



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Química

**“Biosíntesis y caracterización de NPs de Ag con
Eysenhardtia polystachya (palo azul) y su inhibición
sobre el crecimiento de *Clostridium sp.*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencia de Materiales

PRESENTA:

Blanca Virginia Estevez Posadas

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Raúl Alberto Morales Luckie

DIRECTORES ADJUNTOS

Dr. Gustavo López Tellez

Dr. Felipe Cuenca Mendoza



Toluca, México

Octubre, 2017

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE CUADROS	3
ABREVIATURAS.....	4
CAPITULO 1: ANTECEDENTES	7
1.1. RESUMEN.....	7
1.2. INTRODUCCIÓN	8
1.3. NANO-MATERIALES	10
1.3.1. Nano-partículas (NPs).....	12
1.3.2. Nano-partículas metálicas (NPsM) y resonancia del plasmón de superficie (SPR)	13
1.3.3. Métodos de obtención de NPs	16
1.3.3.1.1. Bio reductores.....	19
1.3.3.1.1.1. Eysenhardtia polystachya	19
1.3.4. Mecanismo general de formación de Nano partículas metálicas (NPsM) por reducción de sales	20
1.4. PLATA (Ag).....	21
1.4.1. Nano-partículas de plata (NPs Ag).....	22
1.4.2. Efecto bactericida de las NPs Ag	23
1.5. GÉNERO CLOSTRIDIUM	26
1.5.1. Clostridium difficile.....	26
1.5.2. Clostridium tetani	26
1.5.3. Clostridium botulinum.	27
1.5.4. Clostridium perfringens	27
CAPITULO 2	30
2.1. JUSTIFICACIÓN	30
2.2. HIPÓTESIS	31
2.3. OBJETIVO GENERAL.....	31
2.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
CAPITULO 3: MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN	32
3.1. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE NPsM	32

3.1.1.	Espectroscopia UV-Vis.....	32
3.1.2.	Microscopia de transmisión	33
3.1.3.	Espectroscopia de Dispersión de energía (EDS).....	34
3.2.	TÉCNICAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	34
3.2.1.	Método de Kirby-Bauer.	35
3.2.2.	Concentración Mínima inhibitoria (CMI).....	37
3.2.3.	Concentración mínima letal (CML).....	38
CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS.....		40
4.1.	MATERIALES	40
4.2.	OBTENCIÓN DEL AGENTE REDUCTOR.....	41
4.3.	SÍNTESIS DE NPs Ag.....	41
4.4.	CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis.	41
4.5.	CARACTERIZACIÓN POR SEM/EDS	42
4.6.	CARACTERIZACIÓN POR TEM	42
4.7.	TÉCNICAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	43
4.7.1.	Método de Kirby-Bauer	43
4.7.2.	Micro-dilución en caldo.	44
4.7.3.	Concentración mínima letal.	47
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....		48
5.	OBTENCIÓN DEL AGENTE REDUCTOR	48
5.2.	OBTENCIÓN DE LAS NPs Ag.....	50
5.3.	CINÉTICA DE SÍNTESIS DE LAS NPs Ag CON PALO AZUL	51
5.4.	COMPOSICIÓN OBSERVADA POR EDS DE LAS NPs Ag OBTENIDAS.....	53
5.5.	TAMAÑO Y FORMA DE LAS NPs Ag OBTENIDAS	54
5.6.	SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	57
5.6.1.	Técnica de Kirby-Bauer para halo inhibitorio.....	57
5.6.2.	CMI.....	59
5.6.3.	CML.....	59
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES		62
REFERENCIAS		64
ANEXOS.....		73
ANEXO 1: Certificado taxonómico de <i>E. polystachya</i>		73
ANEXO 2: Pruebas de confirmación de la bacteria <i>Clostridium</i> sp.....		74
ANEXO 3: Cálculos de concentración de plata para la muestra 3.		77

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Clasificación de los nanomateriales</i>	12
<i>Figura 2: Interacción del campo eléctrico de la radiación electromagnética sobre la superficie de NPsM</i>	15
<i>Figura 3: Absorbancia del SPR de NPs Ag esféricas</i>	15
<i>Figura 4: Comparación del efecto bactericida de NPs Ag contra iones de Ag⁺.</i>	24
<i>Figura 5: Esquema de las diluciones para sembrado en placa para obtener CML o CMB</i>	39
<i>Figura 6: Método de inoculación de las placas de agar MH para la prueba de halos de inhibición</i>	44
<i>Figura 7: Absorbancia de las diluciones del extracto</i>	48
<i>Figura 8: Estructura básica de los flavonoides</i>	49
<i>Figura 9: Extracto sin diluir y dilución 1:40</i>	49
<i>Figura 10: Absorbancia del plasmón superficial de todos los sistemas.</i>	50
<i>Figura 11: Cambio en la coloración de los sistemas debido a la formación de las NPs Ag.</i>	51
<i>Figura 12: Cinética de síntesis de la muestra 3 (0.3 ml NO₃Ag + 5 ml de extracto)</i>	52
<i>Figura 13: Tiempo (h) vs Abs, muestra 3.</i>	53
<i>Figura 14: Análisis de la muestra por SEM/EDS</i>	54
<i>Figura 15: Micrografías de TEM, muestra 3</i>	55
<i>Figura 16: Distribución de tamaños de partículas de la muestra 3</i>	55
<i>Figura 17: Micrografías de TEM, muestra 6</i>	56
<i>Figura 18: Micrografía HRTEM, muestra 3.</i>	57
<i>Figura 19: Prueba de Halos de inhibición</i>	58
<i>Figura 20: Microplaca a partir del pocillo 7, para CMI</i>	59
<i>Figura 21: Sembrado en placa del pocillo 10 y 9</i>	60
<i>Figura 22: Sembrado en placa del pocillo 8 y 7</i>	61
<i>Figura 23: Tinción gram de Clostridium sp</i>	74
<i>Figura 24: Acercamiento de la tinción gram de Clostridium sp.</i>	75
<i>Figura 25: Prueba de anaerobiosis de Clostridium sp.</i>	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tamaños y materiales de nano-estructuras	11
Cuadro 2. Relación de volúmenes de los reactivos para la obtención de NPs Ag	41
Cuadro 3: Diluciones de NPs Ag para prueba de micro-dilución en caldo.	45
Cuadro 4: Sembrado en mi-croplaca	46
Cuadro 5: Determinación de la CMI y CML de NPs Ag contra <i>Clostridium sp.</i>	60

ABREVIATURAS

Ag	Plata
AgNO ₃	Nitrato de plata
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Au	Oro
BN	Nitruro de boro
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CML	Concentración mínima letal
Cu	Cobre
DL ₅₀	Dosis letal media
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
EDS	Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (Energy-dispersive X-ray spectroscopy)
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Food and drug administration
g	Gramo
GaN	Nitruro de galio
h	Horas
kg	Kilogramo
Li	Litio
M	Molar
MH	Mueller Hinton
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NaNO ₂	Nitrito de sodio
NCCLS	National committee for clinical laboratory standards
nm	Nanómetro
NPs	Nanopartículas
NPsM	Nanopartículas metálicas
NPs Ag	Nanopartículas de plata
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
SEM	Microscopía electrónica de barrido (Scanning electron microscopy)
Si	Silicio
SPR	Resonancia del plasmón de superficie (surface plasmon resonance)
SPS	Sulfato polimixina sulfadiazina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (transmission electron microscopy)
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV- Vis	Luz en el rango del ultravioleta y visible
µg	Microgramos
µl	Microlitro
°C	Grados Celsius
Å	Ångström

Agradecimientos

Se agradece principalmente a mi comité tutor conformado por el Dr. Raúl Alberto Morales Luckie, Dr. Gustavo López Tellez, y el Dr. Felipe Cuenca Mendoza por su dedicación y profesionalismo, su amistad invaluable y por ser un apoyo esencial en mi formación académica.

Se agradece el apoyo de CONACYT por la beca otorgada.

Se agradece al Maestro Sergio Humberto Pavón Romero (Facultad de Química UAEM) por la asesoría, espacio y recursos proporcionados, su tiempo y su amistad.

Se agradece al Dr. Alberto Martín Molina (Facultad de Ciencias, UGR, Granada, España) por todo su apoyo, enseñanza y amistad invaluable que me brindó durante mi estancia en el departamento de física aplicada.

Se agradece la beca otorgada por el CONACYT para realizar las estancias de investigación en el departamento de física aplicada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, España.

Al Dr. Alfredo Rafael Vilchis Nestor (CCIQS UAEM-UNAM) y al Dr. Gustavo López Tellez (CCIQS UAEM-UNAM) por la ayuda otorgada para la obtención de las micrografías para este trabajo.

Al Dr. Alejandro Dorazco Gonzáles (CCIQS UAEM-UNAM) y al Dr. Enrique Viguera Santiago (facultad de Química UAEM) por facilitar el uso del espectrofotómetro UV-Vis.

Quiero agradecer a todos mis profesores por su valiosa enseñanza.

A Todos mil gracias.

Dedicatoria

A mis padres por ser un ejemplo de vida, por su amor incondicional, y su infinita paciencia.

A mis hermanos Flor y Daniel, por ser un gran apoyo y nunca perder su fe en mí.

A toda mi familia porque gracias a todos soy una mejor persona cada día.

A Jesús Salvador Adame, por acompañarme en esta aventura llamada vida y ayudarme a realizar mis sueños.

A todos mis amigos por hacerme sonreír cada día.

CAPITULO 1: ANTECEDENTES

1.1. RESUMEN

Ha tomado auge recientemente la bio-reducción como método de obtención de nano-partículas metálicas (NPsM), debido a que es amigable con el medio ambiente y de bajo costo. Este método hace extenso uso de plantas medicinales y sus extractos, tal es el caso de *Eysenhardtia polystachya*, que es un arbusto nativo de Norteamérica. La bio-reducción es ampliamente utilizada para síntesis de nano-partículas de plata (NPs Ag) que destacan por sus aplicaciones bactericidas. Por otro lado, el generó *Clostridium* está compuesto por bacterias gram positivas, anaeróbicas, que forman esporas y toxinas muy potentes, se encuentran en la flora intestinal de animales y seres humanos, por lo cual son de gran importancia en la industria agroalimentaria. En base a lo anterior el objetivo de este trabajo es sintetizar y caracterizar NPs Ag menores a 70 nm obtenidas mediante bio-reducción con *Eysenhardtia polystachya* y determinar las propiedades inhibitorias contra *Clostridium sp.* La caracterización de las NPs Ag se realizó mediante espectroscopia UV- Vis, SEM/EDS y TEM, para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana se realizaron las pruebas de Kirby-Bauer para halo inhibitorio, micro dilución en caldo para concentración mínima inhibitoria (CMI) y sembrado en placa para concentración mínima letal (CML). Se obtuvo una cinética de síntesis en la cual se muestra el límite de la reacción a las 48 h de ser iniciada, además de observar que la proporción adecuada para la formación de NPs Ag corresponde a 5 ml de extracto con 0.3 ml de solución de nitrato. Mediante SEM/EDS se confirma la presencia de plata en la muestra y debido al procedimiento de preparación, se observaron aglomerados de partículas. Con ayuda del TEM se observó que se forman nano-partículas esféricas con polidispersidad en un rango de 14 a 31 nm con un tamaño promedio de 22 nm. Finalmente, en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana contra *Clostridium sp*, mediante el método de Kirby-Bauer se observó la formación de un halo de inhibición de 1 cm de diámetro, la CMI fue de 0.457 µg/mL, y el valor obtenido de la CML fue de 3.38 µg/mL. Con estos resultados se demuestra una efectividad de las NPs Ag obtenidas para inhibir el crecimiento y eliminar a la bacteria *Clostridium sp*, logrando todos los objetivos planteados en el inicio de este trabajo.

1.2. INTRODUCCIÓN

Las nano-partículas (NPs) son usadas ampliamente en diversos campos de investigación y aplicaciones tecnológicas debido principalmente a sus propiedades bactericidas, potencial terapéutico y aplicaciones biomédicas [1]. También son usadas en diversos productos de uso tópico, en la industria textil, en el tratamiento de aguas, entre otros [2]. Por este motivo, la implementación de nuevos métodos de síntesis de NPs o su mejora, es un tópico de gran interés [3].

La síntesis de NPs Ag se puede llevar a cabo usando métodos físicos y químicos clásicos pero estos métodos son costosos, tóxicos y contaminantes. Recientemente las investigaciones se han enfocado en métodos alternativos que sean ecológicos y de bajo costo. Mas recientemente ha emergido la bio-síntesis para la cual se hace uso de sistemas biológicos entre los que se encuentran reductores como plantas, hongos, miel, bacterias y levaduras [2].

Las técnicas de síntesis biológicas además de ser compatibles con el medio ambiente presentan otras ventajas; como facilidad de escalamiento, no requiere grandes cantidades de presión y temperatura. Además, las especies químicas naturales tienen la capacidad de ser adsorbidas en la superficie de las nano-partículas durante el proceso de formación, lo que aumenta los efectos de superficie durante su aplicación [4].

Numerosos extractos de plantas como *Aloe vera* (sábila), *Azadirachta indica* (lila india), *Camellia Sinensis* (planta de té), *Carica papaya* (papaya), *Capsicum annum* (chile pimiento), *Coriandrum sativum* (cilantro), *Diopyros kaki* (caqui), *Emblica officianalis* (ambla), caucho natural, *Tamarindus indica* (tamarindo), *Hibiscus rosa sinensis* (rosa de china), *ocimum sanctum* (Tulsi), *Musa paradisiaca* (plátano), *Rosa rugosa* (rosa japonesa) and *Vinca rosea* (vinca de Madagascar) han sido probados con éxito para la formación de NPs Ag [5].

Eysenhardtia polystachya es una planta conocida comúnmente como “palo azul” pertenece a la familia *Leguminosae*. Esta planta es utilizada en la medicina tradicional en el tratamiento de urolitiasis y una gran variedad de enfermedades urinarias, para este propósito la madera

es hervida con agua, el resultado es un líquido de color dorado, con una fluorescencia azul y se administra de forma oral [6].

Clostridium sp. es una bacteria anaeróbica, gram positiva, esporulada y se encuentra en los intestinos de los seres humanos, en el suelo, en el agua y en los alimentos que no están bien cocinados, como la carne. La relevancia de inhibir el crecimiento de *Clostridium*, en productos alimenticios es debido a que alrededor de 30 especies han sido asociadas con infección humana [7, 8]. Las especies más importantes asociadas al consumo de alimentos contaminados son: *Clostridium botulinum* cuya toxina afecta al sistema nervioso, causando botulismo; y *Clostridium perfringens* cuya enterotoxina afecta al sistema digestivo [8], siendo *C. perfringens* la especie más frecuente. Puede causar gangrena gaseosa, enteritis necrótica e intoxicaciones alimentarias [7, 8].

1.3. NANO-MATERIALES

Durante las últimas décadas la ciencia ha dedicado especial atención a la fabricación y comportamiento de los materiales en escala nanométrica debido a que estos presentan propiedades únicas en comparación a las que presentan estos mismos materiales, pero en tamaño macroscópico. Es por esta razón que surgió la nano-tecnología, la cual se encarga principalmente, del diseño, la manipulación, caracterización, producción y aplicación de nano-estructuras, nano-dispositivos y nano-sistemas en escala de 1 a 100 nm [9]. Gracias a esta ciencia se ha podido obtener un mayor control sobre el tamaño, forma y organización de los nano-materiales, así como de su ensamblaje en arreglos ordenados [10].

Los nano-materiales se caracterizan por tener por lo menos una dimensión menor a los 100 nm y según el número de dimensiones de orden nanométrico se pueden clasificar en cuatro tipos básicos [10]:

1.- Materiales de dimensión cero:

Las tres dimensiones se ubican en el tamaño nanométrico. Aquí pertenecen las NPs < 100 nm, también conocidas como puntos cuánticos.

2.- De una dimensión:

Tienen una longitud variable, pero conservan una dimensión de escala nanométrica, como son los nano-alambres y nano-tubos.

3.- De dos dimensiones:

Materiales con áreas de tamaño indefinido, pero conservan su espesor < 100 nm, como en el caso de las películas delgadas.

4.- De tres dimensiones:

Los sólidos tridimensionales están formados por unidades nanométricas.

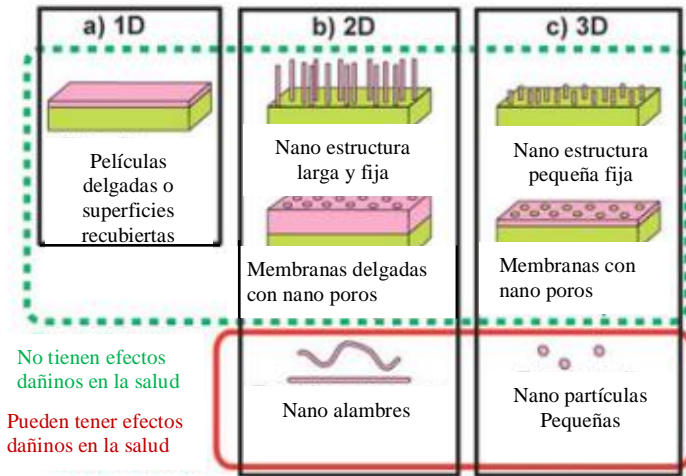
En el cuadro 1 se muestran las dimensiones típicas de los nano-materiales. Estos materiales prometen múltiples aplicaciones en diversas áreas, entre las cuales podemos destacar la medicina, biología, estudio de propiedades ópticas y magnéticas, entre otras; ofreciendo de esta manera soluciones innovadoras [10].

Cuadro 1. Tamaños y materiales de nano-estructuras [10].

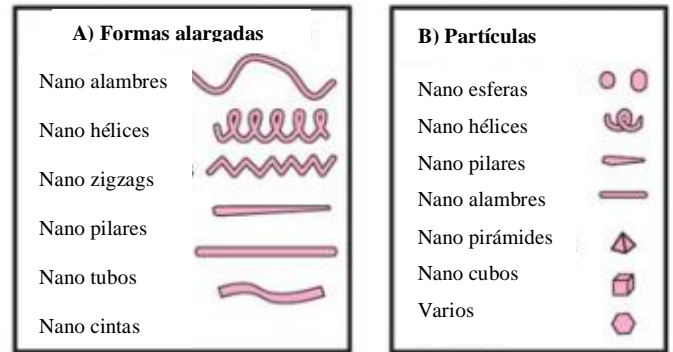
Nano-estructuras	Tamaño	Material
Clusters, NPs, puntos cuánticos.	Radio 1 – 10 nm.	Aislantes, semiconductores, metales, materiales magnéticos.
Otras NPs.	Radio 1 – 100 nm.	Cerámicos, óxidos.
Nano-bio-materiales.	Radio 5- 10 nm.	Membranas proteínicas
Nano-cables.	Diámetro 1- 100 nm.	Metales, semiconductores, óxidos, sulfuros, nitruros.
Nano-tubos.	Diámetro 1- 100 nm.	Carbono, BN, GaN.
Nano-bio-rodillos.	Diámetro 5 nm.	ADN
Arreglos bidimensionales de NPs.	Área varios nm^2 - μm^2	Metales, semiconductores, materiales magnéticos.
Superficies y películas delgadas.	Espesor de 1 – 100 nm.	Aislantes, metales, semiconductores, ADN.
Super redes tridimensionales de NPs.	Varios nm en tres dimensiones	Metales, semiconductores, materiales magnéticos.

La forma y composición química del material es de suma importancia para sus aplicaciones futuras. Por su composición se pueden clasificar en nano-materiales metálicos, semiconductores, óxidos metálicos y nano-compositos [11]. Sin embargo, por su forma, la clasificación es más compleja, ya que se basa en características tales como dimensionalidad, morfología, composición, uniformidad y aglomeración [12]. En la figura 1 se muestra la clasificación de los nano-materiales según dimensionalidad, morfología, composición, uniformidad y estado de aglomeración.

1) Dimensionalidad



2) Morfología



3) Composición



4) Uniformidad y estado de aglomeración

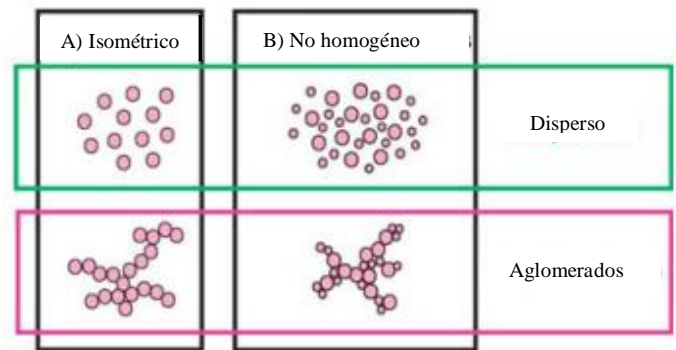


Figura1: Clasificación de los nanomateriales [12]

1.3.1. Nano-partículas (NPs)

Las NPs se definen como un nano-material que puede ser natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm [13]. El primer factor que causa las inmensas diferencias entre los nano-materiales y los mismos materiales pero en escala macroscópica, son los efectos de superficie (debido a la fracción de átomos en la superficie) y los efectos cuánticos (efectos de confinamiento cuántico debido a los electrones deslocalizados). Estos efectos alteran la reactividad química de los materiales, así como también las propiedades mecánicas, ópticas, eléctricas y magnéticas [12].

Como se mencionaba anteriormente, existen diferentes tipos de nano estructuras, las NPs corresponden a estructuras de dimensión cero y ofrecen una proporción elevada de área por volumen. El área de superficie está en función del incremento de masa de la partícula y esta área aumenta exponencialmente cuando la masa de la partícula disminuye permitiendo una mayor superficie de contacto [12].

Gracias a los avances en la ciencia de materiales a escala nanométrica, se han podido diseñar nuevos y un mayor tipo de NPs, así como explorar la diversidad de usos que poseen. Pueden ser elaboradas con una gran variedad de materiales, formas, tamaños, capas y superficies químicas [14]. Además, las NPs presentan un vasto número de posibilidades en su aplicación puesto que a este tamaño las partículas presentan propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas, catalíticas [12] y antimicrobianas [14].

1.3.2. Nano-partículas metálicas (NPsM) y resonancia del plasmón de superficie (SPR)

La preparación de NPsM ha cobrado recientemente gran interés debido a las particularidades de sus propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas y catalíticas que presentan. Muchas de estas propiedades y sus posibles aplicaciones son fuertemente influenciadas por el tamaño y la forma de las mismas: esferas, barras, discos, prismas, etc. Por lo tanto, en los últimos años se han desarrollado diversas técnicas de preparación de NPs con el objetivo de controlar las características morfológicas de estas [15].

Es relativamente sencillo encontrar ejemplos del uso de las NPsM (tal vez usos descubiertos no deliberadamente), por ejemplo, los pigmentos decorativos usados desde el tiempo de los romanos, en la copa de Lycurgus (IV d C.). Esta copa tiene la característica de cambiar su coloración dependiendo de la luz. Se observa de color verde con luz reflejada, mientras que con luz transmitida desde su interior se ve de color rojo. Esto se debe a que contiene NPs de alrededor de 70 nm de Ag y Au [16].

Unos de los aspectos más interesantes de las NPsM son sus propiedades ópticas que dependen fuertemente del tamaño y forma de la partícula. El oro en dimensiones macroscópicas tiene un brillo dorado, pero las películas delgadas de oro se ven de color azul con luz transmitida y cambia a naranja pasando por variados tonos de morado y rojo conforme el tamaño de partícula es reducido hasta los 3 nm. Este efecto es el resultado de los cambios en la resonancia del plasmón de superficie que es la frecuencia a la cual los electrones de la banda de conducción oscilan en respuesta de un campo electromagnético incidente. Solo los metales con electrones en la banda de conducción (como Au, Ag, Cu, y los metales alcalinos) poseen plasmón de resonancia en el espectro visible [16].

Cuando un gas está fuertemente ionizado, en estado de plasma, los portadores de carga libres pueden interactuar fácilmente con la radiación electromagnética de baja frecuencia oscilando en resonancia con ésta, produciéndose así un fenómeno vibratorio típico de los plasmas, conocido como plasmón. Debido a la naturaleza de los metales, el interior de estos (estructura macroscópica) se aproxima a un plasma sólido en el que los átomos pueden ser considerados como puntos masivos fijos con carga positiva neta, mientras un mar de electrones libres los rodea. Los plasmones dentro de la estructura macroscópica son ondas cuantizadas de una colección de electrones móviles que son producidas cuando una gran cantidad de estos son perturbados respecto de sus posiciones de equilibrio y vibran a una frecuencia característica dada [17].

Cuando la frecuencia de la radiación es menor que la frecuencia del plasmón, los electrones tienen tiempo de seguir perfectamente las oscilaciones del campo eléctrico oscilante de la radiación y la onda es reflejada totalmente. Cuando la frecuencia de la radiación es mayor que la del plasmón, las cargas son incapaces de seguir la oscilación del campo eléctrico y entonces la onda es transmitida. La radiación será absorbida solo cuando la oscilación del campo eléctrico de ésta iguale a la del plasmón que presenta el metal [17].

Los plasmones de superficie localizados son oscilaciones colectivas de electrones restringidos en pequeños volúmenes metálicos. Para que este fenómeno ocurra, la partícula tiene que ser mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente. El campo eléctrico

oscilante de la luz incidente induce un dipolo eléctrico en la partícula desplazando a una parte de los electrones móviles deslocalizados en una dirección, generando así una carga neta negativa y una positiva. En partículas pequeñas se produce un dipolo, pero en partículas grandes (a partir de 30 nm) se produce un cuadrupolo y en general multi-polos [17].

La longitud de onda a la cual aparece el SPR depende del tamaño, morfología, orientación espacial, y las constantes ópticas tanto de las partículas como del medio en el que se encuentran [18]. En la siguiente figura 2 se esquematiza la interacción del campo eléctrico de un haz de luz incidente sobre la superficie de una NP esférica y en la figura 3 se muestra el espectro de absorción de la SPR característico de NPs Ag de forma esférica a diversos tamaños, con sus respectivos cambios de coloración de la suspensión.

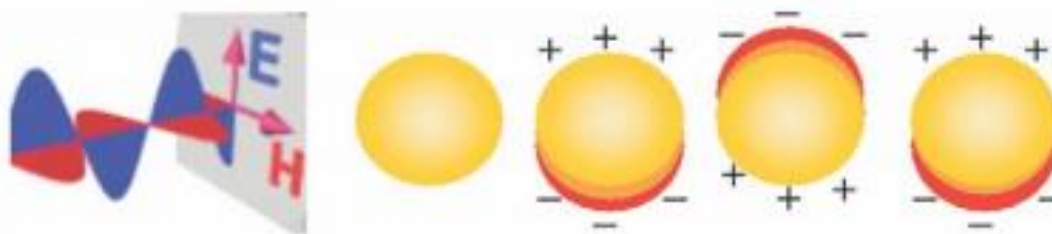


Figura 2: Interacción del campo eléctrico de la radiación electromagnética sobre la superficie de NPsM [16]

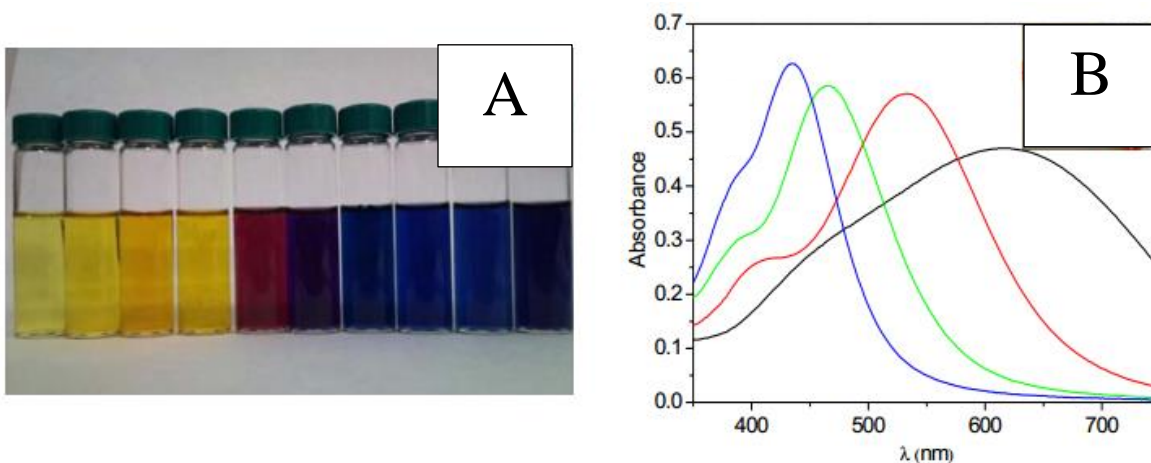


Figura 3: Absorbancia del SPR de NPs Ag esféricas [17]

A) Colores de las dispersiones de NPs Ag esféricas a diferentes tamaños, B) Bandas de absorción del SPR correspondientes a algunos de los tamaños de las dispersiones que se observan en A.

1.3.3. Métodos de obtención de NPs

La obtención de NPs se puede llevar a través de dos procesos básicos. El primero de ellos denominado “top-down”, en el cual se parte de un material macroscópico; hasta llegar a la NP. Este tipo de proceso involucra, por lo general un mecanismo físico o mecánico de molienda y posteriormente una estabilización de la partícula obtenida a través del uso de un agente protector coloidal. Diversos métodos físicos han sido utilizados para síntesis de NPs. Técnicas y métodos en aerosol, litografía, ablación láser y campos ultrasónicos han sido usados exitosamente para producir NPs [19]

El segundo proceso general, se conoce como “bottom-up” en el que se empieza por átomos hasta llegar a la NP. Dentro de estos procesos uno de los más importantes debido a sus ventajas ecológicas y económicas es el método químico por la bio-reducción de una sal metálica; en este caso también se emplean agentes estabilizantes como polímeros y surfactantes, los cuales controlan el crecimiento de la NP, además de prevenir la aglomeración de nano-clusters [20].

Además de esta clasificación general, los métodos de síntesis se pueden dividir en físicos, químicos y biológicos; de los cuales se obtienen nano-materiales con una amplia polidispersidad en cuanto a forma y tamaño, así como composición química [21]. Estas características determinarán las propiedades del nano-material para futuras aplicaciones.

Entre los métodos físicos se encuentran los métodos electroquímicos, ablación laser, termólisis, irradiación con microondas, y la síntesis sonoquímica. En la termólisis se lleva a cabo la descomposición de un sólido a altas temperaturas, mientras que en la ablación laser la formación de NPs es provocada por un láser de alta potencia que es dirigido a un blanco sólido sumergido en una solución con los precursores y estabilizantes. Para el método sonoquímico se ocupa radiación ultrasónica que provoca el efecto de la cavitación, elevando la temperatura y presión que finalmente forma las nano-estructuras, por otro lado, en la síntesis electroquímica una hoja metálica es disuelta anódicamente en un solvente aprótico.

Finalmente, la técnica de microondas por medio del calentamiento homogéneo permite la formación de núcleos de partículas metálicas [22].

Entre los métodos químicos probablemente el más usado es la reducción química en solución de una sal metálica. En sistemas acuosos, el agente reductor es adicionado o generado *in situ*, mientras que en sistemas no acuosos el solvente puede actuar también como reductor. Entre los agentes más usados se encuentran el boro hidruro de sodio, hidrazina y dimetil formamida. Otros métodos químicos son la reducción radiolítica y fotoquímica [22].

Los métodos biológicos o bio-síntesis, ocupan microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) o extractos de plantas para lograr la reducción de varios tipos de iones metálicos [22].

1.3.3.1. Bio-síntesis

La nano-biotecnología es un área interdisciplinaria de la nano-tecnología que proporciona las herramientas para el diseño y ensamblaje de nano-compuestos, así como métodos de síntesis que contribuyan con el medio ambiente [23]. Hay ventajas considerables cuando se trata de aplicaciones de los sistemas biológicos en síntesis de NPs en comparación con los métodos físicos y químicos clásicos, así se puede hablar de una metodología simple, la efectividad-costo, compatibilidad ecológica, facilidad de escalamiento para producción a gran escala sin requerimientos de grandes cantidades de presión, temperatura y energía [1, 3, 4].

La nano-biotecnología ha recibido mucha atención en la última década debido a las ventajas de desarrollar tecnologías favorables para el medio ambiente en tema de síntesis de diferentes materiales. Las fuentes naturales de reductores como plantas, hongos, miel, bacterias, levadura entre otros pueden ser usados para preparación de NPsM como Ag y Au [4, 23].

Un gran número de extractos de plantas como: albahaca india (*Ocimum sanctum*), sábila (*Aloe vera*), Ce Bai Ye (*Cacumen platycladi*) y pimienta larga (*Piper longum*), han demostrado su capacidad para producir NPs con una gran estabilidad debido a la presencia

de agentes reductores como alcaloides y flavonoides que son los mayores fito-constituyentes [24]. Estos métodos verdes son rápidos, eficientes y generalmente permiten la formación de NPs cristalinas con una variedad de tamaños. Esto depende de la naturaleza y concentración de los extractos de plantas, además, también depende del pH, temperatura de incubación y tiempo de la reacción de síntesis [25].

Hay un gran número de reportes en los que se describe la síntesis de NPs Ag mediante el uso de extractos de plantas medicinales como espinaca china (*Besella alba*), girasol (*Helianthus annuus*), Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), maíz (*Zea Mays*), extractos de hojas de té, fruta, espino negro (*Crataegus douglasii*) [1], Acacia (*Acacia leucophloea*) [23], eucalipto (*Eucalyptus oleosa*) [4], abrigo de José (*Alternanthera dentata*) [3], entre otros cientos de plantas. También han sido sintetizadas por extractos que exhiben propiedades antioxidantes y anticancerígenas como manzana del elefante (*Dillenia indica*), orégano (*Origanum vulgare*), mora india (*Morinda pubescens*), manzana de mayo himalaya (*Podophyllum hexandrum*), cálamo aromático (*Acorous calamus*) [1].

En estudios anteriores se ha encontrado una eficiencia de síntesis para NPs Ag con la técnica de bio-reducción superior al 94% a una temperatura de 25°C, además de obtenerse partículas esféricas de tamaño dentro del intervalo de 20 a 90 nm, siendo las menores concentraciones de los extractos las que producen partículas de menor tamaño [26].

En la técnica de bio-reducción, el tamaño de las NPs está ligado a la cinética de la formación y por lo tanto de la composición de la solución reactiva. La cinética determina el tamaño de partícula y el porcentaje de volumen-área superficial de las NPs resultantes, lo que, a su vez, condiciona la interacción con la membrana celular bacteriana [4]. Es importante tomar en cuenta la capacidad que tienen los componentes químicos de los extractos para adherirse a la superficie de las NPs durante el proceso de síntesis y de la sinergia que se desencadena en el momento de su aplicación, sobre todo si estos extractos tienen características antioxidantes, antimicrobianas y medicinales [4, 23].

1.3.3.1.1. Bio reductores

Los extractos acuosos de las plantas son comúnmente utilizados como bio-reductores, estos extractos están constituidos por sustancias tales como taninos, saponinas, azúcares reductores, y flavonoides [27]. Estas sustancias tienen algo en común, tienen capacidad reductora o antioxidante. Las moléculas antioxidantes son compuestos capaces de donar electrones [28], de esta forma favorecen la reducción de otras sustancias mientras estos se oxidan.

1.3.3.1.1.1. *Eysenhardtia polystachya*

Eysenhardtia polystachya es un arbusto nativo de México que pertenece a la familia *leguminosae*, comúnmente se conoce como palo azul o palo dulce, porque la infusión de la madera en agua tiene un sabor dulce y muestra un color oro con fluorescencia azul. Estudios fitoquímicos indican que *E. polystachya* contiene polifenoles y previas examinaciones químicas de esta especie han permitido la aislación y elucidación estructural de muchos flavonoides. *E. polystachya* es ampliamente usada en la medicina tradicional como depurativo de la sangre, para tratamiento de la tos seca irritativa, antiespasmódico, tratamiento para diabetes, tratamiento para fiebre, antiinflamatorio, antirreumático, y agente analgésico, también se ocupa en el tratamiento para enfermedades renales, como antidiurético y antimicrobiano [29].

No presenta muy baja toxicidad en ratones, un estudio en el que se administró dosis orales del extracto acuoso a 2, 4, 8 y 16 g/kg de peso, se llegó a la conclusión que la DL₅₀ es mayor a 16 g/kg en ratones [29]. Entre sus componentes se encuentran las antraquinonas, glucósidos, cumarinas, azúcares reductores, saponinas y taninos. Se aisló el compuesto 7-hidroxi-2,4,5-trimetoxiisoflavona como el principal constituyente fenólico fluorescente de la corteza [6, 29, 30], al igual que 7- hidroxi-4'-etoxiisoflavona [6]. También se han aislado diversos compuestos como la matlalina que también presenta fluorescencia y la coatlina responsable del color café de los extractos, [31]. Los extractos metanólicos tienen propiedades

hipoglicemicas y se han podido aislar compuestos como 3-O-acetil-11 α , 12 α -epoxy-oleanin-28, y algunas catequinas. Todas estas sustancias han mostrados propiedades antioxidantes en ensayos contra de DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo, compuesto que presenta un radical libre) [30].

1.3.4. Mecanismo general de formación de Nano partículas metálicas (NPsM) por reducción de sales

En las síntesis de NPsM basadas en la reducción en solución de una sal mediante un agente reductor. Las reacciones en general se llevan a cabo en presencia de un agente estabilizante, el cual tiene la función de recubrir la superficie de las NPs, controlando de esa manera el tamaño de las mismas y evitando su aglomeración [32]. El mecanismo de síntesis involucra los siguientes pasos: nucleación, crecimiento y estabilización [33].

La primera etapa de formación de las dispersiones coloidales metálicas es la nucleación, la cual comienza con la reducción de la sal metálica mediante un reductor adecuado con el objetivo de obtener átomos de metal con un estado de oxidación igual cero. Los átomos metálicos pueden colisionar con iones metálicos o aglomerados de átomos y formar un núcleo metálico denominado semilla [33].

La segunda etapa consta del crecimiento de estos núcleos, mediante la difusión y la transferencia de masa de los iones metálicos o átomos metálicos presentes en la solución hacia la superficie de dichos núcleos; siendo los factores más importantes el gradiente de concentración y la temperatura [34, 35]. Por último, la estabilidad de las dispersiones coloidales depende de la presencia de un agente estabilizante, el cual recubre la superficie de las NPs, evitando su aglomeración [36].

Dependiendo de la naturaleza química de las moléculas estabilizantes, la estabilidad de las dispersiones puede deberse a interacciones electrostáticas o a factores estéricos. La estabilización electrostática implica la repulsión culómbica entre partículas causada por la

doble capa eléctrica formada por los iones adsorbidos en la superficie de las NPs (por ejemplo, citrato de sodio). En el caso de la estabilización estérica, las moléculas orgánicas (polímeros, surfactantes) actúan como un escudo protector sobre la superficie de las NPs. Los factores cruciales que se deben considerar durante todo el proceso de la síntesis son la concentración del agente reductor y del estabilizante, la temperatura, el pH y la fuerza iónica, ya que éstos controlarán el tamaño y la forma de las NPs obtenidas [34].

1.4. PLATA (Ag)

La plata tiene como símbolo químico Ag, como número atómico 47 y como masa atómica 107.868 g/mol [37]. Su nombre proviene de una evolución del adjetivo "plattus", procedente del latín medieval, significando "ancho, aplanado" y posteriormente "lámina metálica". Se utilizó para nombrar los lingotes del metal que los romanos habían llamado "argentum" (el origen del símbolo Ag); "argentum" significa "blanco", "brillante". La plata pura es un metal brillante, resistente, dúctil y maleable, presenta un brillo blanco metálico susceptible al pulimiento. La plata es uno de los metales pesados y nobles; desde el punto de vista comercial, es un metal precioso [38].

La plata no ha sido identificada como un metal traza y al parecer no es esencial para la fisiología humana. De hecho, la exposición a la plata es considerada indeseable. La plata es bacteriostática y está incluida en un gran número de productos tales como gasas para heridas, refrigeradores, amalgamas, monedas, joyería, suplementos dietéticos, entre otros [37].

El consumo de plata en la dieta humana ha sido estudiado por diversos grupos encontrándose valores que van desde 0.4 $\mu\text{g}/\text{día}$ hasta 27 $\mu\text{g}/\text{día}$ [37], De cualquier forma, ya sea accidentalmente o deliberadamente, el envenenamiento por plata se manifiesta por argyria, una coloración azul o gris benigna y permanente de la piel que es causada por la deposición de la plata en la piel [37, 39]. En investigaciones de enjuagues bucales para dejar de fumar que contienen nitrato de plata como ingrediente activo, la DL_{50} fue de 280 mg de Ag/kg de

peso por día mediante administración oral en ratas; en conejos la DL₅₀ fue de 800 mg de Ag/kg de peso por día [37].

1.4.1. Nano-partículas de plata (NPs Ag)

Las NPs Ag es uno de los nano-materiales que más se han estudiado hoy en día. A pesar de que el término nano es relativamente reciente, algunos productos que contienen NPs Ag han estado entre nosotros alrededor de unos 100 años. Por ejemplo, las NPs Ag están presentes en diversos pigmentos, en la fotografía, en el tratamiento de heridas, compuestos antiestáticos/conductores, catalizador y como agentes bactericidas [40].

El primer reporte de NPs Ag data de 1889 estabilizada con citrato. Por otro lado, la estabilización de APs Ag utilizando proteínas fue reportada desde el año 1902. En las décadas siguientes, se reportaron otros métodos de preparación de NPs Ag. Por ejemplo, en 1953 Moudry reportó NPs Ag estabilizadas con gelatina [40].

Se ha demostrado que las NPs Ag tienen propiedades antiinflamatorias, contra radicales libres [41] y antitumorales [42, 43]. Sin embargo, estas cualidades no han sido extensamente estudiadas [44], además poseen características antivirales y bacteriostáticas [45]. En un estudio *in vitro* realizado por Mads Bred Georgsen en el 2007 [39], en el que se evalúa la toxicidad tanto de NPs como de los iones en células epiteliales pulmonares alveolares humanas A549, en el que se midió la citotoxicidad, la inflamación y el daño del ADN a las 3, 24 y 48 horas de exposición, se encontró que la plata no presenta toxicidad a concentraciones elevadas de hasta 10 mg / L. En otro estudio realizado por Maneewattanapinyo y colaboradores, 2011 [46], en el que se administró NPs Ag en cerdos de guinea, no se encontró toxicidad en concentraciones de hasta 5000 mg/Kg de peso/ por día.

El uso de las NPs Ag como antimicrobiano se ha extendido para evitar o minimizar el uso de agentes orgánicos tóxicos al ambiente. Además, permite incursionar en aplicaciones en las

que los agentes orgánicos no pueden, tales como en el plástico debido a las altas temperaturas necesarias para su procesamiento [40]. Las NPs Ag también tienen su aplicación en el sector alimentario, concretamente en agricultura y en el envasado de los alimentos. Dentro del campo de la agricultura, las NPs Ag se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de fitopatógenos. Estas NPs pueden aplicarse junto con un recubrimiento biodegradable en los frutos, mediante la inmersión de los mismos en la solución formadora de recubrimiento. Además, las NPs Ag también son empleadas en la fabricación de materiales en contacto con los alimentos, eliminando hasta en un 90% el crecimiento de microorganismos en los alimentos, siendo una alternativa a otros métodos de conservación que emplean la radiación, tratamiento térmico, almacenamiento a baja temperatura, o la introducción de aditivos antimicrobianos [13].

1.4.2. Efecto bactericida de las NPs Ag

La plata ha sido usada a lo largo de la historia debido a sus bien conocidas propiedades bactericidas [39] y las NPs Ag han demostrado tener propiedades similares [14]. La plata ha sido usada como un antimicrobiano de amplio espectro desde que fue aprobada por la FDA en la década de 1920, para su uso tópico [47], es usada actualmente como antimicrobiano en muchos productos, incluyendo vendajes, geles antibacteriales, y catéteres [14].

La plata impacta los sistemas microbianos a través de muchos mecanismos, que finalmente desembocan en la interrupción de las funciones celulares, interrumpe funciones de pared celular, síntesis de ácidos nucleicos, transporte, estructura proteínica, y en la bomba de iones de la membrana, sin estas funciones se inhibe la división u ocurre la muerte celular [14]. Aunque no se conocen muy bien los mecanismos por los cuales actúa la plata iónica, hay propuestas en las cuales los iones plata interactúan fuertemente con los grupos tiol de enzimas vitales y las inactivan. Evidencia experimental sugiere que el ADN pierde su habilidad de replicación una vez que la bacteria ha sido tratada con iones plata. Otros estudios han

mostrado evidencia de cambios estructurales en la membrana celular, como también la formación de gránulos de plata y sulfuro [48].

Aunque se ha planteado que las NPs Ag pueden actuar de una manera similar a la plata iónica, hay indicios de que el efecto bactericida que producen es distinto. En un estudio realizado por Morones y colaboradores (2005) [48], descubrieron que los iones plata producen una región de bajo peso molecular en el centro de la bacteria, como se muestra en la figura 4. Este efecto se debe a que el microorganismo agrupa y protege su ADN como mecanismo de defensa contra compuestos tóxicos. Por otro lado, al usar NPs Ag no se observa dicha región en la célula bacteriana. El efecto bactericida de las NPs Ag puede ser favorecido por la liberación de iones de plata una vez que estas están dentro de la célula [22].

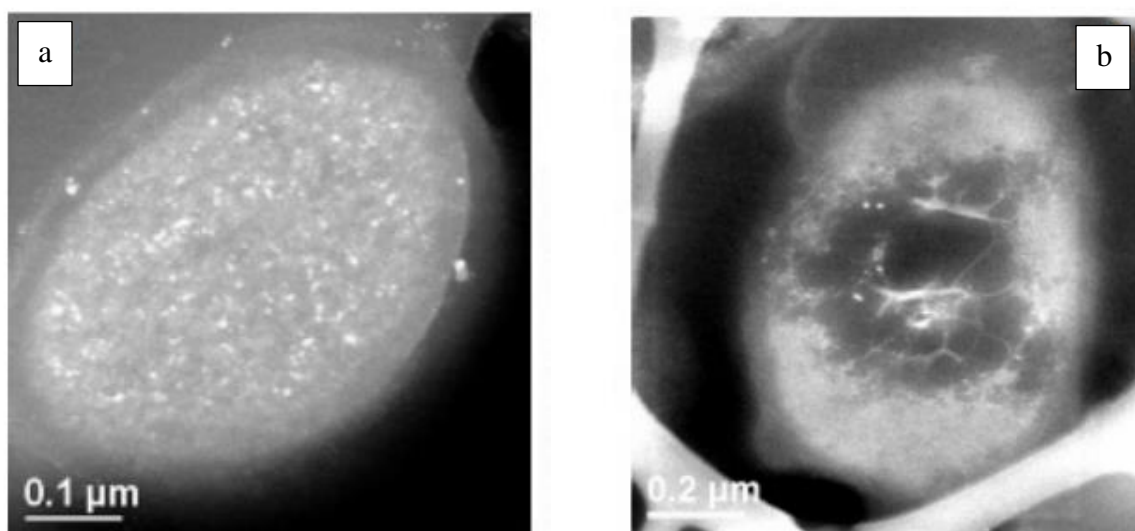


Figura 4: Comparación del efecto bactericida de NPs Ag contra iones de Ag^+ .

(a) imagen de una bacteria de *E. coli* que está en un medio con NPs Ag y (b) imagen de una bacteria de *E. coli* en presencia de una solución de nitrato de plata [48].

El tamaño y la superficie específica de las NPs están en estrecha relación, ya que conforme disminuye el tamaño de las NPs Ag la superficie específica aumenta dejando un mayor número de átomos expuestos en la superficie, que estarán disponibles para las reacciones redox, reacciones fotoquímicas y para interacciones físico-químicas con las células. Además, también puede haber liberación de iones plata (Ag^+), que son potencialmente tóxicos.

También el área superficial influye en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) [13].

La estabilidad de las NPs Ag también influye, las NPs tienen una tendencia natural a formar aglomerados o agregados. Los aglomerados son grupos de partículas unidas mediante fuerzas relativamente débiles de tipo Van der Waals, electroestáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse por medios mecánicos. Mientras que los agregados son grupos de partículas fuertemente asociadas cuya redispersión por medios mecánicos no resulta fácil. Estos dos fenómenos pueden cambiar el diámetro hidrodinámico de las NPs modificando la reactividad, ya que, al ser una estructura relativamente compacta, el área superficial es menor y por tanto la reactividad también será menor [13].

La solubilidad es otro parámetro importante. Cuando las NPs se disuelven pierden su estructura de NPs y las propiedades específicas de éstas. Existen estudios donde se han observado una correlación directa entre la carga superficial y la reactividad de las NPs Ag. Se ha observado que las NPs Ag estabilizadas con citrato con cargas superficiales negativas fueron menos reactivas que las NPs Ag con cargas superficiales positivas estabilizadas con polietilenimina ramificada [13].

La forma también influye en la reactividad de las NPs Ag. Se ha comprobado que las formas de triángulo truncado son más activas que las formas esféricas y alargadas, ya que contienen más caras, siendo las esféricas las que presentan menor reactividad [13]. La plata exhibe una elevada actividad antimicrobiana en contra de bacterias, hongos, protozoarios y ciertos virus. [23, 49, 50]. Esta combinación de potente actividad antimicrobiana y baja toxicidad hace de las NPs Ag potencialmente favorables como una alternativa a los antibióticos tradicionales en tratamientos para infecciones [14].

1.5. GÉNERO *CLOSTRIDIUM*

El género *Clostridium* consiste en una bacteria relativamente grande, gram-positiva, de morfología cilíndrica. Todas las especies forman endoesporas y tienen un metabolismo de tipo fermentativo [51].

La mayoría de las bacterias de *Clostridium* no crecen en condiciones aerobias y sus células vegetativas mueren al contacto con O₂, pero sus esporas pueden sobrevivir largos periodos de exposición al aire. El *Clostridium* es un tipo de organismo muy antiguo que vive en todos los ambientes anaeróbicos, tales como suelos, sedimentos acuáticos y los tractos intestinales de los animales. La mayoría de las bacterias de *Clostridium* son saprofitas, las de mayor relevancia en seres humanos principalmente son, *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *C. tetani* y *C. botulinum* [51]

1.5.1. *Clostridium difficile*.

El *C. difficile* causa diarrea y algunas otras enfermedades intestinales más serias, como colitis y colitis pseudomembranosa. En general, los seres humanos sanos no contraen fácilmente *C. difficile*, solo aquellos que se encuentran bajo un tratamiento prolongado de antibióticos, han sido operados del intestino o personas de la tercera edad están en riesgo de padecer una enfermedad producida por *C. difficile*. El *C. difficile* produce dos toxinas. La toxina A causa acumulación de fluidos en el intestino y la toxina B produce la muerte [51]

1.5.2. *Clostridium tetani*

El *C. tetani* es el agente que provoca tétanos. El organismo se encuentra en el suelo, en los tractos intestinales y en las heces de varios animales. El ser humano es portador de la bacteria y la tasa varía desde 0-25% de población de bacterias presente en la flora intestinal. El tétanos es una enfermedad altamente fatal en seres humanos. La tasa de mortalidad se reporta entre el 40 y 78%. La enfermedad se origina de una potente neurotoxina que se produce cuando las esporas de la bacteria germinan y las células vegetativas comienzan a crecer y cuando

estas se encuentran cerca de heridas abiertas en los humanos. El organismo se multiplica localmente, pero los síntomas aparecen en lugares remotos al sitio de infección. Los síntomas típicos del tétanos son los espasmos musculares y la rigidez. La muerte es producida por la falla de los músculos que controlan la respiración [51].

1.5.3. *Clostridium botulinum*.

Es una bacteria Gram positiva, anaeróbica, móvil y sin capsula que forma esporas y neurotoxinas que son zinc endopeptidasas (para su funcionamiento dependen de zinc) [52] estas toxinas actúan sobre los componentes proteicos de la membrana presináptica y la bloquean [53], causa cuatro tipos de botulismo: alimenticio, infantil, botulismo en heridas y botulismo ignorado. El botulismo es una enfermedad letal causada por la ingestión de una neurotoxina potente que se produce durante el crecimiento de *C. botulinum*. Esta toxina es una de las sustancias más tóxicas conocidas, aun en cantidades nanogramáticas (1 ng/ kg de peso en ratones) [54] puede causar enfermedad o muerte. El botulismo está ligado a comida que ha sido empacada al vacío, que no ha sido adecuadamente refrigerada, comida salada y empacada en aluminio, miel (la causa primordial de botulismo en niños), pescado salado o fermentado tradicionalmente [55].

Las esporas de *C. Botulinum* se encuentran normalmente en la superficie de frutas y vegetales y en los productos marinos, generalmente no son peligrosas, pues la toxina solo se produce durante el crecimiento de la bacteria. Las mejores condiciones de crecimiento de esta bacteria son a bajas concentraciones de oxígeno, pH mayor a 4.6, en alimentos ácidos no es muy probable su crecimiento, tampoco sobrevive a cocimientos con presiones elevadas [55].

1.5.4. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens es una bacteria anaeróbica Gram positiva, inmóvil de gran plasticidad ecológica. la carencia de flagelos y la esporulación poco frecuente lo diferencian de otros tipos de especie. Es responsable de enfermedades alimentarias tóxicas, enteritis

necrosante, celulitis e infecciones inespecíficas [56]. Además, es una de las causas más comunes de intoxicación alimentaria en los Estados Unidos de América, mientras que el tipo A de *C. perfringens* es el principal responsable de intoxicación alimentaria a nivel mundial.

La cocción mata las células de *C. perfringens* que se están cultivando, pero no elimina a las esporas que se pueden convertir en células nuevas. Si los alimentos cocidos no se sirven o se refrigeran de inmediato, las esporas pueden crecer y producir células nuevas. Estas bacterias proliferan entre los 4-60 °C, por lo que crecen rápidamente a temperatura ambiente pero no pueden crecer en temperaturas usualmente presentes en los refrigeradores o congeladores [57].

Las infecciones de *C. perfringens* usualmente ocurren cuando los alimentos se preparan en grandes cantidades y se mantienen calientes durante un largo periodo de tiempo antes de ser consumidos. Estas bacterias pueden presentarse en carne de res, de aves y en los jugos de las carnes. [56]. Al menos 8 de las toxinas producidas por este microorganismo son consideradas letales. Existen varios tipos de *Clostridium perfringens* consideradas como toxigénicas y se enlistan A, B, C, D y E. Los tipos A y C, son los que tienen capacidad de producir una enfermedad infecciosa en seres humanos. El tipo A es responsable de la mayor cantidad de cuadros clínicos en seres humanos mientras que el tipo C produce ocasionalmente enteritis necrosante [56].

La enterotoxina es producida por distintas cepas de tipo A y rara vez por tipos C y D. La enterotoxina es una proteína de bajo peso molecular y sensible a pH extremos. El calentamiento en solución salina a 60 °C durante 5 min disminuye su actividad biológica. El cuadro clínico de toxi-infección alimentaria se produce por ingestión de un gran número de bacterias productoras de la enterotoxina (más de 10⁸ células vegetativas). Su periodo de gestación es de 8 a 24 horas y produce en humanos diarreas y calambres abdominales sin presentarse fiebre ni vomito. El cuadro clínico de la enteritis necrosante es infrecuente pero grave. Se trata de una inflamación aguda del intestino delgado con necrosis y gangrena en diversas secciones del mismo. La enfermedad puede contraerse por contaminación que puede

ser adquirida en cualquier paso del eslabón de la cadena alimenticia, obtención, procesado culinario, conservación y recalentamiento [56].

La prevención de la toxi-infección por *C. prefringens* es complicada ya que se trata de un microorganismo ubicuo. Las carnes rojas y de aves actúan como reservorios (tracto intestinal). El *C. prefringens* es la especie que se aísla con mayor frecuencia del hombre como microbiota normal, actuando también el hombre como reservorio. Es por esto por lo que es recomendado inhibir la multiplicación del organismo en el alimento, y si está presente en gran cantidad, disminuirlo hasta niveles seguros. Como se mencionó anteriormente, las esporas resisten el calentamiento de los alimentos y pueden germinar durante el enfriamiento. Es conveniente no conservar los alimentos ya cocinados a temperatura ambiente. El lento enfriamiento, desde los 50-25°C es peligroso puesto que a estas temperaturas se puede desarrollar un gran número de células vegetativas productoras de la enterotoxina [56]

CAPITULO 2

2.1.JUSTIFICACIÓN

Las NPs Ag destacan de entre las NPsM por sus características bactericidas, estas inhiben la división celular e interrumpen funciones esenciales provocando la muerte bacteriana. Por ejemplo, se ha demostrado que al emplearlas en la fabricación de materiales en contacto con los alimentos eliminan hasta en un 90% el crecimiento de microorganismos. Existen innumerables métodos de síntesis de NPsM tomando auge la bio-reducción debido a las ventajas que presenta en comparación con los métodos físicos y químicos clásicos, como ejemplo el bajo costo, además de ser amigable con el medio ambiente. Dentro de los métodos de bio-reducción es sobresaliente el uso de plantas medicinales y extractos de las mismas, tal es el caso de *Eysenhardtia polystachya*, que es un arbusto nativo de México que se ocupa en la medicina tradicional. Por otro lado, el género *Clostridium* está compuesto por bacterias anaeróbicas, gram positivas, esporuladas. La relevancia de inhibir el crecimiento de *Clostridium*, en la industria alimenticia es debido a que alrededor de 30 especies han sido asociadas con infección humana. Las especies más importantes asociadas al consumo de alimentos contaminados son: *Clostridium botulinum* cuya toxina afecta al sistema nervioso, causando botulismo; y *Clostridium perfringens* cuya enterotoxina afecta al sistema digestivo, siendo *C. perfringens* la especie más frecuente. Puede causar gangrena gaseosa, enteritis necrótica e intoxicaciones alimentarias. EL uso de las AgNPs como antimicrobiano se ha extendido para evitar o minimizar el uso de agentes orgánicos tóxicos al ambiente o para la salud humana, y son un excelente candidato en la industria alimentaria para evitar la contaminación por *Clostridium sp.* Debido a la importancia que tiene el impedir la contaminación de los alimentos por *Clostridium sp.*, evitando el uso de agentes bacteriostáticos tóxicos para el ser humano y dañinos al medio ambiente, es de vital importancia encontrar agentes antibacterianos y métodos de síntesis que reúnan estos requisitos. En el presente trabajo se estudiará la estabilidad y características de las NPs Ag obtenidas por medio del método de bio-reducción con extractos de *E. polystachya*, así como la capacidad de inhibición de crecimiento y letalidad que tienen sobre la bacteria *Clostridium sp.*

2.2.HIPÓTESIS

Mediante el uso de NPsAg bio-sintetizadas con extractos acuoso de *Eysenhardtia polystachya*, se inhibirá el crecimiento de *Clostridium sp.*

2.3.OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y caracterizar NPsAg menores a 70 nm obtenidas mediante bio-reduccción con *Eysenhardtia polystachya* y determinar las propiedades inhibitorias contra *Clostridium sp.*

2.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Contar con extractos de *E. polystachya* que muestren propiedades reductoras.
- Sintetizar NPs Ag menores o iguales a 70 mn por bio-reduccción con el extracto acuoso de *E. polystachya*.
- Obtener la cinética de la síntesis de NPs Ag por medio de espectroscopia UV-Vis
- Caracterizar las NPs en cuanto a su forma, tamaño por medio de TEM.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y letal contra *Clostridium sp.* por el método de dilución en caldo y sembrado en placa.

CAPITULO 3: MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

3.1.MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE NPsM

Un gran número de métodos físicos son utilizados para estudiar la estructura de los sólidos, algunas técnicas sirven para estudiar el ambiente químico de un solo átomo mientras que otras sirven para conocer el orden y estructura a largo alcance [58]. En el presente Capítulo se describirán los fundamentos de las técnicas fisicoquímicas utilizadas para caracterizar y estudiar las propiedades de las NPs Ag sintetizadas en este trabajo, así como los parámetros utilizados en cada una de estas técnicas.

3.1.1. Espectroscopia UV-Vis

Un espectrómetro es un instrumento que proporciona información relacionada con la intensidad de radiación en función de la longitud de onda o de la frecuencia. Un espectrofotómetro es un espectrómetro equipado con una o más rendijas de salida y transductores fotoeléctricos que facilitan la determinación de la relación entre la potencia radiante de dos haces en función de la longitud de onda [59].

El principio de la espectroscopía de UV-Vis involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado. Esta técnica se basa en la medición de la transmitancia T o de la absorbancia A de soluciones que están en celdas transparentes que tienen una longitud de trayectoria de b en cm, en un rango de longitud de onda entre 190 y 800 nm. Cuando una radiación de cierta λ incide sobre una muestra se produce la absorción parcial de la misma, produciendo una transición en los niveles energéticos de la especie (ya sea un átomo, una molécula, una partícula o un ión) y pasando ésta a un estado excitado [59].

3.1.2. Microscopía de transmisión

La microscopía electrónica es utilizada para caracterizar la morfología, estructura de los sólidos, tamaño cristalino, examinar defectos y determinar la distribución de elementos [58]. En un microscopio electrónico de transmisión (TEM) se produce un haz de electrones a partir del calentamiento de un filamento de tungsteno, que es acelerado en alto vacío y enfocado por campos magnéticos sobre una muestra [33, 58], al impactar genera señales directamente relacionadas con la estructura y morfología de la muestra observada, la longitud de onda de los electrones al ser tan pequeña permite una resolución por debajo de 0.1 nm [58].

El proceso de formación de una imagen de TEM involucra electrones que se transmiten a través de la muestra sobre la que hizo incidir un haz de electrones coherentes. De acuerdo a la interacción que se produzca entre el haz de electrones y la muestra al atravesar ésta, los electrones se pueden clasificar en electrones no desviados, electrones desviados elásticamente y electrones inelásticos [33]. El haz que atraviesa directamente la muestra es detectado formando una proyección bidimensional de ésta (imagen de campo claro), o también se puede detectar el haz difractado (imagen de campo oscuro) [58].

Los electrones acelerados por una diferencia de potencial mayor a 10^6 V [58], atraviesan la muestra, se dispersan al pasar a través de ella y se enfocan con un lente objetivo, para luego amplificarse en un lente y construir una imagen del objeto. Las muestras a observar por esta técnica deben poseer espesores menores a 200 nm. El TEM presenta dos ventajas con respecto a otras microscopías: primero, la magnificación y poder de resolución que tiene y segundo, posee la capacidad de proporcionar una imagen e información acerca del patrón de difracción de la muestra en una misma medida [60].

3.1.3. Espectroscopia de Dispersión de energía (EDS)

Un haz de electrones incidente en una muestra, además de producir la dispersión de estos, provoca la emisión de rayos X característicos de la muestra. Cada señal obtenida después de la absorción y otros efectos sobre la muestra es separada por un detector de Li-Si, amplificada y corregida para dar un análisis cualitativo y cuantitativo de los elementos presentes (solo elementos con número atómico mayor a 11) [58].

3.2. TÉCNICAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se realiza mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. El antibiograma define la actividad in vitro de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana [61].

Estas pruebas pueden clasificarse en métodos cuantitativos y cualitativos, los métodos cuantitativos son aquellos procedimientos que permiten determinar la CMI y la CML. Se define CMI como la mínima concentración de antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes). Se define como CML la mínima concentración de un antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada. La determinación de la CMI puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o E-test (marca comercial) [62].

Métodos cualitativos (disco difusión) son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente. Este es uno de los métodos más utilizados en la práctica diaria [62].

3.2.1. Método de Kirby-Bauer.

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácil y rápido, que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. El antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el NCCLS (National committee for clinical laboratory standards) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos [62].

El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano [62].

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez que corresponde a un 0,5 del nefelómetro de Mc Farland. La densidad se corrobora con un espectrofotómetro. Luego de preparado el patrón de turbidez se distribuye en tubos de ensayo (4 a 6 ml por cada tubo). Estos deben ser guardados a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Esta turbidez corresponde a 1.5×10^8 UFC/ml [62].

- Método del medio de cultivo líquido o de Kirby-Bauer: con un asa bacteriológica se tocan cuatro o cinco colonias bien aisladas del mismo tipo morfológico y se inocula en 4 a 5 ml de caldo apropiado, como caldo MH. Los cultivos de caldo se dejan incubar a 35°C

hasta que aparece una turbidez ligeramente visible (generalmente 2 a 5 h). La turbidez se ajusta con suero fisiológico estéril o caldo para obtener una turbidez visualmente comparable a la de un estándar preparado previamente (llamado 0.5 de Mc Farland). Este estándar debe agitarse antes de usar y ser comparado en forma visual con el inóculo preparado. Para ello se miran ambos tubos al mismo tiempo contra un fondo blanco con una línea negra como contraste. Este método es recomendado cuando el cultivo tiene más de 24 h de incubación [62].

- Método de suspensión directa de colonias o Kirby-Bauer modificado: se colocan entre 4 y 5 ml de suero fisiológico estéril en un tubo de ensayo. Se toma con un asa bacteriológica tres o cuatro colonias morfológicamente similares y se suspenden en el tubo hasta alcanzar una turbidez comparable a la solución de Mc Farland 0.5 [62].

Luego de preparado el inóculo bacteriano con la cepa en estudio se deben seguir los siguientes pasos: [62].

- 1.- Introducir el hisopo estéril en el inóculo bacteriano preparado, de manera de embeberlo completamente. Antes de retirarlo se debe escurrir sobre las paredes del tubo para retirar el exceso de líquido del mismo.
- 2.- Sembrar la placa de MH de manera de obtener un crecimiento confluyente, para lo cual se estría con el hisopo en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repite el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más. Deben extremarse los cuidados en sembrar las placas de borde a borde.
- 3.- Dejar secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.
- 4.- Colocar los discos. Estos deben ser colocados con dispensador o pinza estéril. Luego de estar sobre el agar se debe presionar los discos levemente para que queden adheridos al mismo. Deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben ser distribuidos de manera de que no haya superposición de los halos de inhibición. En las placas de 150 mm no se colocarán más de 12 discos, y en las placas de 100 mm no es aconsejable colocar más de 6.
- 5.- Luego de colocados los discos las placas deben incubarse a 35°C a 37°C en grupos no mayores a cinco placas durante 18 h. Para detectar la meticilinorresistencia las placas deben incubarse 24 h completas. Las placas deben colocarse en forma invertida para que el agua condensada no caiga sobre el agar, lo que cambiaría las condiciones del medio y por lo tanto no serviría para la lectura de los halos.

3.2.2. Concentración Mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de un agente antimicrobiano es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Determinamos la concentración en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano. Las pruebas de la CMI pueden ser realizadas usando como medios de cultivo en caldo o agar, pero la micro-dilución en caldo es el método más utilizado en los laboratorios clínicos [63].

La prueba de micro-dilución en caldo de CMI se realiza en una placa de poli-estireno que contiene aproximadamente 96 celdillas. Una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes antimicrobianos. Una celdilla sirve como control positivo (caldo más inóculo), y otro sirve como control negativo (sólo caldo). La mayoría de los sistemas tienen un volumen de 0.1 mL en cada celdilla. El caldo MH se recomienda como el medio preferido para pruebas de susceptibilidad de organismos comúnmente aislados, aeróbicos o facultativos de rápido crecimiento [63].

Para preparar las placas de micro dilución, se hacen diluciones intermedias (al doble de la dilución final) de los agentes antimicrobianos en caldo o agua estéril. El método más conveniente para obtener las diluciones consiste en prepararlas en un volumen de por lo menos 10 mL y colocar 0.1 (+ /- 0.02) mL en cada uno de los 96 pocillos mediante un dispositivo mecánico (pipeta automática mono o multicanal) [64].

Si el inóculo se agrega con pipeta, la solución de antibiótico se debe preparar de una concentración tal, que duplique la deseada y los pocillos deben ser cargados con 0.05 mL en vez de 0.1 mL. Cada poli-cubeta debe incluir un pocillo de control de crecimiento (sin antibiótico), y un control negativo (caldo sin inocular) [64].

Se prepara el inóculo estandarizado usando una suspensión directa de colonias o por el método de crecimiento. La inoculación con la suspensión estandarizada debe hacerse dentro

de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación. La dilución para obtener un inóculo final de 5×10^5 UFC/mL puede variar dependiendo del método de inoculación utilizado y del microorganismo en estudio, por lo tanto, se debe calcular para cada situación. Para realizar este cálculo se debe decidir el volumen exacto en el cual se va a realizar la inoculación. Por ejemplo, si el volumen final en cada pocillo es de 0.1 mL y el volumen de inóculo a agregar es de 0.1 mL, se debe diluir 1/20 la suspensión bacteriana equivalente al patrón 0.5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL), para obtener 5×10^5 UFC/mL (o 5×10^4 UFC/pocillo de micro-dilución) [64].

El inóculo se debe agregar dentro de los 15 minutos posteriores a su ajuste. Cada pocillo se inocula utilizando algún dispositivo, por ejemplo, pipeta automática mono o multicanal. El volumen de suspensión bacteriana agregado no debe exceder el 10 % del volumen total del pocillo (por Ej. $< 10 \mu\text{L}$ de inóculo en 0.1 mL de la solución de antibiótico). Si el volumen de inóculo agregado a cada pocillo es de 0,05 mL, se obtiene como resultado una dilución al medio de la solución de antibiótico y del inóculo como sucede en el método de macro-dilución (cada pocillo contiene 0,05 mL de las diluciones del antibiótico). Esto se debe tener en cuenta al preparar tanto el inóculo como el rango de diluciones; en ambos casos las concentraciones deberán duplicar la final deseada [64].

3.2.3. Concentración mínima letal (CML)

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar) [61].

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la CML de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado;

posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Si se realiza un sub-cultivo en medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente puede determinarse también la actividad bactericida [61]. A continuación, se presenta la figura 5 donde se esquematiza la obtención de la CML.

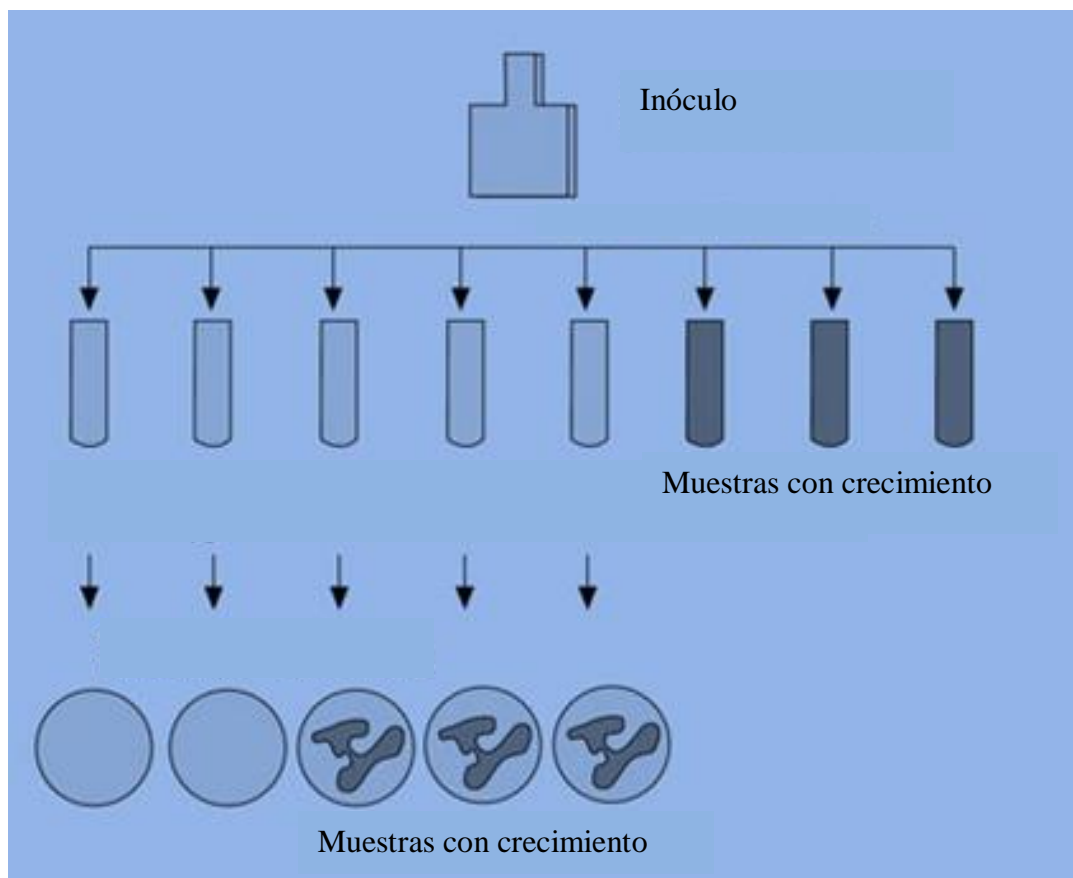


Figura 5: Esquema de las diluciones para sembrado en placa para obtener CML o CMB [65]

CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.MATERIALES

La síntesis de las NPs Ag se realizó utilizando una disolución de AgNO_3 (Sigma Aldrich, México). En cuanto al bio-reductor, éste se obtuvo mediante extractos de los trozos de tronco de *Eysenhardtia polystachya* (palo azul), la planta se adquirió del jardín botánico universitario de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, el certificado de taxonomía se muestra en el anexo 1.

Para realizar los ensayos de sensibilidad antimicrobiana se usó una cepa de *Clostridium sp*, ésta fue donada por el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, los análisis de identificación realizados en este trabajo para esta cepa se muestran en el anexo 2. Como medio de cultivo inicial para viabilizar la cepa, se utilizó medio SPS Angelotti (MERK), selectivo para *Clostridium perfringens*. Posteriormente, para realizar los ensayos de halo inhibitorio y dilución en caldo éstos se llevaron a cabo en agar Mueller Hinton (BD. Bioxon) y caldo Mueller Hinton (BD. Bioxon) respectivamente, la atmosfera anaerobia fue proporcionada mediante jarras de anaerobiosis con sobres BD GaspakTM. Para tener cepa viable para todos los ensayos se realizó un stock de la cepa en tioglicolato (BD Bioxon). Para comparar la efectividad de las NPsAg contra antimicrobianos comerciales se utilizó metronidazol (solución inyectable 5 mg/ml) y como referencia de antimicrobiano específico contra *Clostridium sp*. en alimentos se usó NaNO_2 (Productos cárnicos Monterrey, S.A.).

La experimentación se llevó a cabo en el laboratorio de Nanomateriales del Centro Conjunto de Investigaciones en Química Sustentable (CCIQS) y en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

4.2.OBTENCIÓN DEL AGENTE REDUCTOR

El agente reductor se obtuvo a partir de los trozos de tronco de *E. polystachya*, éstos se redujeron a astillas manualmente con ayuda de un machete, después las astillas se muelen en un molino de martillos fijos dentados Pulvex 200, Maquinaria para moliendas y mezclas S.A. de C.V. México. Con los polvos obtenidos se realizó una extracción a una concentración de 1g en 100 ml de agua, se lleva a ebullición durante 5 min y finalmente se realiza una dilución del extracto de 1:40.

4.3.SÍNTESIS DE NPs Ag

Para obtener las NPs Ag se realizaron 10 pruebas en las cuales se mezcla el extracto diluido a 1:40 de *E. polystachya* con diferentes volúmenes del precursor de las NPs Ag, que es una disolución de AgNO₃ a una concentración de 0.01 M, esto se hizo así para poder encontrar la relación adecuada de los volúmenes tanto del precursor como del agente reductor. Una vez que se mezclan perfectamente con ayuda de un vortex, se lleva a cabo la formación de las NPs Ag dejando reposar la mezcla. Las relaciones de los volúmenes usados tanto del agente reductor como del precursor se muestran a continuación en el cuadro 2.

Cuadro 2. Relación de volúmenes de los reactivos para la obtención de NPs Ag

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extracto (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Sol. AgNO ₃ (mL)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0

4.4.CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis.

Las propiedades ópticas de las NPs Ag formadas se observaron con ayuda de un espectrofotómetro Cary 300 UV-Vis (Agilent technologies USA). Las mediciones se realizaron en un rango de 230–700 nm con intervalos de medición de 1nm, en una cubeta de

cuarzo con paso óptico igual a 1cm. Las muestras se midieron por espacio de cinco minutos durante la primera hora de reacción, después se midieron cada hora durante las siguientes 6 horas, después a las 24 y a las 48 h, con el fin de observar el la evolución y el término de la reacción. Para monitorear la estabilidad también se realizaron mediciones a las 504 h (21 días) y 720 h (30 días).

4.5.CARACTERIZACIÓN POR SEM/EDS

Con el propósito de asegurar que las NPs formadas estén compuestas por Ag, se llevó a cabo un análisis SEM/EDS. Tres gotas de la muestra se colocaron en un porta muestras recubierto con cinta carbono y se dejaron evaporar a temperatura ambiente durante un día. Para realizar este análisis se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-6510LV (Japón), de emisión termoiónica. El análisis se obtuvo utilizando una potencia de 30 V con el detector de electrones secundarios. El análisis elemental se desarrolló seleccionando áreas específicas en la superficie de la muestra.

4.6.CARACTERIZACIÓN POR TEM

Para preparar la muestra se utilizaron rejillas de cobre TED PELLA, INC., cubiertas con formvar, con tamaño de malla 200 mesh. Se colocó una gota de la suspensión de NPs sobre la rejilla y se dejó evaporar el agua a temperatura ambiente durante un día. Para realizar las observaciones se trabajó con un microscopio JEOL-2100 de 200 kV (Japón) con filamento de LaB6. Con una resolución de 0.23 nm punto a punto y 0.14 nm línea a línea.

Para realizar el conteo y generar los histogramas de distribución de tamaño de partícula, se seleccionaron las micrografías que mostraban el mayor número de partículas. Ahí se midieron tomando en consideración el eje de mayor tamaño en cada partícula. El conteo de las partículas se realizó con el apoyo del programa “ImageJ”.

4.7. TÉCNICAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

4.7.1. Método de Kirby-Bauer

Preparación del inóculo.

Para preparar el inóculo se siguió el método de suspensión directa de colonias o Kirby-Bauer modificado [62]. Se utilizaron cepas de *clostridium sp.* sembradas en placa con medio MH con 15 días de antigüedad, de estas placas se tomaron de una a dos colonias y se dispersaron con ayuda de un vortex en solución salina al 0.85 %. Las colonias fueron mezcladas el tiempo suficiente hasta que no se observaron grumos y la suspensión luciera homogénea, después se igualó la turbidez del inóculo a una solución al 0.5 en la escala de Mc Farland. La comparación se realizó a simple vista sobre una pantalla con líneas blancas y negras.

Preparación de los sensidiscos.

Se utilizó la dispersión de NPs Ag de la muestra que tuviera las características óptimas de síntesis y se ocuparon discos estériles de papel filtro Whatman del número 42 de 6 mm de diámetro. Estos discos fueron sumergidos en la suspensión de NPs Ag y llevados a sonicación por 5 minutos, después fueron colocados sobre la placa de agar inoculado.

Se prepararon discos impregnados de una solución estéril de NaNO_2 con una concentración de 200 ppm, tomando como referencia de esta concentración el límite establecido por la FDA para la adición de nitritos en carnes para el consumo humano [66]. Para esto se depositaron los discos estériles en la solución NaNO_2 también estéril y se dejaron reposar por una hora, al término de ésta fueron colocados sobre la placa de agar inoculada.

También se prepararon discos de metronidazol a una concentración de 5 mg/mL [67]. Se depositaron los discos estériles en la solución inyectable de metronidazol y se dejaron reposar por una hora, al término de esta, los discos fueron colocados en la placa de agar inoculado.

Finalmente se prepararon discos con el extracto de *E. polystachya* sin diluir. Se depositaron los discos estériles en el extracto recién preparado y estéril, y se dejaron reposar por espacio de una hora, al término de la cual fueron depositados sobre la placa de agar inoculada.

Sembrado en placa.

Se prepararon 9 cajas Petri con 25 ml de agar MH, sobre cada una se inoculó por estriado con ayuda de un hisopo estéril, se sumergió el hisopo en la suspensión del microorganismo preparada del modo ya antes descrito, y se descargó por estriado sobre la placa procurando que no quedara espacio entre cada línea, después la caja se giró 90° grados y se volvió a estriar, y finalmente se rotó una vez más y se volvió a estriar. En la figura 6 se esquematiza el procedimiento de estriado. Se dejó evaporar la superficie y una vez que se secó, se colocaron los discos con ayuda de unas pinzas estériles, se hicieron tres repeticiones de cada disco y se incubaron a 37 °C por 120 h o cinco días en una jarra de anaerobiosis.

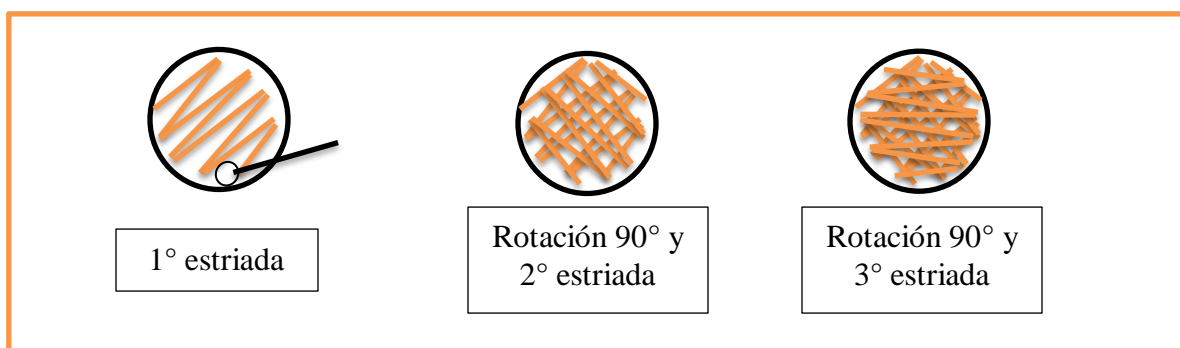


Figura 6: Método de inoculación de las placas de agar MH para la prueba de halos de inhibición

4.7.2. Micro-dilución en caldo.

Preparación del inóculo.

El inóculo se preparó con el método descrito por el CLSI [64], se tomaron de una a dos colonias de un cultivo de 6 días y se suspendieron en solución salina al 0.85 %. Se igualó la turbidez de la suspensión a un patrón con turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland con ayuda de un fondo con rayas blancas y negras, la comparación se realizó a simple vista. Una

vez que se consideró que la suspensión tenía la turbidez deseada, se tomó 1 ml de la suspensión y se diluyó en 19 ml de solución salina para llegar a una concentración de 1×10^6 UFC (unidades formadoras de colonias) /mL. De esta solución se toman 10 μ L y se depositaron en cada pocillo de la micro-placa los cuales contenían 200 μ L como volumen final para alcanzar la concentración deseada que debe ser de 5×10^4 UFC/mL.

Preparación de las diluciones de NPs Ag.

Se prepararon 10 diluciones en 10 tubos de ensayo con las NPs Ag de la muestra que presento las características óptimas de síntesis, las diluciones se realizaron en caldo MH, para obtener concentraciones que van desde 0.427 μ g/mL hasta 30.5 μ g/mL de Ag, en el anexo 3 se muestran los cálculos para la obtención de la concentración de la muestra de NPs Ag y en base a este cálculo se obtuvieron las concentraciones para las diluciones de NPs Ag de este ensayo. Los volúmenes que se ocuparon tanto de caldo MH como de la dispersión de NPs Ag se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3: Diluciones de NPs Ag para prueba de micro-dilución en caldo.

Tubo	Caldo MH (mL)	NPs Ag (mL)	Concentración de Ag (μ g/mL) en el tubo
1	1	1	30.5
2	1	0.75	26.14
3	1	0.5	20.33
4	1	0.25	12.2
5	1	0.185	9.52
6	1	0.125	6.77
7	1	0.065	3.685
8	1	0.031	1.89
9	1	0.015	0.915
10	1	0.007	0.427

Sembrado

Se sembró en micro placa de 96 pocillos (12 x 8), una corrida de doce pocillos y cuatro repeticiones. Cada corrida se llenó con un total de 200 μL , de los cuales 100 μL fueron de caldo MH, 100 μL de la dilución de NPs Ag obtenidas de la forma en que el apartado “Preparación de las diluciones de NPs Ag” lo señala, y 10 μL del inóculo, que al ser un volumen menor al 10 % de volumen final es despreciable. Además, se dejó el pocillo 1 como blanco sin inóculo y sin NPs Ag y el pocillo 12 como blanco sin NPs Ag. El cuadro 4 muestra con más detalle la forma en que se llenaron los pocillos. Una vez que se llenó la micro-placa, se colocó en una jarra de anaerobiosis con un sobre BD Gaspak™ y se llevó a incubar por cinco días a 37° C.

Cuadro 4: Sembrado en micro-placa

Pocillo	Caldo (μL)	Tubo de dilución de NPsAg	Dilución de NPsAg (μL)	Inóculo (μL)	Concentración de Ag ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en el pocillo.
1	200	-----	-----	-----	0.0
2	100	1	100	10	15.25
3	100	2	100	10	13.07
4	100	3	100	10	10.17
5	100	4	100	10	6.1
6	100	5	100	10	4.76
7	100	6	100	10	3.38
8	100	7	100	10	1.84
9	100	8	100	10	0.94
10	100	9	100	10	0.46
11	100	10	100	10	0.21
12	200	-----	-----	10	0.0

4.7.3. Concentración mínima letal.

Tomando como punto de partida la micro-placa de la prueba de CMI, se sembraron en placa con agar MH las cuatro diluciones de mayor concentración de NPs Ag consecutivas al pocillo de la micro-placa que no presentó turbidez. Se tomaron 100 μ L de los pocillos y se depositaron en placas con agar MH ya gelificado, se extendió el inóculo sobre la superficie con ayuda de cuatro o cinco esferas de cristal estériles, moviendo la placa en forma circular, apoyada sobre la superficie de la mesa de trabajo. Una vez que el inóculo quedó repartido homogéneamente sobre la superficie de la placa, se retiraron las esferas por decantación y las placas fueron sometidas a incubación en una jarra de anaerobiosis con un sobre BD GaspakTM por cinco días a 37 °C.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5. OBTENCIÓN DEL AGENTE REDUCTOR

Con el objetivo de encontrar una concentración de los extractos que permitiera reducir exitosamente la sal de nitrato de plata para formar NPs Ag, y al mismo tiempo, permitiera realizar diferentes análisis en equipos sensibles a compuestos coloridos, se realizaron diferentes diluciones del extracto, ya que los extractos de *E. polystachya*, poseen pigmentos.

Se realizaron diluciones del extracto desde 1:2, 1:4, 1:8, 1:10, hasta 1:40, y fueron analizadas mediante espectroscopia UV-Vis para poder obtener sus espectros de absorbancia y con base en estos determinar la concentración óptima de los extractos que nos permitiera la obtención de las NPs Ag. En la figura 7 se muestran los espectros obtenidos de las diluciones del extracto.

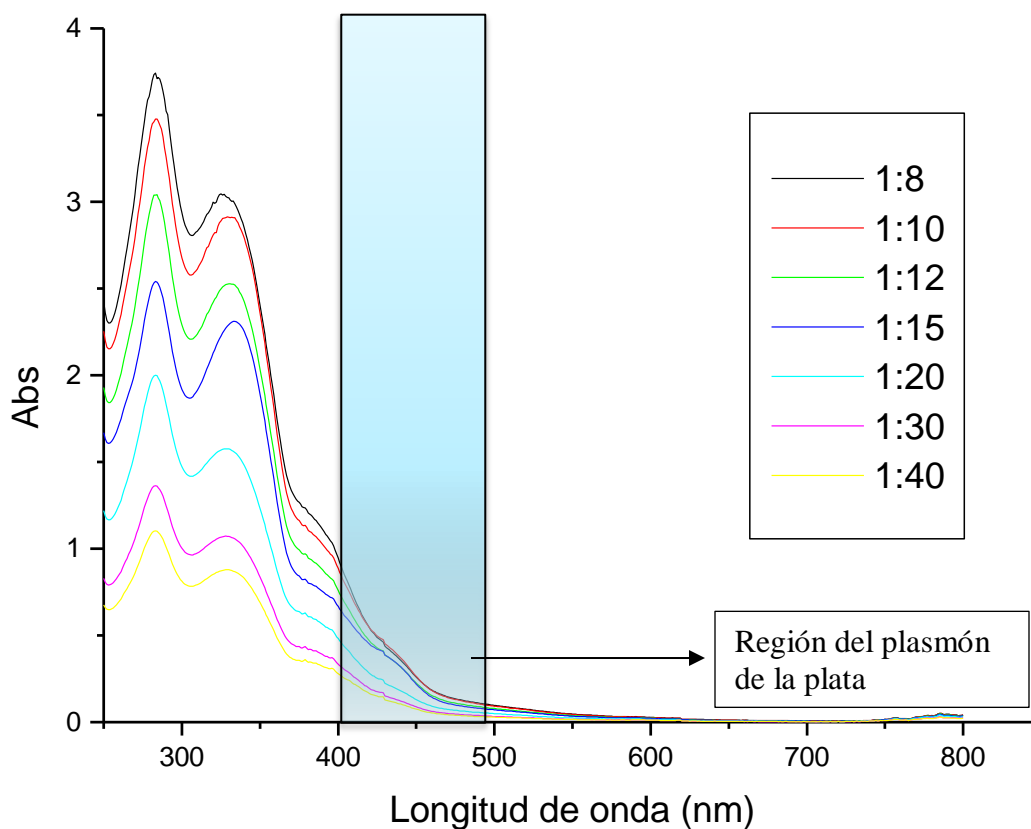


Figura 7: Absorbancia de las diluciones del extracto

Como se observa en la figura 7, los extractos no presentan bandas de absorbancia en la región de la plata. Se eligió la dilución 1:40 ya que no sobrepasa los límites de lectura de los compuestos coloridos para espectrofotometría UV-Vis. También se pueden observar dos máximos de absorbancia, el primero en 282 nm que es la región en donde absorben grupos como los carbonilos (aldehídos $RHC=O$) [68]. El segundo máximo de absorbancia se observa en 325 nm. Hay estudios que demuestran que estas dos bandas presentadas por extractos polifenólicos, corresponden a un solo grupo de compuestos que pertenecen a la familia de los flavonoides [69]. En la figura 8 se muestra la estructura básica de estos compuestos.

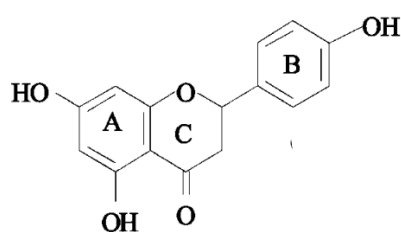


Figura 8: Estructura básica de los flavonoides [69]

La banda de absorbancia 1 (320-385 nm) representa la absorción del anillo B, mientras que la banda 2 (250-285 nm) corresponde a la absorbancia del anillo A [69]. La presencia de estas bandas concuerdan con la composición de los extractos los cuales están constituidos principalmente por flavonas [24, 25, 26]. En la figura 9 se presenta la imagen del extracto y la dilución 1:40; la diferencia en la concentración de los compuestos coloridos se puede observar a simple vista.

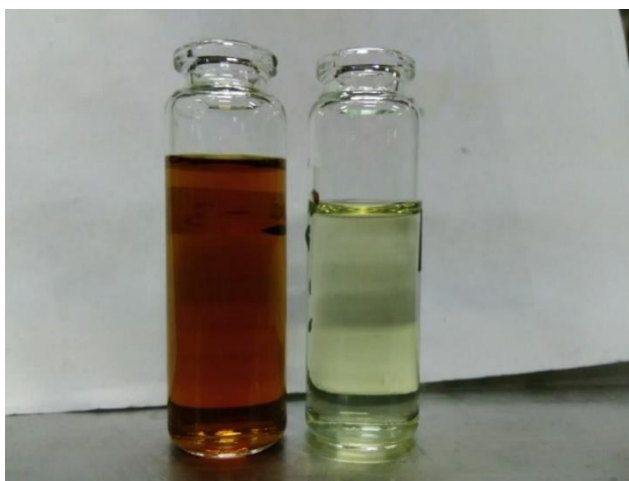


Figura 9: Extracto sin diluir y dilución 1:40

5.2.OBTENCIÓN DE LAS NPs Ag

Utilizando la dilución del extracto de palo azul 1:40 se realizó las síntesis de NPs Ag. Se sintetizaron 10 muestras y después de 6 h de reacción las soluciones cambiaron de color amarillo claro a ámbar lo que indica la formación de NPs Ag [15]. Estas muestras fueron medidas por espectroscopía UV-Vis para poder comparar la efectividad de cada sistema aprovechando la formación de plasmón superficial de la plata y comparando la intensidad de la banda presentada para cada muestra. En la figura 10 se muestran los espectros de absorción para todas las muestras. Todas las muestras se midieron a las seis horas de reacción y todas mostraron cambio en la coloración de amarillo claro a ámbar como se muestra en la figura 11.

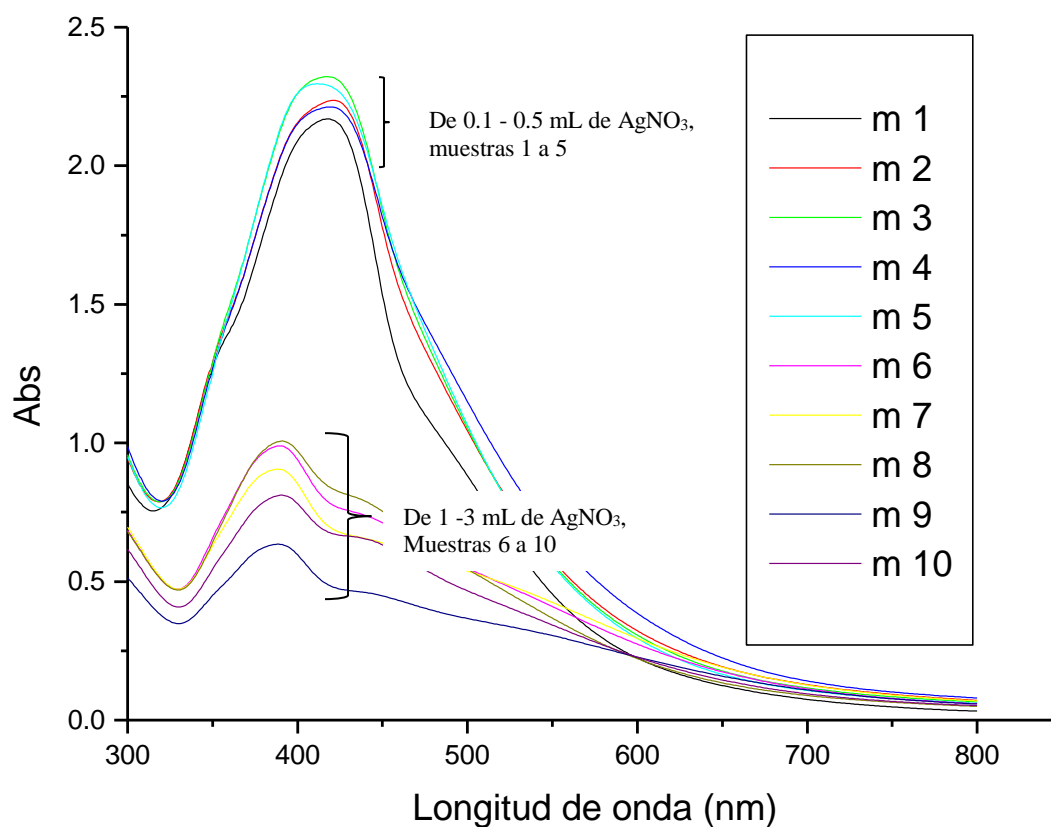


Figura 10: Absorbancia del plasmón superficial de todos los sistemas

Como se observa en la figura 10 es evidente que las concentraciones que van de 0.1-0.5 ml presentan mayor absorbancia. Sin embargo, para poder elegir el mejor sistema se realizó un

análisis estadístico con el software Minitab 16, se llevó a cabo un análisis ANOVA y la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. Con base en este análisis se encontró que todas las muestras son significativamente diferentes, siendo la muestra 3 (0.3 ml de AgNO_3) la que mayor absorbancia presenta, por lo tanto, la idónea para obtener nanopartículas de plata en este estudio.

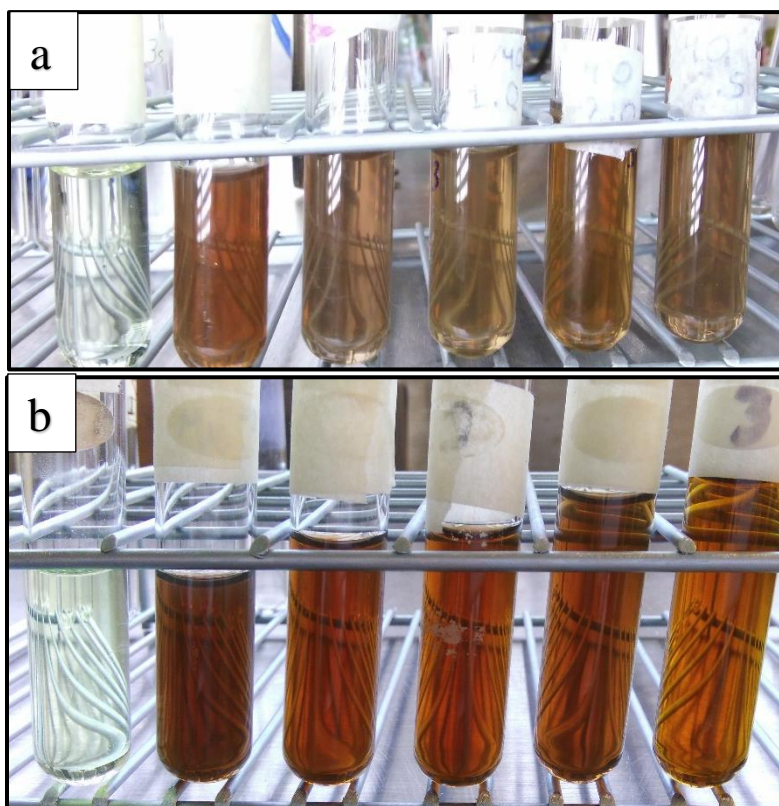


Figura 11: cambio en la coloración de los sistemas debido a la formación de las NPs Ag.

(a) El primer tubo de ensaye de izquierda a derecha contiene el extracto diluido, los demás tubos contienen las muestras con 1.0 a 3.0 mL de nitrato de plata. (b) El primer tubo de ensaye de izquierda a derecha contiene el extracto diluido y los demás tubos contienen las muestras con 0.1 a 0.5 mL de nitrato de plata.

5.3.CINÉTICA DE SÍNTESIS DE LAS NPs Ag CON PALO AZUL

Con el fin de observar el inicio, desarrollo y termino de la reacción de formación de NPs Ag con extractos de palo azul como agente reductor, se realizó un seguimiento de la reacción por medio de la medición del plasmón superficial a diferentes tiempos sobre la muestra 3. En la figura 12 se muestra la cinética de formación de las NPs Ag obtenidas.

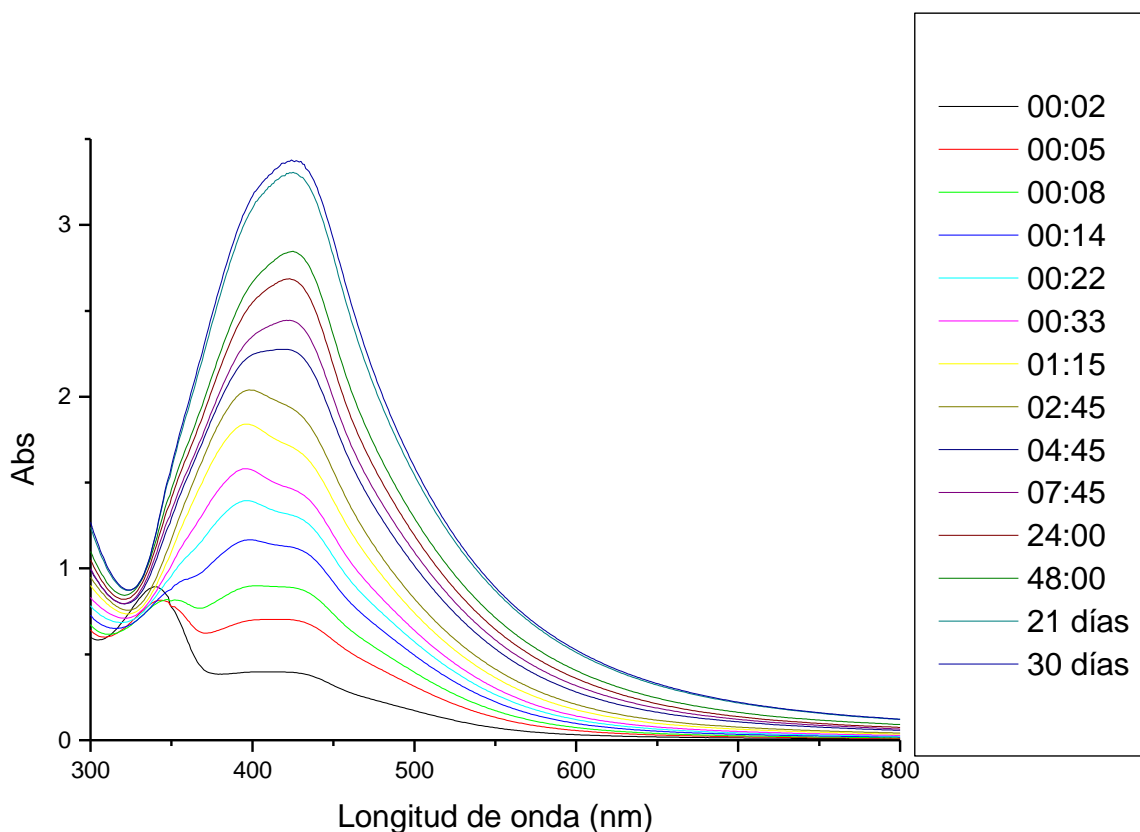


Figura 12: Cinética de síntesis de la muestra 3 (0.3 mL NO_3Ag + 5 mL de extracto)

Al realizar estas mediciones, se observaron dos bandas en la absorbancia de las NPs Ag. La primera a una longitud de onda de 395 nm, y la segunda a 430 nm. En cuanto a la primera banda, mediante microscopia de transmisión no se encontraron diversas formas por lo cual esta primera banda se atribuye a una dispersión bimodal de tamaños [15], que corresponde a estructuras muy pequeñas o clusters que con el tiempo se agregan y forman NPs. Por lo tanto, la primera banda va desapareciendo conforme el tiempo de la reacción avanza, mientras que la intensidad de la segunda banda aumenta, ya que ésta corresponde a la banda del plasmón característico de nano-partículas esféricas de plata [70].

Para observar más claramente el término de la reacción, se realizó una gráfica de tiempo contra absorbancia que se muestra en la figura 13. Como se observa, el término de la reacción sucede a las 48 h. La muestra es relativamente estable a temperatura y presión estándar puesto que se realizaron más mediciones después de periodos prolongados de tiempo (21 y 30 días), y la segunda banda (420 nm) que corresponde a NPs Ag esféricas, continua en la misma región. La absorbancia aumenta muy poco, sin embargo, éste aumento de la intensidad aún después de las 48 h es debido a los remanentes de clusters que con el tiempo continúan creciendo y formando partículas más grandes.

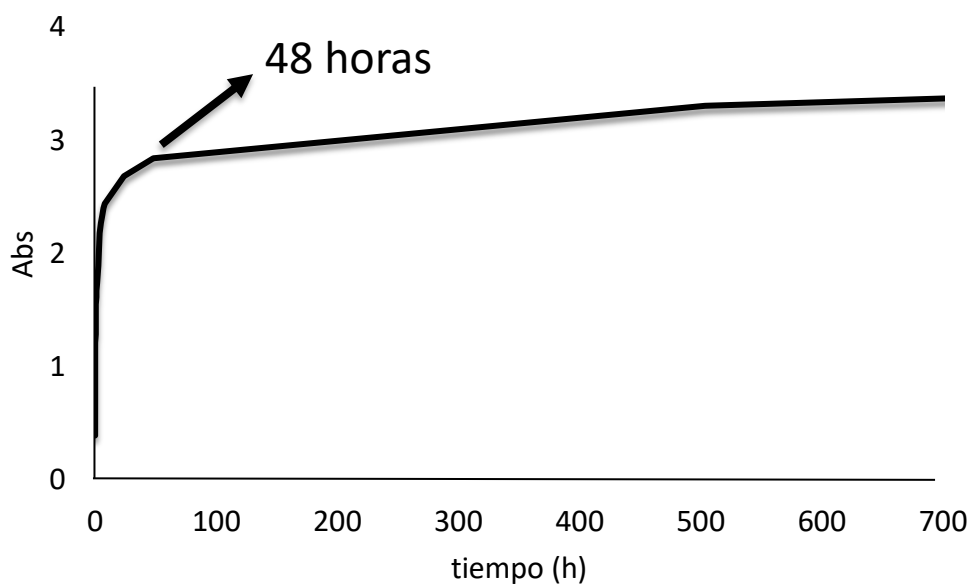
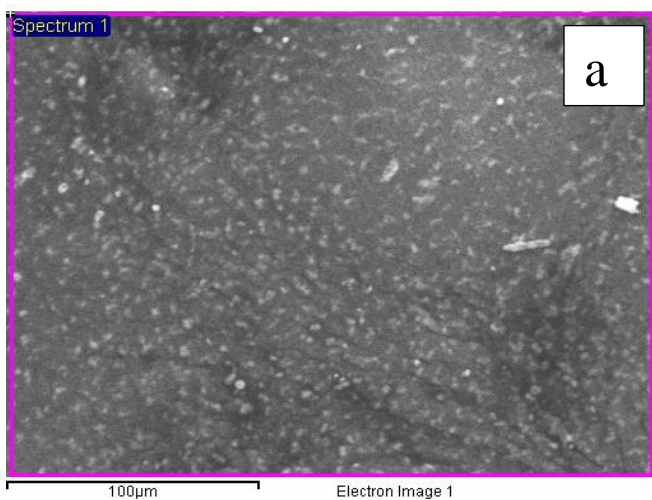


Figura 13: Tiempo (h) vs Abs, muestra 3.

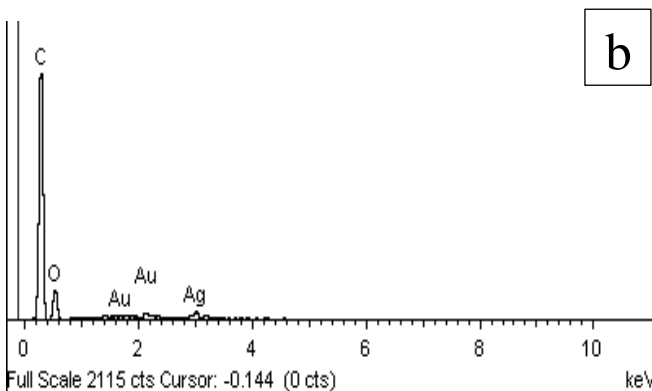
5.4. COMPOSICIÓN OBSERVADA POR EDS DE LAS NPs Ag OBTENIDAS

Se llevó a cabo un análisis con SEM/EDS para asegurar que las partículas obtenidas estuvieran compuestas por plata, en la figura 14 se muestran los datos obtenidos.



Elemento	Peso%	Atómico%
C K	70.20	77.89
O K	26.10	21.74
Ag L	2.27	0.28
Au M	1.43	0.10
Total	100.00	

Figura 14: Análisis de la muestra por SEM/EDS



(a) Micrografía de la muestra en SEM/EDS con electrones secundarios. (b) Espectro obtenido por EDS. Derecha: Tabla porcentual de composición de la muestra.

Debido a la preparación de la muestra, en la micrografía (figura 14), se pueden observar cúmulos de nanopartículas (puntos brillantes). El espectro obtenido por EDS se realizó haciendo un análisis de toda el área observada por SEM, y se puede corroborar la presencia de plata en la muestra, mientras que en la tabla de composición se señala que el porcentaje de plata es muy pequeño ya que la muestra se preparó con una cantidad muy baja de plata. La presencia de oro se debe a que la muestra fue recubierta con oro antes de realizarse el análisis.

5.5.TAMAÑO Y FORMA DE LAS NPs Ag OBTENIDAS

A través de la microscopía electrónica de transmisión (TEM), se pudo observar el tamaño y forma de las nanopartículas obtenidas, en la figura 15 se muestran tres micrografías obtenidas

por TEM de la muestra 3, donde se observan nanopartículas con forma esferoidal y con poca agregación.

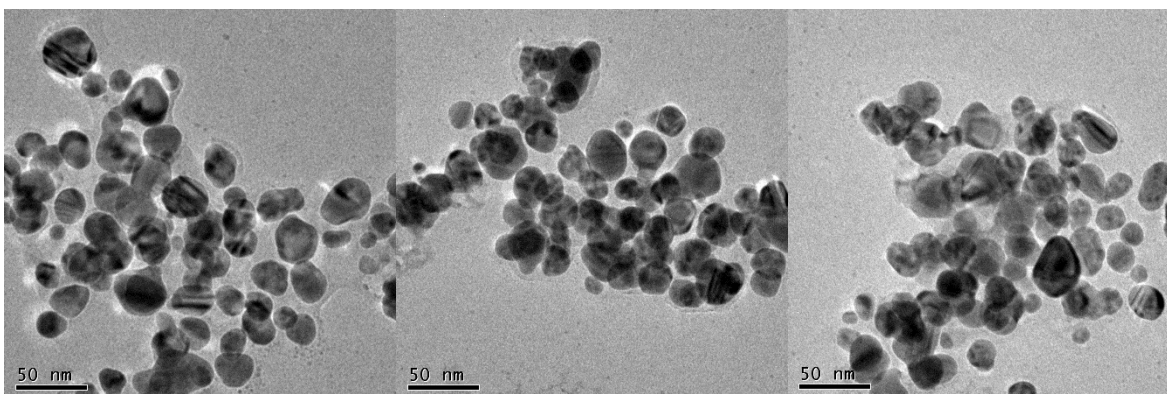


Figura 15: Micrografías de TEM, muestra 3

Adicionalmente se llevó a cabo la medición de las nanopartículas observadas en las micrografías de la muestra 3 mediante el software imageJ, obteniéndose un tamaño promedio de 22 ± 9 nm, con una polidispersidad de tamaños que van desde 6 hasta 55 nm. Por lo anterior, se comprueba el cumplimiento de otro objetivo, obtener NPs Ag menores a 70 nm. En la figura 16 se muestra el histograma obtenido.

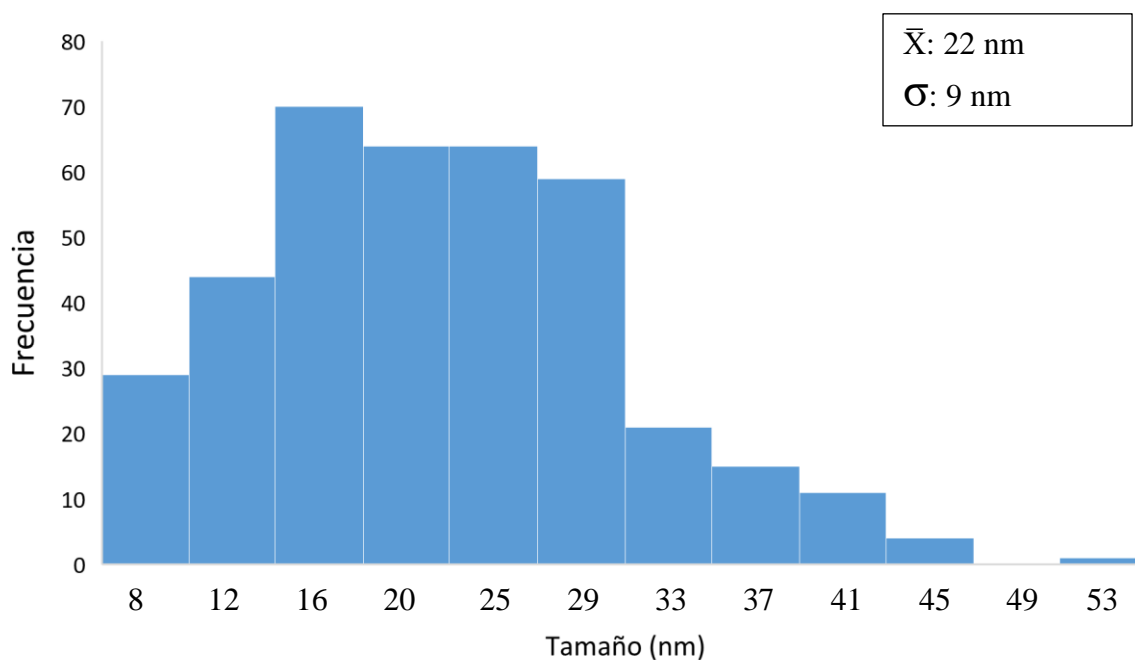


Figura 16: Distribución de tamaños de partículas de la muestra 3

También se obtuvieron micrografías de la muestra 6 (5 mL de extracto con 1 mL de sol. AgNO_3) (figura 17) para observar si hay diferencia entre una muestra y otra ya que en el UV-Vis de esta muestra al igual que todas las demás, muestra una absorbancia menor, aunque la forma de la banda de absorción sea la misma y se presente en la misma región del espectro.

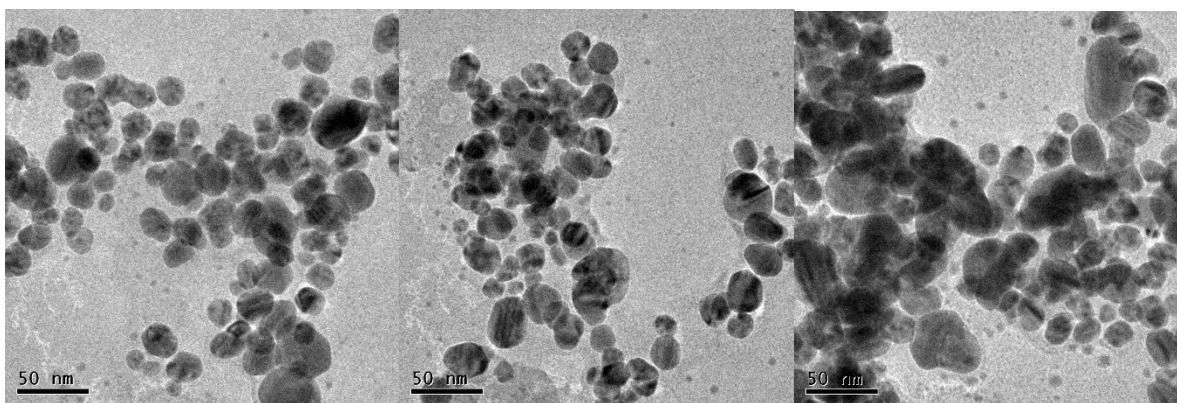


Figura 17: Micrografías de TEM, muestra 6

Se puede observar que esta muestra presenta mayor polidispersidad y mayor aglomeración, y para comprobar esta diferencia se llevó a cabo la medición de las NPs observadas de igual manera que para la muestra 3 (con el software imageJ). El promedio que se obtuvo fue de 26 ± 10 nm, con una polidispersidad de tamaños que van desde los 8 nm hasta los 70 nm. Estos resultados concuerdan con las observaciones a simple vista de las micrografías, comprobando que se obtuvieron NPs de mayor tamaño y mayor polidispersidad en la muestra 6 y asegurando que la muestra 3 presenta las concentraciones adecuadas de la solución precursora y el agente reductor para la síntesis de NPs Ag.

Se realizó un análisis con HRTEM de la muestra 3 para corroborar que las NPs Ag estuvieran formadas por Ag^0 . En la figura 18 se muestra la micrografía por HRTEM. Utilizando el Software ImageJ se midieron espacios inter-planares encontrándose una distancia de 2.38 \AA , que corresponde a la familia de planos $\{111\}$ tomando de referencia la tarjeta ICDD 2008: 00-004-0783.

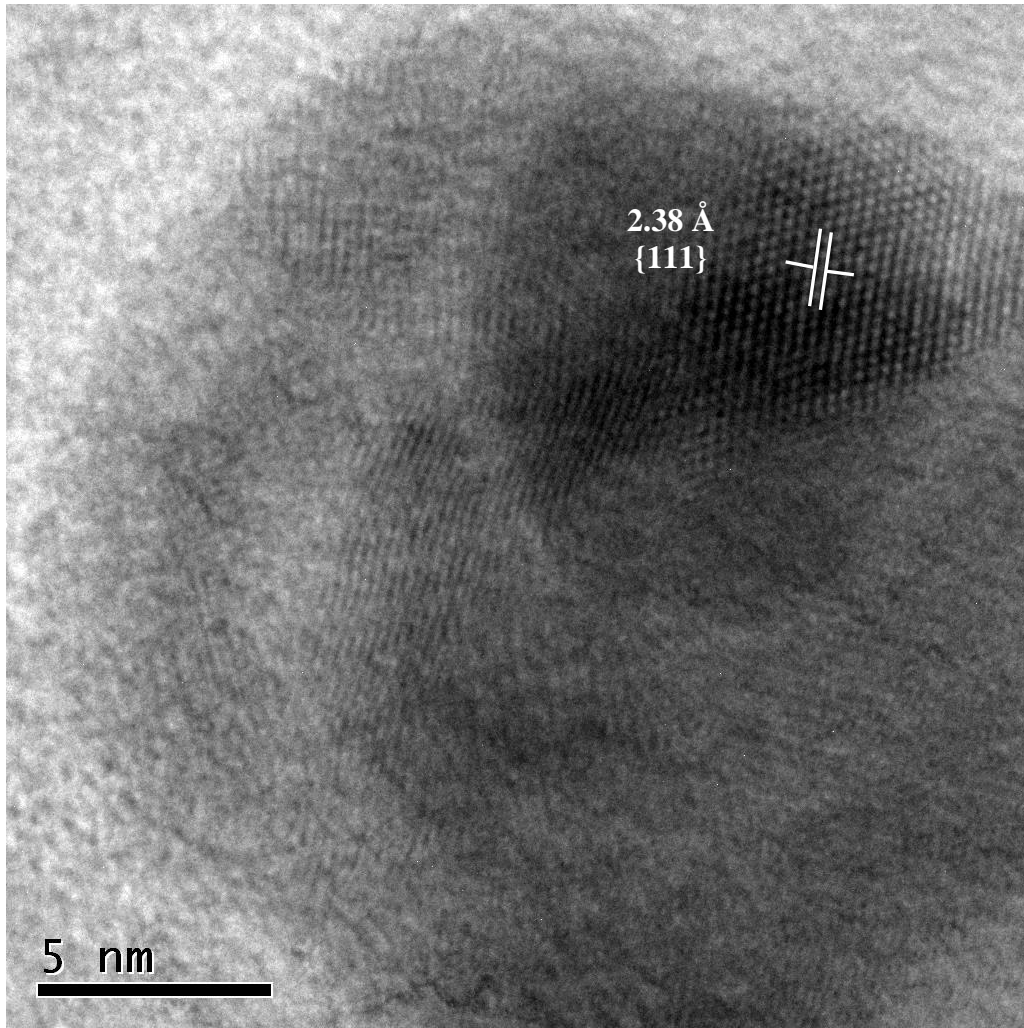


Figura 18: Micrografía HRTEM, muestra 3.

5.6.SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

5.6.1. Técnica de Kirby-Bauer para halo inhibitorio.

Esta técnica es ampliamente utilizada ya que es una de las más sencillas y rápidas en microbiología clínica [71]. Este estudio permitió evaluar la sensibilidad que tiene *Clostridium sp.*, a las NPs Ag obtenidas y comparar esta respuesta con otros antibióticos. Se escogieron, como antimicrobianos de comparación, metronidazol y nitrito de sodio, ya que está documentado que un disco de 5 mg de metronidazol produce un halo de inhibición de

27 mm [71], mientras que los nitritos de sodio o potasio son utilizados en la industria alimenticia y más específico, en embutidos, para inhibir el crecimiento de *Clostridium*, en una concentración máxima de 200 ppm según la FDA [66]. También se hicieron discos con el extracto de *Eysenhardtia polystachya*, para observar si presenta inhibición contra *Clostridium sp.*, y poder evaluar esta contribución en las NPs Ag.

Se midieron los halos de inhibición presentados por los discos de celulosa que contenían NPs Ag, así como los discos de metronidazol, de nitrito de sodio y del extracto. Los resultados mostraron que los discos de NPs Ag formaron halos bien definidos de 4 cm. En cuanto a todos los demás discos ninguno formó halo de inhibición. En la figura 19 se muestran las imágenes de los cultivos con los discos después de ser incubados durante cinco días.

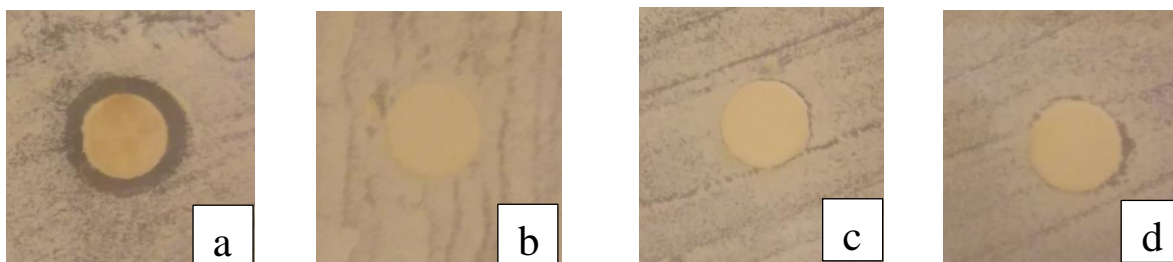


Figura 19: prueba de Halos de inhibición. (a) Halo de inhibición de NPsAg, (b) disco del extracto sin diluir de *Eysenhardtia polystachya*, (c) disco de metronidazol. (d) Disco de NaNO_2

El disco con el extracto no presentó halo de inhibición, en cambio, hubo crecimiento en la superficie del disco. Otro aspecto muy importante es que el disco de metronidazol no presentó crecimiento sobre el disco, pero tampoco presentó halo de inhibición. Lo anterior se traduce en que la cepa en estudio es resistente a este medicamento a esta concentración. Por otro lado, los discos de NaNO_2 no presentaron crecimiento sobre el disco y tampoco formaron halo de inhibición, lo que significa que esta cepa también es resistente a esta concentración de NaNO_2 . De esta forma se demuestra la alta sensibilidad que presenta *Clostridium sp.*, ante las NPs Ag aun siendo una cepa resistente ante otros antimicrobianos fuertes como son metronidazol y nitrito de sodio.

5.6.2. CMI

En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos a partir del pocillo 7 de la micro-placa. La cepa presentó crecimiento en el pocillo 12, en donde no se agregaron NPs Ag, y en el pocillo 11, que contenía la más baja concentración (0.213 $\mu\text{g/mL}$). El crecimiento se denota por la turbidez presente en los pocillos después de haber sido incubados. Por lo tanto, la concentración mínima inhibitoria la presentó el pocillo 10 (0.46 $\mu\text{g/mL}$), a partir del cual no se observó turbidez y por lo tanto no hubo crecimiento.

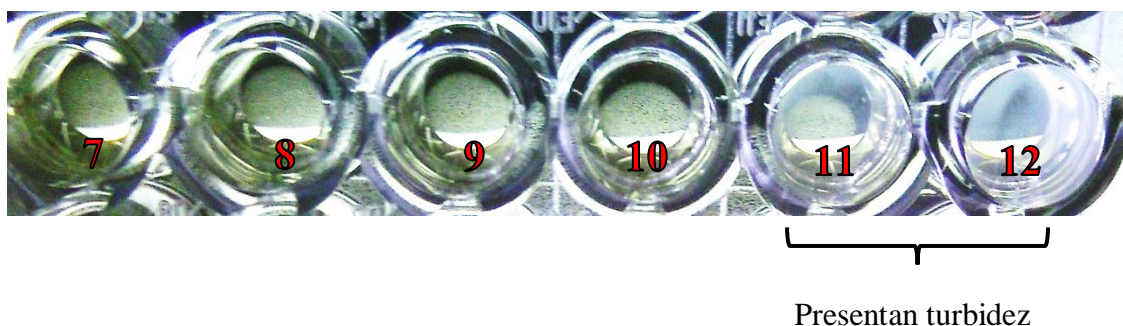


Figura 20: Microplaca a partir del pocillo 7, para CMI

5.6.3. CML

Para obtener la concentración mínima letal, se tomaron como base los resultados obtenidos en la prueba de concentración mínima inhibitoria. En el cuadro 5 se muestra la descripción de los resultados de cada pocillo. Para obtener la CML se sembraron en placa con agar MH el pocillo diez y los tres pocillos consecutivos a éste, donde no se observó turbidez y por lo tanto no hubo crecimiento de la bacteria. Estos pocillos fueron: 7, 8, y 9. En las figuras 21 y 22 se muestran los resultados obtenidos en placa con agar MH después de 5 días de incubación en jarra para anaerobios.

Cuadro 5: Determinación de la CMI y CML de NPs Ag contra *Clostridium* sp.

Pocillo	NPs Ag $\mu\text{g/mL}$	Inóculo (UFC/mL)	Características observadas después de 5 días de incubación
1	0.0	0.0	Sin turbidez
2	15.25	1×10^4	Sin turbidez
3	13.07	1×10^4	Sin turbidez
4	10.17	1×10^4	Sin turbidez
5	6.1	1×10^4	Sin turbidez
6	4.76	1×10^4	Sin turbidez
7	3.38	1×10^4	Sin turbidez
8	1.84	1×10^4	Sin turbidez
9	0.94	1×10^4	Sin turbidez
10	0.46	1×10^4	Sin turbidez
11	0.21	1×10^4	Turbidez
12	0.0	1×10^4	Turbidez

* CMI. *CML

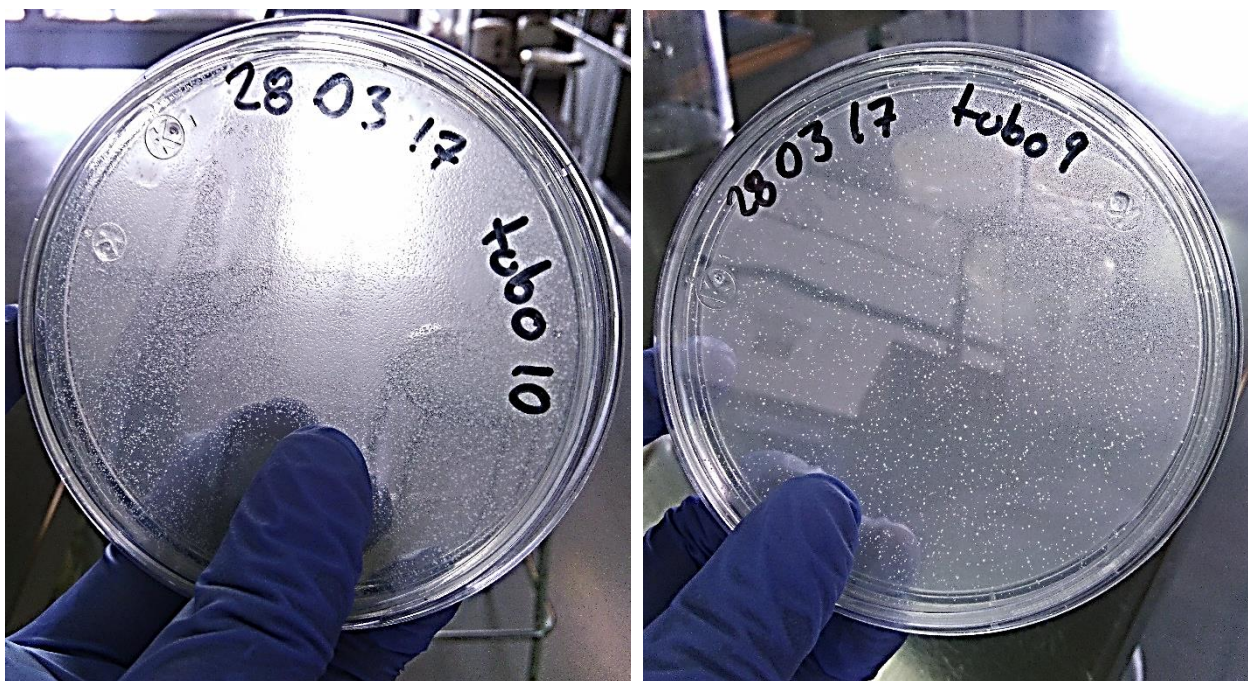


Figura 21: Sembrado en placa del pocillo 10 y 9

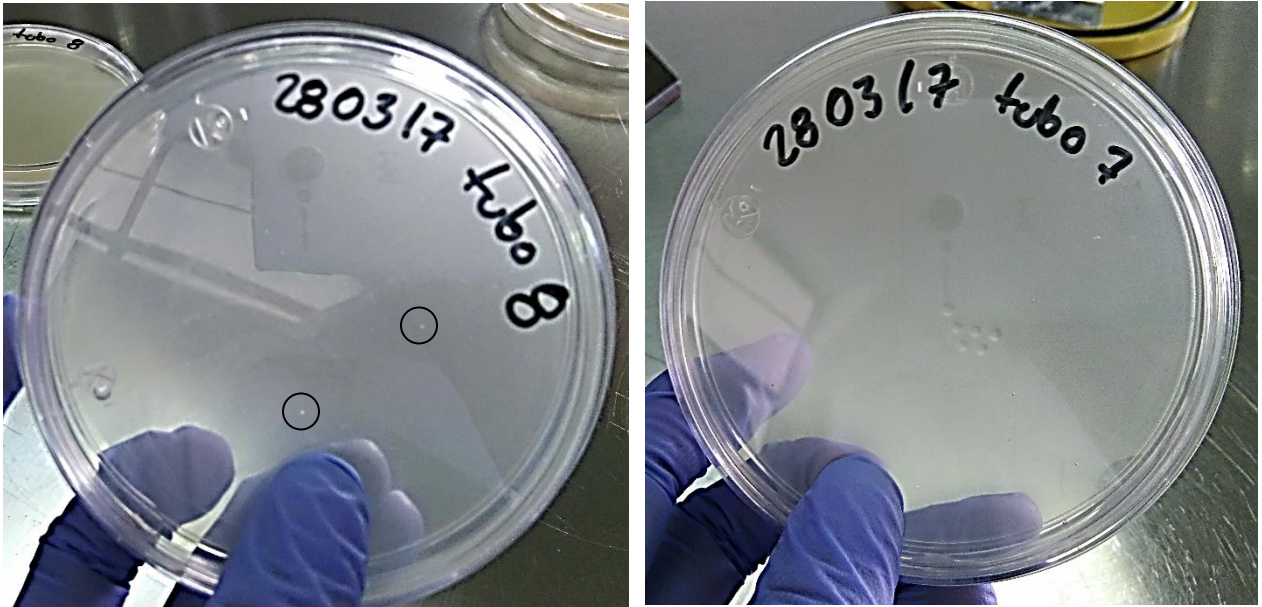


Figura 22: Sembrado en placa del pocillo 8 y 7

En las placas que se sembraron con el contenido de los pocillos 9 y 10 se observó crecimiento notable de la bacteria mientras que en el pocillo 8 no se observa crecimiento, no obstante, si se observaron dos colonias diminutas. Por otro lado, en la placa donde se sembró la muestra del pocillo 7, no se observó crecimiento de colonias. Por lo tanto, la concentración mínima letal es la presentada en el pocillo 7 y corresponde a $3.38 \mu\text{g/mL}$.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

- La dilución del extracto de *E. polystachya* 1:40 es la más apropiada para sintetizar NPs Ag.
- La relación de sal precursora y reductor que dio mejor resultado fue de 0.3 mL de AgNO₃ a concentración de 0.01 M y 5 mL de extracto diluido a una proporción de 1:40 (muestra 3).
- Por medio de UV-Vis se observaron dos bandas en la absorbancia de las NPs Ag debido a una dispersión de tamaños bimodal. El primer pico corresponde a una longitud de onda de 395 nm y se debe a nano-partículas muy pequeñas o clusters, y el segundo a 430 nm que corresponde a la banda del plasmón característico de nano-partículas esféricas de plata.
- El término de la reacción de formación de NPs Ag ocurre a las 48 h de iniciada.
- Por medio del análisis SEM/EDS se reveló que efectivamente en la composición de la suspensión de las NPs se encuentra presente la Ag.
- Por medio de TEM se observó que este método de síntesis genera nanopartículas de forma esferoide con tamaño promedio de 22 nm ± 9 nm, con buena dispersión.
- Con HRTEM se observaron los espacios inter-planares de las NPs Ag, encontrándose una distancia de 2.38 Å, distancia muy similar a la teórica para la familia de planos {111} para Ag⁰.
- Mediante el método de Kirby-Bauer para halos de inhibición se observó que las NPs Ag formaron un halo de inhibición de 1 cm, y que el extracto no presentó halo inhibitorio. El disco de metronidazol no presentó halo de inhibición, esto significa que la cepa en estudio es resistente a este medicamento en esta concentración. Por

otro lado, los discos de NaNO₂ tampoco formaron halo de inhibición, lo que significa que esta cepa también es resistente a esta concentración de NaNO₂.

- La concentración mínima inhibitoria de NPs Ag sintetizadas por bio-reducción con extractos de *E. polystachya*, para inhibir el crecimiento de 1x10⁴ UFC/mL de *Clostridium sp.*, fue de 0.46 µg/mL, mientras que la concentración mínima letal fue de 3.38 µg/mL.
- Las NPs Ag sintetizadas por método biológico con el extracto acuoso de *E. polystachya* mostraron tener muy buenas propiedades antimicrobianas contra *Costridium sp*, haciéndolas un excelente candidato para su uso en la industria alimentaria.

REFERENCIAS

- [1] Jayachandra R., Rani M., Arvind K., Sudha R. *Biological activities of green silver nanoparticles synthesized with Acorous calamus rhizome extract*. European Journal of Medicinal Chemistry 85 (2014) 784-794
- [2] Elemike E., Oseghale C., Chuku A., Labulo A., Owoseni M., Mfon R., Enock O., Adesuji E. *Evaluation of antibacterial activities of silver nanoparticles green-synthesized using pineapple leaf (Ananas comosus)*. Micron 57 (2014) 1–5
- [3] Deenadayalan A., Palanichamy V., Selvaraj M. *Green synthesis of silver nanoparticles using Alternanthera dentata leaf extract at room temperature and their antimicrobial activity*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 127 (2014) 168–171.
- [4] Seied M., Mehdi T., Vajihe M., Mehdi R. *Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of Eucalyptus oleosa* Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 136 (2015) 1249–1254.
- [5] Venkata S., Susmila A., Subba R., Prasad T., Varada R., Sai G., *Biofabrication of silver nanoparticles using Andrographis paniculata*. European Journal of Medicinal Chemistry. 73 (2014) 135-140
- [6] Pérez R., Vargas R., García L., Dávila L. *Efecto de isoflavonas aisladas de la corteza de Eysenhardtia polystachya sobre el crecimiento de cristales de oxalato y fosfato de calcio urinario*. Boletín del Colegio Mexicano de Urología, 17(3) (2002) 134-139.
- [7] Miranda, C., Rojo, M.D., *Clostridium perfringens: infecciones de piel y tejidos blandos*. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. Obtenido el 26 de agosto de 2017 de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Clostper.pdf>

[8] Clostridium. Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria. Elika. Obtenido el 26 de agosto de 2017 de http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento87/Copia%20de%206.Clostridium.pdf

[9] Poole Jr., C. *Introduction to nanotechnology*. New Jersey: John Wiley & Sons. (2003) pp. 9.

[10] López, G., Morales, R., Olea, O., Sánchez, V., Trujillo, J., Varela, V., Vilchis, A. *Nanoestructuras metálicas*. México: Ed. Reverté. (2013) pp 4.

[11] Wiley, B., Sun, Y., Chen, J., Cang, H., Li, ZY., Li, X., Xia, Y. *Shape-controlled synthesis of silver and gold nanostructures*. MRS bulletin/Materials Research Society. 30 (5). (2005) 356-361.

[12] Buzea, C., Blandino-Pacheco, I., Rosie, K. *Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity*. Biointerphases. 2 (4). (2007) 17-71.

[13] Ávalos A., Haza AI., Mateo D., Morales P. *Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente* Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 7(2) (2013) 1-23.

[14] Hoppens, M., Sylvester, C., Qureshi, A., Scherr, T., Czapski, D., Duran, R., Savage, P., Hayes, D. *Ceragenin: mediated selectivity of antimicrobial silver nanoparticles*. ACS Appl. Mater. Interfaces. 6 (2014) 13900 –13908.

[15] Roldán M., Frattini A., de Sanctis O., Pellegrini N. (2005). *Nanopartículas metálicas con formas diversas*. Anales AFA, (17): 212-217.

[16] Liz-Marzán, M. *Nanometals formation and color*. Materials Today, Review Feature. (2004) 26-31.

- [17] Cruz D., Rodríguez M., López J., Herrera V., Orive A., Creus A. *Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda*. Avances en Ciencias e Ingeniería, 3(2) (2012) 67-78.
- [18] Yeshchenko O., Dmitruk I. Alexeenko A., Losytsky M., Kotko A., Pinchuk A. *Size-dependent surface-plasmon-enhanced photoluminescence from silver nanoparticles embedded in silica*. Physical Review B. 79 (2009) 1-8
- [19] López J., Vilchis A., Sánchez V., Avalos M. *Obtención y caracterización de nanopartículas de plata soportadas en fibra de algodón*. Superficies y Vacío 26 (3) (2013) 73-78
- [20]. Zhou J., Ralston J., Sedev R., Beatte D. *Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability*. Journal of Colloid and Interface Science, 331 (2009) 251-262.
- [21] Cuberes M. (2006). *Nanotecnología: actualidad y futuro*. Trabajo docente, [en línea]. Universidad de Castilla, España. Disponible en: <https://profesordiegoj.files.wordpress.com/2013/03/nanotecnologc3ada-actualidad-y-futuro.pdf>. [Consultado 01/09/2015].
- [22] Agilar M. Miguel. (2009). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: efecto sobre Colletotrichum gloesporioides*. Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada IPN. Tesis Doctoral.
- [23] Kasi, M., Balakrishnan, S., Duraisamy, S., Saleh, Al-S. *Biosynthesis of silver nanoparticles using acacia leucophloea extract and their antibacterial activity*. International Journal of Nanomedicine. 9. (2014) 2431–2438.
- [24] Thi Thanh T., Thi Thu H., Thi Hanh N. *Biosynthesis of silver nanoparticles using Tithonia diversifolia leaf extract and their antimicrobial activity*. Materials Letters, 105 (2013) 220–223.

- [25] Babu G., Arulvasu C., Prabhu D., Jegadeesh R., Manikandan R. *Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from Datura inoxia and its apoptotic effect on human breast cancer cell line MCF7*. Materials Letters, 122 (2014) 98–102.
- [26] Qian S., Xiang C., Jiangwei L., Min Z., Zuliang C. Chang-Ping Y. *Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity* Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 444 (2014) 226–231.
- [27] Salem W, Haridy M, Sayed W, Hassan N. *Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized from latex and leaf extract of Ficus sycomorus*. Industrial Crops and Products 62 (2014) 228–234.
- [28] Uttara B., Singh A., Zamboni P., Mahajan R. *Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options*. Current Neuropharmacology. 7 (2009) 65-74.
- [29] Pablo-Pérez S., Estévez-Carmona M., Meléndez-Camargo M., Bangladesh. *Diuretic activity of the bark of Eysenhardtia polystachya*. J Pharmacol, 11 (2016) 212-217.
- [30] Pérez Rosa M., García Efren B. *Evaluation of antidiabetic, antioxidant and antiglycating activities of the Eysenhardtia polystachya*. Pharmacogn Mag.10 (2) (2014) 404–418.
- [31] Gutierrez L., Sumano H., Rivero F., Alcalá-Canto. *Ixodicide activity of Eysenhardtia polystachya against Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. American Society of Animal Science. 93 (2015) 1980–1986.
- [32] Evanoff D., Chumanov G. *Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays*. Chem. Phys. Chem. 6 (2005) 1221-1231

- [33] Constanza Y. (2014). *Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida*. Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina. Tesis Doctoral.
- [34] Cushing B., Kolesnichenko V., O'Connor, C. *Recent advances in the liquid phase syntheses of inorganic nanoparticles*. Chemical Reviews 104 (2004) 3893-3946.
- [35]. Burda C., Chen X., Narayanan R., El-Sayed M. *Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes*. Chemical Reviews 10 (2005) 1025-1102.
- [36] Schmid G. *Nanoparticles: From Theory to Application*. Wiley. (2004)
- [37] Niels H., Lam, H. *Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver – A review*. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 68 (2014) 1–7
- [38] Medina P., Mejía M. *Monografía de la plata (Ag)*. Servicio geológico mexicano. Obtenido el 15 de agosto de 2017 de <http://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/pdfs/Monografia%20PLATA.pdf>.
- [39] Georgsen, M. (2007) *An in vitro toxicity study of a colloid silver health product and atomic quantum clusters of silver and gold*. The Faculty of Pharmaceutical Sciences, Copenhagen University. Tesis de Maestría.
- [40] Nowack, B., Krug, H., Height, M. *120 years of nanosilver history: Implications for policy makers*. Environ. Sci. Technol. (2010)
- [41] Banerjee, J., Narendhirakannan, R. *Biosynthesis of silver nanoparticles from Syzygium cumini (L.)*. Seed extract and evaluation of their in vitro antioxidant activities. Dig. J. Nanomater. Biostruct. 6. (2011) 961–968.

- [42] Rutberg, F., Dubina, M., Kolikov V., Moiseenko F., Ignat'eva E., Volkov N, Snetov V, Stogov A. Dokl. *Effect of silver oxide nanoparticles on tumor growth in vivo*. Biochem. Biophys. 421. (2008) 191–193.
- [43] Ong C., Lim J., Ng C., Li J., Yung L., Bay B. *Silver nanoparticles in cancer: therapeutic efficacy and toxicity*. Curr. Med. Chem. 20 (2013) 772–781.
- [44] Luminita D., Bianca M., Adriana V., Liliana O., Maria P., Eva F., Adrian F., Maria C., Ioana C., Simona C., Gabriela A. *Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 122 (2014) 767–777.
- [45] Pasupuleti V., Prasad T., Shiekh R., Balam S., Narasimhulu G., Reddy C., Rahman I., Gan S. *Biogenic silver nanoparticles using Rhinacanthus nasutus leaf extract: synthesis, spectral analysis, and antimicrobial studies*. Int. J. Nanomed. 8. (2013) 3355–3364.
- [46] Maneewattanapinyo, P., Banlunara, W., Thammacharoen, C., Ekgasit, S., Kaewamatawong, T. *An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles*. J. Vet. Med. Sci. 73 (2011) 1417–1423.
- [47] Jain, J., Arora, S., Rajwade, J., Omray, P., Khandelwal, S., Paknikar, K. *Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use* Mol. Pharmaceutics. 6 (5). (2009)1388 –1401.
- [48] Morones J., Elechiguerra J., Camacho A., Holt K., Kouri J., Ramírez J., Yacaman M. *The bactericidal effect of silver nanoparticles*. Nanotechnology **16** (2005) 2346–2353
- [49] Murphy, C. *Sustainability as an emerging design criterion in nanoparticle synthesis and applications*. J. Mater. Chem. 18. (2008) 2173–2176.
- [50] Mathew, T., Kuriakose, S. *Studies on the microbial properties of colloidal silver nanoparticles stabilized by bovine serum albumin*. Colloids Surf. B 101. (2013) 14–18.

[51] Clostridia. Obtenida 5 de agosto de 2017 de http://textbookofbacteriology.net/clostridia_4.html.

[52] Subramaniam E., Desigan K., Subramanyam S. *A novel mechanism for clostridium botulinum neurotoxin inhibition* Biochemistry. 41 (2002) 9795-9802.

[53] Arias J. *Fisiopatología quirúrgica*. Editorial Tebar, (1999)

[54] Ali M., Saber I., Mojtaba S., Hossein H., Saeed R., Amane J., Mokhtare Z., Mohammad D. *Comparhense study of sporicidal and sporstatic effect of CuO and AgO metal nanoparticles upon spore of Clostridium botulinum type E*. African Journal of Microbiology Research, 6(7) (2012) 1417-1422, 23.

[55] USDA, meat and poultry hotline, 2010. Obtenida 16 de agosto de 2017 de https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/!ut/p/a0/04_Sj9CPykssy0xPLMnMz0vMAfGjzOINAg3MDC2dDbwMDIHQ08842MTDy8_YwN9EvYDbUREA1T1lfA!!/?1dmy¤t=true&urile=wcm%3Apath%3A/fsis-content/internet/main/programs-and-services/contact-centers/usda-meat-and-poultry-hotline/usda-meat-and-poultry-hotline

[56] Ingraham, C. *Introducción a la microbiología*, Vol. 2. Reverte. (1998). p 567.

[57] C. Perfringens. Obtenida 5 de agosto de 2017. de <https://espanol.foodsafety.gov/intoxicaci%C3%B3n/causas/bacteriasvirus/cperfringens/xfs/%C3%ADndice.html>.

[58] Smart, L., Moore, E. *Solid state chemistry*. CRC Press Taylor & Francis Group. 2005.

[59] Skoog, D.A., Crouch, S.R., Holler, F.J. *Principios de analisis instrumental*. Cengage Learning Editores. 2008

[60] Cao G., Wang Y. *Nanostructures and nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*. World Scientific. (2011)

[61] García J., Cantón R., García E., Gómez-Lus M., Martínez L., Rodríguez-Avial C., Vila J. *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (2000).

[62] R. Taroco, V. Seija, R. Vignoli, *Temas de Bacteriología y Virología Médica, Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica*. Uruguay, Universidad de la República Facultad de Medicina. (2006). 663-671.

[63] I. Cavalieri, Stephen J. *Microbial sensitivity tests, methods. Laboratory Manuals* American Society for Microbiology. (2005).

[64]. *Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución*. Clinical and laboratory standards institute. M07-A9 Vol. 32 No. 2 (2012).

[65] Pardo J., Francés A., Ángel-Moreno A., Pérez J. *Los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos en el manejo de los antimicrobianos*. Medicina Integral (2001) 38:315-22

[66] FDA. Code of Federal Regulations. (2016). *Title 21--Food and drugs. chapter I--Food and drug administration department of health and human services. Subchapter B--food for human consumption (continued). Part 172 -- Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. Subpart B--Food Preservatives. Sec. 172.177 Sodium nitrite used in processing smoked chub*. Obtenido el 21 de julio de 2017 de <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.177>.

[67] Peláez T., Cercenado E., Alcalá L., Marín M., Martín-López A, Martínez-Alarcón J., Catalán P., Sánchez-Somolinos M., Bouza E. *Metronidazole Resistance in Clostridium difficile Is Heterogeneous*. Journal of Clinical Microbiology. 46 (2008). 3028-3032

[68] Owen T. *Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna, Conceptos básicos*. Agilent Technologies (2000)

[69] Yaol., Jiang Y., Shi J., Tomas-Barberan F., Datta N., Singanusong R., Chen S. *Flavonoids in food and their health benefits*. *Plant foods for human nutrition* (2004)59: 113–122.

[70] Wiley B., Sun Y., Mayers B., Xia Y. *Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The case of silver*. *Chem. Eur. J.* 11 (2005) 454 – 463.

[71] García-Sánchez J., García-Sánchez E. García- García M. *Estudios de sensibilidad en bacterias anaerobias*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 32 (2014). 23-29.

ANEXOS

ANEXO 1: Certificado taxonómico de *E. polystachya*.



CERTIFICADO DE IDENTIDAD TAXONÓMICA

Fecha y lugar de expedición: Tlaxcala, Tlax. a 01 de marzo de 2016
Número de registro interno: UAT/01/Palo dulce/2016
Nombre de la empresa: REDMEXPLAM
Proporcionamos la certificación taxonómica de la muestra de materia vegetal con Lote No. 01SEM0 que nos hizo llegar para su determinación botánica:
NOMBRE CIENTÍFICO: *Eysenhardtia polystachya* (Ortega.) Sarg.
NOMBRE (S) COMÚN (ES): PALO DULCE, PALO AZUL
PARTE DE LA PLANTA: Partes aéreas troceadas
FAMILIA BOTÁNICA: Fabaceae

La muestra botánica de esta especie se encuentra depositada en el Jardín Botánico Universitario. Este certificado no ampara otros lotes ni muestras de plantas o sus derivados.

Atentamente
"Por la cultura a la justicia social"



Biol. Miguel Ángel Gutiérrez Domínguez
Coordinador del Jardín Botánico Universitario



ANEXO 2: Pruebas de confirmación de la bacteria *Clostridium sp.*

Como primera prueba de confirmación de la cepa *Clostridium sp.*, se sembraron las bacterias en medio SPS Angelotti (MERK) (agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina) en el cual se observó crecimiento de colonias de color gris.

Como segunda prueba se realizó tinción gram a un cultivo de 5 días de incubación, en la figura 23 y 24 se muestran los resultados. Se observan bacilos gram positivos, muy poco esporulados.

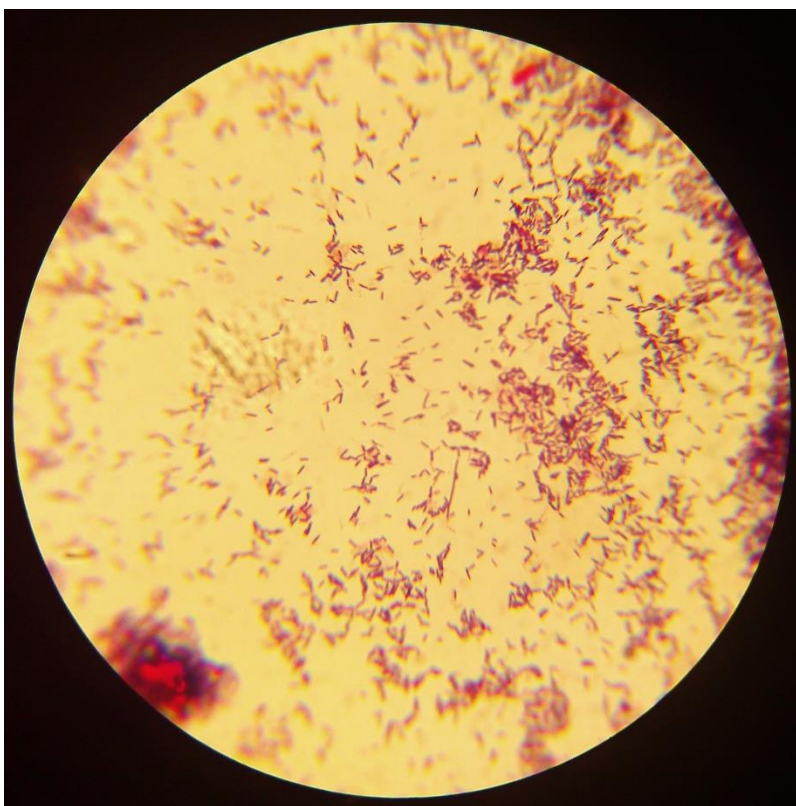


Figura 23: Tinción gram de Clostridium sp.



Figura 24: Acercamiento de la tinción gram de *Clostridium sp.*

Como otra prueba se sembró en la mitad de una placa con agar TSA (agar tripteina soya BD Bioxon) la cepa de *C. perfringens*, y en la otra mitad se sembró una cepa de *bacilo subtilis*. Esto se hizo para asegurarse de que la cepa con la que se trabajó no se tratara de un bacilo anaerobio facultativo o Aero tolerante. El resultado se muestra en la figura 24. La placa mostró muy buen crecimiento del *bacilo subtilis*, mientras que no hubo crecimiento de la cepa de *Clostridium sp.*, corroborando ser una bacteria anaerobia estricta.



Figura 25: Prueba de anaerobiosis de Clostridium sp.

ANEXO 3: Cálculos de concentración de plata para la muestra 3.

La síntesis de NPs Ag para la muestra 3 se realizó mezclando 0.3 mL de una solución de AgNO_3 a una concentración de 0.01 M con 5 mL del extracto a una dilución de 1:40. Entonces la concentración de Ag en la muestra se calculó de la siguiente manera:

PM AgNO_3 : 169.87 g/mol

PA de Ag: 107.8682 g/mol

En 1L a concentración 0.01 M hay 0.01 mol de AgNO_3

Como en 1 mol de AgNO_3 hay 1 mol de Ag

Entonces en 300 μL $\left(\frac{0.01 \text{ mol}}{1000000 \mu\text{L}}\right) = 3 \times 10^{-6}$ mol de Ag ($\div 5.3 \text{ mL}$) = 5.66×10^{-7} mol/mL de Ag

$$\begin{aligned} 5.66 \times 10^{-7} \text{ mol/mL} \left(\frac{107.8682 \text{ g}}{1 \text{ mol}}\right) &= 6.1 \times 10^{-5} \frac{\text{g}}{\text{mL}} \text{ de Ag} \\ &= 61 \mu\text{g /mL de Ag} \end{aligned}$$

A partir de esta concentración se calcularon las concentraciones de las diluciones de plata para pruebas de CMI y CML.