1: 14.625; M2: 10,475; M3: 11,3 y M4: 13,525), a partir de los cuales se infiere que las muestras M2 y M4 arrojaron mejores potenciales inhibitorios de bacterias gramnegativas, lo que se puede relacionar con la carga superficial de las NPs, el tamaño y la morfología de estas. De modo que, la carga superficial de estas dos muestras es positiva, permitiendo que la interacción con los lipopolisacáridos que se encuentran en la pared celular es más fuerte por atracción electrostática, ya que estos contienen una carga negativa en su estructura, conllevando a una mayor absorción y liberación de iones plata dentro de la célula bacteriana [39]. El tamaño y la morfología del material tiene prevalencia en la muerte celular, debido a que entre más pequeño y esférica o semiesférica sea la nanopartícula presenta mayor área superficial beneficiando a la liberación continua de plata dentro de la membrana citoplasmática provocando la muerte celular [39]. Por otra parte, las muestras que mejor inhibición bacteriana presentaron contra *S. aureus* fueron M1 y M3, sugiriendo que el tamaño tan pequeño que tomaron las nanopartículas de M3 según los resultados de DLS fueron los responsables. Además, se conoce que el grosor de la pared celular de las bacterias grampositivas es mayor que las

Capítulo 4. Análisis de Resultados

gramnegativas, componiéndose de una mayor cantidad de peptidoglicanos que permiten el acceso a la célula de moléculas que simulen ser parecidas a otros metales que cumplen funciones claves en la bacteria. Asimismo, la atracción entre las cargas superficiales de las NPs, que en este caso son negativas, con los compuestos de la pared celular afectando el crecimiento bacteriano [39].

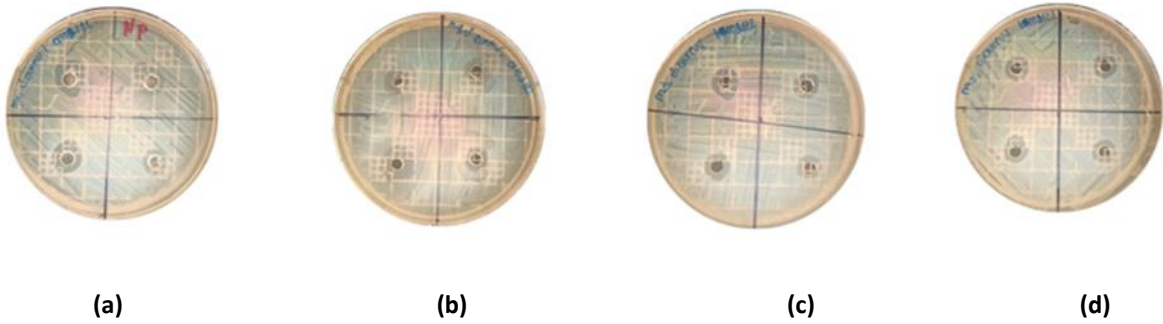


Figura 29. Difusión en agar de las Ag-NPs frente a *S. Aureus*, donde a) Ag-NPs (1 gota/gotero 1h); b) Ag-NPs (1 gota/capilar 3h); c) Ag-NPs (1 gota/ capilar 1h) y d) Ag-NPs (1 gota/gotero 3h).

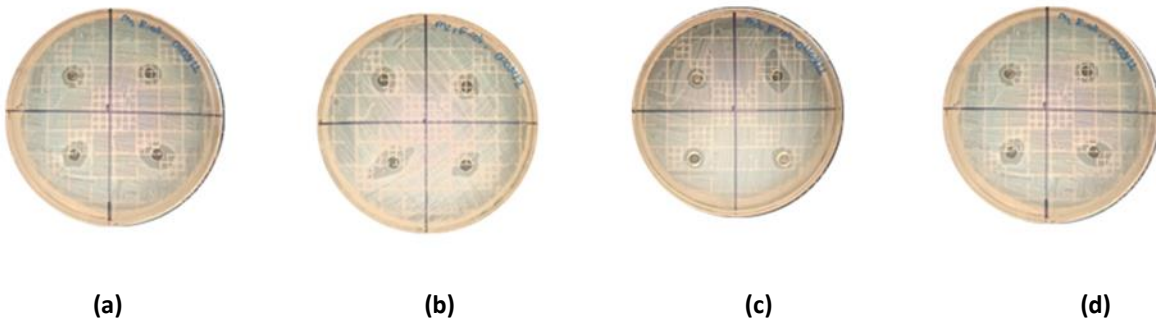
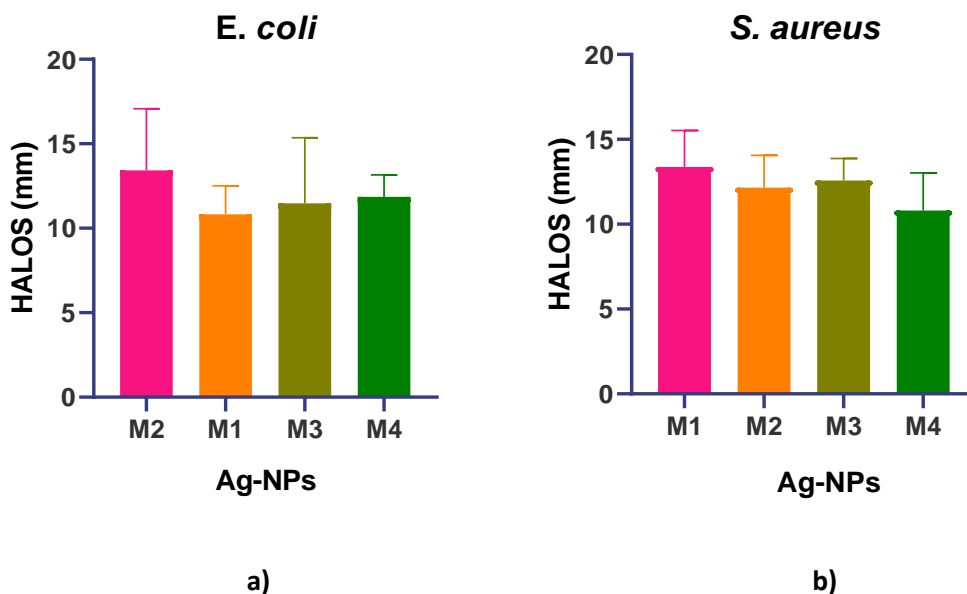


Figura 30. Difusión en agar de las Ag-NPs frente a *E. Coli*, donde a) Ag-NPs (1 gota/gotero 1h); b) Ag-NPs (1 gota/capilar 1h); c) Ag-NPs (1 gota/ gotero 3h) y d) Ag-NPs (1 gota/capilar 3h).

Capítulo 4. Análisis de Resultados



Gráfica 10. Halos de inhibición de las Ag-NPs frente a cepas bacterianas de a) *E. coli* y b) *S. aureus*, donde M1) Ag-NPs (1 gota/gotero 3h); M2) Ag-NPs (1 gota/gotero 1h); M3) Ag-NPs (1 gota/ capilar 3h) y M4) Ag-NPs (1 gota/capilar 1h).

Las Cu_xO -NPs mostraron halos de inhibición mayores contra las cepas de *E. coli* y *S. aureus* que las Ag-NPs. Los resultados fueron sobresalientes, lo que demuestra una vez más, el alto potencial antimicrobiano de las Cu_xO -NPs; donde los valores estuvieron estimados de la siguiente manera para *E. coli* (M2: 27.15 y M4: 27.05) y *S. aureus* (M2: 26.95 y M4: 33.6). En ese sentido, la mayor inhibición de las bacterias se observó con las Cu_xO -NPs en contraste con las Ag-NPs, esto se debe a las características propias de cada elemento, es decir, las NPs que contiene cobre generan una mayor liberación de iones que las Ag-NPs, lo que se asocia a la rápida oxidación que sufre el cobre al estar expuesto a oxígeno celular, y esto se atribuye a la alta capacidad antibacteriana del metal [38].

Teniendo en cuenta los resultados de la gráfica 11, se establece que las Cu_xO -NPs no presentaron diferencia significativa en la comparación de sus halos de inhibición entre las muestras M2 y M4 de la evaluación microbiana de *E. coli* y *S. aureus*. Estos valores manifiestan que el óxido de cobre tiende a ser muy reactivo para ambos patógenos, es decir, la capacidad que tiene dicho compuesto de generar sustancias ROS hace que la célula genere estrés oxidativo desencadenando la muerte bacteriana, entre otros factores que

Capítulo 4. Análisis de Resultados

influyen en la producción de ATP que tiene como papel principal mantener con vida a las bacterias [40]. Por otro lado, estos resultados, también se pueden atribuir a la concentración del precursor de cobre y tamaño de las NPs.

Para el primer parámetro, se resalta que las muestras M2 y M4 presentan una concentración de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de 1 mM, siendo que M2 no contiene tween-80 como estabilizador. Mientras que M4 si contiene dicho surfactante. Con base a lo anterior, y en los datos representados en la gráfica 11 a) y b), se infiere que al usar tween-80 como estabilizador de la solución coloidal no genera valor significativo en la actividad antibacteriana de las NPs, caso contrario ocurre con la concentración, la cual demuestra que a menores concentraciones del precursor se logra una mayor dispersión de las NPs en solución por lo que pueden interactuar más fácilmente. Además, beneficia a que el desprendimiento de iones de cobre en la bacteria sea mayor y constante por lo que se puede suponer una mayor adherencia del metal a la pared celular, manifestando así, un aumento de la toxicidad que conlleva a la muerte del microorganismo. Esto se puede comparar con investigaciones preliminares sobre nanopartículas de óxido de cobre [63], donde se evidencia que a una concentración del precursor de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de 1 mM se sintetizaron Cu_xO -NPs, las cuales se evaluaron frente a *E. coli* y *S. aureus* a diferentes diluciones. Los resultados manifestaron diámetros de halos de inhibición aproximadamente entre ~6 mm a 14 mm, menores a los obtenidos en este experimento, lo que demuestra que el proceso de síntesis y las condiciones de reacción fueron favorecedoras para las Cu_xO -NPs. Sin embargo, es importante aclarar que se deben tener otros factores en cuenta que influyen en dichos resultados.

Por otro parte, la influencia del tamaño de las NPs juega un papel crucial en la inhibición bacteriana, debido a que entre más pequeño es el diámetro del nanomaterial más fácil puede penetrar la membrana celular e interrumpir los procesos celulares. El tamaño de las Cu_xO -NPs sintetizadas (M4), presentaron diferentes diámetros que se establecieron en 9.09 nm según DLS, y entre 51 nm a 83 nm de acuerdo lo visualizado por SEM. Estos resultados se siguen considerando como indicados para que el proceso de muerte celular se genere en los dos microorganismos. De modo que, el tamaño adquirido por medio de la síntesis

Capítulo 4. Análisis de Resultados

beneficia que los iones de óxido de cobre entren en la célula bacteriana y permitan una liberación continua y controlada de los mismos; posibilitando una muerte acelerada del microorganismo. Además, se conoce que las Cu_xO -NPs presentan un rango espectro frente a bacterias gramnegativas y grampositivas como *E. coli* y *S. aureus*.

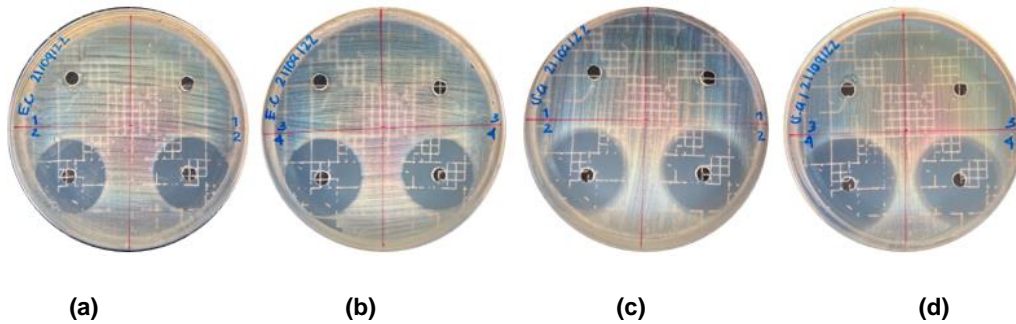
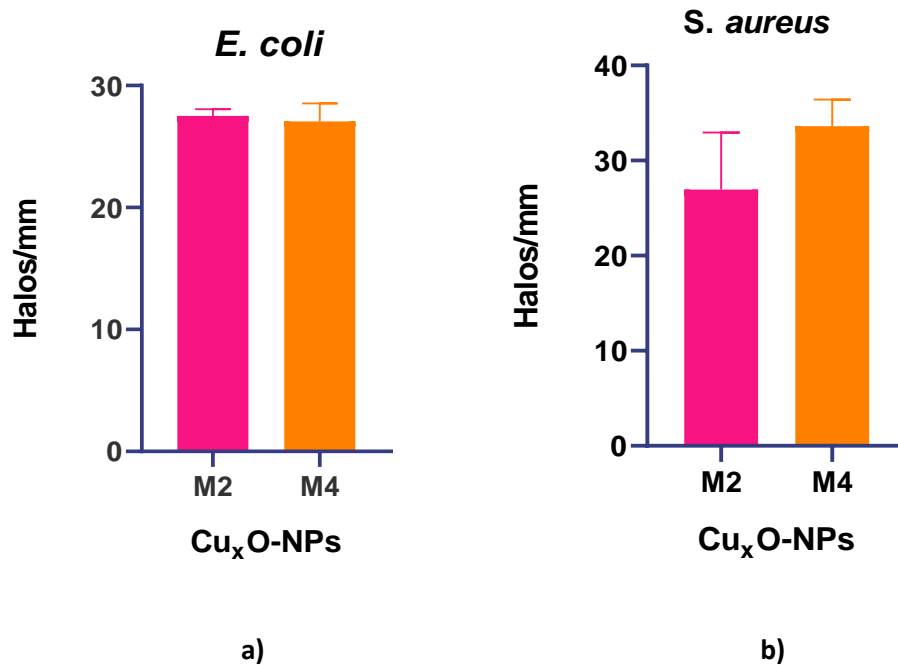


Figura 31. Difusión en agar de las Cu_xO -NPs frente a *E. coli* y *S. aureus*, donde a) - c) M2 (Cu_xO -NPs sin tween-80) y b) - d) M4 Cu_xO -NPs con tween-80).



Gráfica 11. Halos de inhibición de las Cu_xO -NPs frente a cepas bacterianas de a) *E. coli* y b) *S. aureus* donde: M2 (Cu_xO -NPs sin tween-80) y M4 (Cu_xO -NPs con tween-80).

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

La metodología planteada para la extracción y caracterización por FT-IR de los metabolitos secundarios de la *Bugambilia glabra* demostró óptimos resultados en la identificación de los diferentes grupos funcionales, corroborando una posible similitud entre las señales características de cada compuesto purificado por cromatografía en columna y preparativa. Estos resultados coinciden con lo observado por TLC, donde se indicó que los extractos acuosos y etanólicos de las plantas (rosadas, fucsias, naranjas y coloridas) se componen por moléculas que presentan semejanza en sus factores de retención (R_f).

En la síntesis de Ag-NPs y Cu_xO -NPs a partir de extracto acuoso de *Bugambilia glabra* (roja) permitió establecer nuevas condiciones de reacción que conllevaron a la obtención de buenas propiedades de los nanomateriales. A partir de estas reacciones se fijaron algunos parámetros que cumplen con las normas de química verde, donde se estipularon tiempos cortos de reacción, uso de solventes no tóxicos como el agua destilada, reacciones a temperatura ambiente, presión atmosférica, bajas concentraciones de reactivos.

Mediante las condiciones de síntesis se logró obtener con éxito tamaños de Ag-NPs y Cu_xO -NPs en un rango de 7.88 a 118.94 nm y de 9.09 a 83 nm respectivamente los cuales se comprobaron por medio de DLS y SEM, estos valores se encuentran en el rango permitido para aplicaciones biológicas según lo reportado en la literatura. En el caso de las Ag-NPs mostraron tiempos de vida mayores a los 6 meses, sin presentar precipitación o aglomerados en las soluciones coloidales. Asimismo, se demostró por SEM, que las Ag-NPs mostraron diferentes morfologías mientras que las Cu_xO -NPs se observaron con una conformación de esferas aglomeradas. Adicionalmente, las Ag-NPs y Cu_xO -NPs arrojaron valores de potencial zeta entre 34.8 a 92.8 mV y 64.4 mV respectivamente atribuyéndole al sistema una buena estabilidad coloidal. Por último, los espectros de EDS, confirmaron la presencia de plata, cobre y oxígeno en la soluciones coloidales, lo cual indica la formación de las Ag-NPs y Cu_xO -NPs respectivamente.

La metodología de síntesis empleada generó soluciones coloidales de Ag-NPs y Cu_xO -NPs que se consideraron como buenos candidatos para ser evaluados por difusión en agar,

Capítulo 6. Trabajo a Futuro y Recomendaciones

dando como resultado una fuerte actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *S. aureus*. Además, las pruebas microbiológicas demostraron que las Cu_xO-NPs presentan un mayor potencial antibacteriano comparado con las Ag-NPs. Se atribuye a que el tamaño y la química de las Cu_xO-NPs promovió un mejor potencial de inhibición. Por otro lado, el estabilizador (tween-80) no influenció en el potencial antimicrobiano, pero favoreció a la estabilidad de las Cu_xO-NPs a largo plazo. Aunque, se demostró que dichas nanopartículas presentaron potencial de inhibición frente a las bacterias de *E. coli* y *S. aureus*, no se puede especificar qué tipo de óxido está involucrado en el mecanismo de acción de las células bacterianas.

CAPÍTULO 6. TRABAJO A FUTURO Y RECOMENDACIONES

Los experimentos realizados en este trabajo de investigación dan cabida a generar nuevos objetivos y poder establecer nuevas metodologías que permitan obtener NPs con otros metales para evaluar otras propiedades biológicas que brinda la creación de nuevos materiales para la industria química, farmacéutica, cosmética y/o alimenticia. Con base a esto, se plantean las siguientes perspectivas para continuar con la investigación.

- Realizar nuevas caracterizaciones a los sistemas coloidales obtenidos tanto para plata como para óxido de cobre, mediante: espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS), difracción de rayos X (XRD), microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), entre otros. Para brindar un análisis más completo de las características fisicoquímicas de los nanomateriales.
- Establecer una metodología de síntesis verde con procesos más controlados en tiempo, temperatura y con menos exposición al oxígeno del medio ambiente para garantizar la formación de tamaños pequeños y estabilidad de nanopartículas mayores a los ± 30 mV.
- Implementar otros tipos de metales que brinden mejores propiedades al sistema, tanto biológicas como fisicoquímicas, con el objetivo de utilizar los nuevos nanomateriales en aplicaciones farmacéuticas y/o alimenticias. Además, establecer parámetros que permitan la obtención de nanopartículas bimetálicas y/o trimetálicas que conlleven a un mejor funcionamiento.
- Lograr la purificación y elucidación de metabolitos secundarios de la planta de *Bugambilia glabra* para verificar sus actividades por medio de pruebas microbiológicas, y poder establecer nuevas metodologías sintetizadas que conlleven a la funcionalización de NPs a través de reacciones organometálicas. Donde este tipo de nanomateriales se pueden utilizar en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas en el uso de nuevos medicamentos, como encapsulación de compuestos activos, hidrogeles, implantes metálicos benefician a ciertas patologías.

Capítulo 6. Trabajo a Futuro y Recomendaciones

- Realizar pruebas de citotoxicidad para diferentes líneas de células mamíferas, dado que estos estudios son necesarios pensando en utilizar dichas síntesis como elementos terapéuticos para combatir infecciones causadas por bacterias grampositivas y gramnegativas para lograr demostrar su posible aplicación en el ámbito farmacéutico y/o médico.

CAPÍTULO 7. ANEXOS

La *Bugambilia glabra* se caracteriza por tener una gran variedad de colores en los que se encuentra el rojo, fucsia, rosado, amarillo, blanco y morado. Esta característica se relaciona con los metabolitos secundarios que se compone la flor, más específicamente por las betalainas. Estas estructuras orgánicas se consideran pigmentos naturales pertenecientes a la familia *Cactaceae* [64], y se derivan en otros compuestos como betacianinas, betaxantinas y ácidos betalamicos, que no solo le brindan el color a la planta, sino que, además, presentan propiedades biológicas importantes que le permiten actuar como un potente agente antimicrobiano, antiviral, antidiabético, antioxidante entre otras [65].

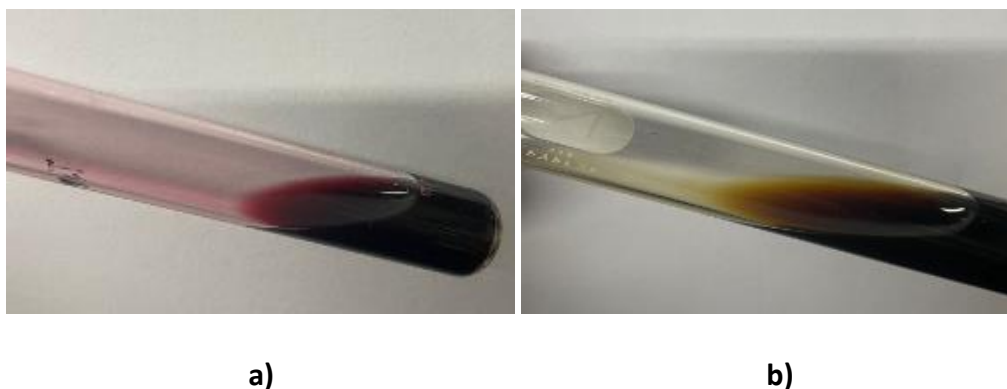


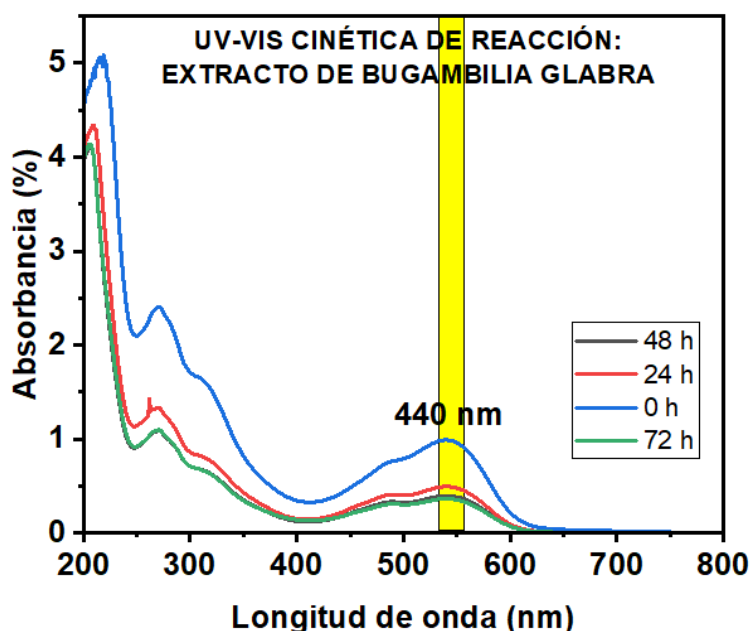
Figura 49. Prueba cualitativa de Betacianinas para la planta de *Bugambilia glabra* roja con cambio de color de rojo a amarillo-marrón arrojando un resultado positivo para este metabolito secundario, donde: a) extracto acuoso y b) extracto con NaOH (1N).

La literatura científica expone que las betalainas cumplen un papel importante en la función de la planta, por lo que al extracto acuoso de *Bugambilia glabra* rojo, se le realizó un estudio cinético con el objetivo de conocer el tiempo de vida media, la variabilidad de la degradación y la constante de velocidad de las betacianinas, las cuales, según la literatura, aparecen en un pico cercano a los 483 nm para betaxantinas y en 538 nm para betacianinas [59]. Por otro lado, la información suministrada da a conocer que uno de los métodos que se implementan para evaluar la estabilidad del compuesto es por factores lumínicos, térmicos, variaciones de pH y/o exposición a concentraciones altas de oxígeno [59].

Teniendo en cuenta lo anterior, para el proceso experimental, se tomaron 5 mL de extracto acuoso de *Bugambilia glabra* roja y se adicionaron en un vaso de precipitados,

Capítulo 7. Anexos

posteriormente, las muestras se colocaron frente a una lámpara de luz blanca con tiempos específicos de exposición de: 0 h, 24 h, 48 h y 72 h. Luego de transcurrido el tiempo se tomaron alícuotas de cada muestra y se caracterizaron por espectroscopía UV-Vis con el objetivo de observar la disminución de la absorbancia del extracto en rangos de longitud de onda de 400 nm a 600 nm en el cual se encuentran las betalainas.



Gráfica 12. Espectro UV-Vis de la degradabilidad por exposición a la luz blanca del extracto acuoso de *Bugambilia glabra* roja, donde: línea azul (0 h), línea roja (24 h), línea negra (48 h) y línea verde (72 h).

A partir del espectro UV-Vis, representando en la gráfica 12, se puede suponer que los picos que aparecen en el espectro en longitudes de onda cercanas a 483 nm y 540 nm corresponden a betaxantinas y betacianinas respectivamente. Por otro lado, se comprueba la degradación del extracto acuoso de *Bugambilia* a medida que transcurre el tiempo de exposición a la luz blanca. Donde se interpreta, que los productos de interés para este estudio en particular, los cuales son las betacianinas, disminuye su concentración a medida que permanecen más tiempo expuestos a la luz, lo cual concuerda con la información de la literatura [59]. De acuerdo a la información anterior, se deduce que a medida que se incrementa el tiempo de exposición a la luz del compuesto el grado de retención del pigmento en las bracteas de la flor decrece. Este hecho, no solo afecta la coloración de la planta, sino que también se reduce el potencial en sus actividades biológicas, sobre todo

Capítulo 7. Anexos

aquel que es de interés para esta investigación, relacionado con sus propiedades antimicrobianas. Particularmente, por medio de las pruebas microbiológicas de los extractos acuosos de plantas *Bugambilia* recién recolectadas versus *Bugambilia* almacenadas se observó dicho suceso, debido a que se evidenció un resultado positivo de inhibición frente a bacterias de *E. coli* y *S. aureus* para el primer extracto, mientras que para el segundo las colonias bacterianas crecieron con normalidad.

Por otro lado, los estudios cinéticos para este experimento demostraron que la reacción se considera de orden dos con un R^2 : 0.9122 (ver tabla 13). Sin embargo, lo estipulado en revistas científicas, ratifican que la constante de velocidad para la degradación térmica de las betacianinas y betaxantinas es de orden uno [59] donde los coeficientes de determinación R^2 están cercanas a 1.

Tabla 13. Ordenes de reacción de los extractos acuosos de *Bugambilia glabra* roja expuestos a la luz en tiempos de 0h, 24 h, 48h y 72 h.

Tiempo (h)	Absorbancia	Orden Cero	Orden Uno	Orden Dos
0	0.984	55.3015833	4.01280154	5.02296×10^{-12}
24	0.494	27.6228333	3.31864273	1.00561×10^{-11}
48	0.395	22.0870833	3.09499297	1.25765×10^{-11}
72	0.363	20.29775	3.01051004	1.36852×10^{-11}
R^2		0.7681	0.8413	0.9122

Referencias

REFERENCIAS

- [1] Pal, G., Rai, P., & Pandey, A. (2019). *Green synthesis of nanoparticles: A greener approach for a cleaner future. Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles, 1–26.* doi:10.1016/b978-0-08-102579-6.00001-0
- [2] Guan, Zhenru & Ying, Shuaixuan & Ofoegbu, Polycarp & Clubb, Preston & Rico, Cyren & He, Feng & Hong, Jie. (2022). Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. *Environmental Technology & Innovation.* 26. 102336. 10.1016/j.eti.2022.102336.
- [3] Martínez-Ballesta, Mc., Gil-Izquierdo, Á., García-Viguera, C., & Domínguez-Perles, R. (2018). *Nanoparticles and Controlled Delivery for Bioactive Compounds: Outlining Challenges for New “Smart-Foods” for Health. Foods, 7(5), 72.* doi: 10.3390/foods7050072.
- [4] Yaqub, A., Malkani, N., Shabbir, A. *et al.* Nueva biosíntesis de nanopartículas de cobre utilizando *Zingiber* y *Allium* sp. con efecto sinérgico de doxiciclina para actividad anticancerígena y bactericida. *Curr Microbiol,* 77, 2287–2299 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02058-4>.
- [5] Nikzamir, M., Akbarzadeh, A., Panahi, Y. (2021). An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* Volume 61. 102316, doi: 10.1016/j.jddst.2020.102316.
- [6] Lenoir, D., Schramm, K.-W., & Lalah, J. O. (2020). *Green Chemistry: Some important forerunners and current issues. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 18, 100313.* doi: 10.1016/j.scp.2020.100313.
- [7] Török, B., & Dransfield, T. (2018). *Green Chemistry. Green Chemistry, 3–16.* doi: 10.1016/b978-0-12-809270-5.00001-7.
- [8] <https://www.utep.edu/herbal-safety/hechos-herbarios/hojas-de-datos-a-base-de-hierbas/bugambilia.html>. Recuperado: 12/08/2022.

Referencias

- [9] Escobar, A. J. (2016). Evaluación de la protección y liberación del extracto de bugambilia (*Bougainvillea* sp.) Encapsulado en perlas de alginato y almidón de maíz. [Tesis de pregrado, Universidad Autónoma del Estado de México]. <https://core.ac.uk/download/pdf/80533645.pdf>
- [10] Saleem, H., Usman, A., Mahomoodally, M. F., & Ahemad, N. (2020). *Bougainvillea glabra* (Choisy): A comprehensive review on botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 113356. doi: 10.1016/j.jep.2020.113356.
- [11] Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). *Flavonoids: an overview*. *Journal of Nutritional Science*, 5. doi: 10.1017/jns.2016.41.
- [12] Kumorkiewicz-Jamro, A., Popenda, L., & Wybraniec, S. (2020). *Identification of Novel Low-Weight Sulfhydryl Conjugates of Oxidized 5-O- and 6-O-Substituted Betanidin Pigments*. *ACS Omega*. doi: 10.1021/acsomega.0c00378.
- [13] Nagula, R. L., & Wairkar, S. (2019). *Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review*. *Journal of Controlled Release*. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.01.029.
- [14] Rosas, E. C., Correa, L. B., & das Graças Henriques, M. (2019). *Antiinflammatory Properties of Schinus terebinthifolius and Its Use in Arthritic Conditions*. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, 489–505. doi: 10.1016/b978-0-12-813820-5.00028-3.
- [15] Eksi, G., Kurbanoglu, S., & Erdem, S. A. (2020). *Analysis of diterpenes and diterpenoids*. *Recent Advances in Natural Products Analysis*, 313–345. doi: 10.1016/b978-0-12-816455-6.00009-3.
- [16] <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html>. Recuperado: 15/08/2022

Referencias

- [17] Cuesta, O., Márquez, I., Campo, M. (2015). *Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides. Caracterización estructura de flavonoides*. Machala, Ecuador. UTMACH. 21-69.
- [18] Perez de Souza, L., Alseekh, S., Scossa, F., & Fernie, A. R. (2021). *Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry variants for metabolomics research*. *Nature Methods*, 18(7), 733–746. doi:10.1038/s41592-021-01116-4.
- [19] Nováková, L., Svoboda, P., & Pavlík, J. (2017). *Ultra-high performance liquid chromatography*. *Liquid Chromatography*, 719–769. doi: 10.1016/b978-0-12-805393-5.00029-4.
- [20] Clarke, W. (2017). *Espectrometría de masas en el laboratorio clínico: determinando la necesidad y evitando trampas*. *Espectrometría de masas para el laboratorio clínico*, 1–15. doi:10.1016/b978-0-12-800871-3.00001-8.
- [21] Tunneled Frit Nano-UPLC-MS Column. High performance liquid chromatography. <http://www.chromnet.net/TunneledFritNano-UPLC-MSColumn.aspx>. Recuperado: 15 de mayo de 2023.
- [22] Simpson, A. J., Simpson, M. J., & Soong, R. (2012). *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Its Key Role in Environmental Research*. *Environmental Science & Technology*, 46(21), 11488–11496. doi:10.1021/es302154w.
- [23] Zia, K., Siddiqui, T., Ali, S., Farooq, I., Zafar, MS y Khurshid, Z. (2019). *Espectroscopía de resonancia magnética nuclear para aplicaciones médicas y dentales: una revisión completa*. *Revista Europea de Odontología*, 13(01), 124–128. doi:10.1055/s-0039-1688654
- [24] Sharma, G., Pandey, S., Ghatak, S., Watal, G., & Rai, P. K. (2018). *Potential of Spectroscopic Techniques in the Characterization of “Green Nanomaterials.” Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*, 59–77. doi: 10.1016/b978-0-12-811487-2.00003-7.

Referencias

- [25] Patil, P., Killedar, S. (2021). Chitosan and glyceryl monooleate nanostructures containing gallic acid isolated from amla fruit: targeted delivery system, *Heliyon*. Volume 7, Issue 3. doi: 10.1016/j.heliyon. 2021.e06526.
- [26] Hu, Y., & Liu, B. (2022). Roles of zinc-binding domain of bacterial RNA polymerase in transcription, *Trends in Biochemical Sciences*, Volume 47, Pages 710-724, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.03.007>.
- [27] Das, B. y Patra, S. (2017). *Antimicrobianos. Nanoestructuras para la terapia antimicrobiana*, 1–22. doi: 10.1016/b978-0-323-46152-8.00001-9.
- [28] Roy, P., Das, B., Mohanty, A., & Mohapatra, S. (2017). *Green synthesis of silver nanoparticles using Azadirachta indica leaf extract and its antimicrobial study. Applied Nanoscience*, 7(8), 843–850. doi:10.1007/s13204-017-0621-8.
- [29] Ghosh, M. K., Sahu, S., Gupta, I., & Ghorai, T. K. (2020). *Green synthesis of copper nanoparticles from an extract of Jatropha curcas leaves: characterization, optical properties, CT-DNA binding and photocatalytic activity. RSC Advances*, 10(37), 22027–22035. doi: 10.1039/d0ra03186k.
- [30] Wang, H. y Chu, PK (2013). *Caracterización Superficial de Biomateriales. Caracterización de biomateriales*, 105–174. doi:10.1016/b978-0-12-415800-9.00004-8.
- [31] Principle of UV-Vis Spectroscopy. <https://www.smacgigworld.com/blog/principle-uv-vis-spectroscopy-.php>. Recuperado: 15 de mayo de 2023.
- [32] Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B., & Tekade, R. K. (2019). *Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. Basic Fundamentals of Drug Delivery*, 369–400. doi: 10.1016/b978-0-12-817909-3.00010-8.
- [33] Babick, F. (2020). *Dispersión de luz dinámica (DLS). Caracterización de nanopartículas*, 137–172. doi:10.1016/b978-0-12-814182-3.00010-9.

Referencias

- [34] A brief introduction to SEM (Scanning Electron Microscopy). Sci Med. <https://www.scimed.co.uk/education/sem-scanning-electron-microscopy/>. Recuperado: 15 de mayo de 2023.
- [35] Parit. G.R. & Patil. I.A. (EDAX) energy dispersive X-ray spectroscopy. <https://pt.slideshare.net/RushikeshGParit/edaxenergy-dispersive-xray-spectroscopy>. Recuperado: 15 de mayo de 2023.
- [36] Sinha Ray, S. (2013). *Técnicas de caracterización de la estructura y propiedades de nanocompuestos poliméricos. Nanocompuestos poliméricos respetuosos con el medio ambiente*, 74–88. doi: 10.1533/9780857097828.1.74.
- [37] Schematic of an atomic force microscope. NIST. <https://www.nist.gov/image/afmschematic>. Recuperado: 15 de mayo de 2023.
- [38] Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O., & Bach, H. (2017). *Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. Journal of Nanobiotechnology*, 15(1). doi:10.1186/s12951-017-0308-z.
- [39] Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). *The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. International Journal of Nanomedicine, Volume 15*, 2555–2562. doi:10.2147/ijn.s246764.
- [40] Applerot, G., Lellouche, J., Lipovsky, A., Nitzan, Y., Lubart, R., Gedanken, A., & Banin, E. (2012). *Understanding the Antibacterial Mechanism of CuO Nanoparticles: Revealing the Route of Induced Oxidative Stress. Small*, 8(21), 3326–3337. doi:10.1002/smll.201200772.
- [41] Húngaro, H. M., Peña, W. E. L., Silva, N. B. M., Carvalho, R. V., Alvarenga, V. O., & Sant'Ana, A. S. (2014). *Food Microbiology. Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 213–231. doi: 10.1016/b978-0-444-52512-3.00059-0.
- [42] Coy-Barrera, E. (2020). *Analysis of betalains (betacyanins and betaxanthins). Recent Advances in Natural Products Analysis*, 593–619. doi: 10.1016/b978-0-12-816455-6.00017-2.

Referencias

- [43] Sahu, N., Saxena, J., 2013. Phytochemical analysis of *Bougainvillea glabra* Choisy by FTIR and UV-VIS spectroscopic analysis. *Int. J. Pharmaceut. Sci. Rev. Res.* 21, 196–198.
- [44] Pareek, N., Dhaliwal, AS y Malik, CP (2012). *Síntesis biogénica de nanopartículas de plata utilizando Bougainvillea spectabilis Willd. Extracto de bráctea. Letras de Ciencias de la Academia Nacional*, 35(5), 383–388. doi: 10.1007/s40009-012-0067-1.
- [45] Martínez Espinosa, J. C., Carrera Cerritos, R., Ramírez Morales, M. A., Sánchez Guerrero, K. P., Silva Contreras, R. A., & Macías, J. H. (2020). *Characterization of Silver Nanoparticles Obtained by a Green Route and Their Evaluation in the Bacterium of Pseudomonas aeruginosa. Crystals*, 10(5), 395. doi: 10.3390/cryst10050395.
- [46] Vincent, S., Kovendan, K., Chandramohan, B., Kamalakannan, S., Kumar, P. M., Vasugi, C., ... Benelli, G. (2016). *Swift Fabrication of Silver Nanoparticles Using Bougainvillea glabra: Potential Against the Japanese Encephalitis Vector, Culex tritaeniorhynchus Giles (Diptera: Culicidae). Journal of Cluster Science*, 28(1), 37–58. doi: 10.1007/s10876-016-1038-3.
- [47] Das, R., Nath, S.S., Chakdar, D., Gope, G., Bhattacharjee, R. (2009). Preparation of silver nanoparticles and their characterization. *J. Nanotechnol.* 5, 1–6. doi: 10.2240/azojono0129.
- [48] Marslin, G., Siram, K., Maqbool, Q., Selvakesavan, R., Kruszka, D., Kachlicki, P., & Franklin, G. (2018). *Secondary Metabolites in the Green Synthesis of Metallic Nanoparticles. Materials*, 11(6), 940. doi:10.3390/ma11060940.
- [49] Sukumar, S., Rudrasenan, A., & Padmanabhan Nambiar, D. (2020). *Green-Synthesized Rice-Shaped Copper Oxide Nanoparticles Using Caesalpinia bonducella Seed Extract and Their Applications. ACS Omega*. doi:10.1021/acsomega.9b02857.
- [50] Beltrán-Partida, E., Valdez-Salas, B., Valdez-Salas, E., Pérez-Cortéz, G., & Nedev, N. (2019). *Synthesis, Characterization, and In Situ Antifungal and Cytotoxicity Evaluation of Ascorbic Acid-Capped Copper Nanoparticles. Journal of Nanomaterials*, 2019, 1–10. doi: 10.1155/2019/5287632.

Referencias

- [51] Vincent, S., Kovendan, K., Chandramohan, B., Kamalakannan, S., Kumar, P. M., Vasugi, C., ... Benelli, G. (2016). *Swift Fabrication of Silver Nanoparticles Using Bougainvillea glabra: Potential Against the Japanese Encephalitis Vector, Culex tritaeniorhynchus Giles (Diptera: Culicidae)*. *Journal of Cluster Science*, 28(1), 37–58. doi:10.1007/s10876-016-1038-3.
- [52] Ahmed, SB, Mohamed, HI, Al-Subaie, AM *et al.* Investigación de la actividad antimicrobiana y patrón hematológico del nano-quitosano y su compuesto de nano-cobre. *Informe científico* 11, 9540 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88907-z>.
- [53] Dare, E. O., Oseghale, C. O., Labulo, A. H., Adesuji, E. T., Elemike, E. E., Onwuka, J. C., & Bamgbose, J. T. (2014). *Green synthesis and growth kinetics of nanosilver under bio-diversified plant extracts influence*. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 5(1), 85–94. doi: 10.1007/s40097-014-0139-5.
- [54] Chugh, D., Viswamalya, VS & Das, B. Síntesis verde de nanopartículas de plata con algas y la importancia de los agentes de protección en el proceso. *J Genet Eng Biotechnol* 19, 126 (2021). <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00228-w>.
- [55] Li, H.-J., Zhang, A.-Q., Hu, Y., Sui, L., Qian, D.-J., & Chen, M. (2012). *Large-scale synthesis and self-organization of silver nanoparticles with Tween 80 as a reductant and stabilizer*. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 612. doi: 10.1186/1556-276x-7-612.
- [56] Abdelmoteleb, A., Valdez-Salas, B., Carrillo-Beltran, M., Hernandez, D. D., & González-Mendoza, D. (2016). *Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Pluchea sericea a Native Plants from Baja California, Mexico and their Potential Application as Antimicrobials*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42(2), 457–463. doi: 10.1007/s40995-016-0019-6.
- [57] Momeni, M., Asadi, S., & Shanbedi, M. (2021). Antimicrobial Effect of Silver Nanoparticles Synthesized with Bougainvillea Glabra Extract on *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, 40(2), 395-405. doi: 10.30492/ijcce.2020.97592.3369.

Referencias

- [58] Berra, D., Laouini, SE, Benhaoua, B., Ouahrani, MR, Berrani, D. y Rahal, A. (2018). Síntesis verde de nanopartículas de óxido de cobre por extracto de hojas de *Pheonix dactylifera* L. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 13 (4), 1231-1238.
- [59] Rajesh, KM, Ajitha, B., Reddy, YAK, Suneetha, Y. y Reddy, PS (2018). Síntesis verde asistida de nanopartículas de cobre usando extracto de yema de *Syzygium aromaticum*: propiedades físicas, ópticas y antimicrobianas. *Optik*, 154, 593–600. doi: 10.1016/j.ijleo.2017.10.074.
- [60] Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). *Escherichia coli*. *Microbiology of Waterborne Diseases*, 89–117. doi:10.1016/b978-0-12-415846-7.00006-8
- [61] Leung, Y. L. (2014). *Staphylococcus aureus*. *Encyclopedia of Toxicology*, 379–380. doi:10.1016/b978-0-12-386454-3.00539-x.
- [62] O. Enciso-Díaz, A. Méndez-Gutiérrez, L. Jesús, A. Sharma, M. Villarreal and A. Taketa, "Antibacterial Activity of *Bougainvillea Glabra*, *Eucalyptus Globulus*, *Gnaphalium Attenuatum*, and Propolis Collected in Mexico," *Pharmacology & Pharmacy*, Vol. 3 No. 4, 2012, pp. 433-438. doi: 10.4236/pp.2012.34058.
- [63] Sathiyavimal, S., Vasantharaj, S., Bharathi, D., Mythili, S., Manikandan, E., Kumar, S. S., & Pugazhendhi, A. (2018). *Biogenesis of copper oxide nanoparticles (CuONPs) using Sida acuta and their incorporation over cotton fabrics to prevent the pathogenicity of Gram negative and Gram positive bacteria*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.09.
- [64] Coskuner, Y., Turker, N., Ekiz, H. I., Aksay, S., & Karababa, E. (2000). *Effect of pH and temperature on the thermostability of prickly pear (Opuntia ficus-indica) yellow-orange pigments*. *Nahrung/Food*, 44(4), 261–263. doi:10.1002/1521-3803(20000701)44:4<261::aid-food261>3.0.co;2-y
- [65] Carreón, J., Franco, D., Gómez-Linton, Gómez, D., & Pérez, L. (2021). Betalain plant sources, biosynthesis, extraction, stability enhancement methods, bioactivity, and applications. *Food Research International*. 151. 110821. 10.1016/j.foodres.2021.110821.

Referencias