



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS  
CON MUCÍLAGO DE LINAZA (*Linum usitatissimum* L.)

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

VANESSA CORIA CABALLERO

ASESORA:

DRA. MA. GUADALUPE GARNICA ROMO

Morelia, Michoacán. Agosto, 2019.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo, asesora de tesis, por su paciencia, apoyo y dirección durante la realización de este trabajo.

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán, por haberme proporcionado las cepas bacterianas para poder llevar a cabo este trabajo.

Al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos de la Facultad de Químico Farmacobiología y al Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, por proporcionarme el acceso a los equipos sin los cuales no habría sido posible realizar este proyecto.

A la M.C. Janet Ileri Arenas Sánchez, por permitirme hacer uso del producto de su investigación.

A mis compañeros del LIDA: Eunice, Osvaldo, Esther y Carla; por su ayuda y sus contribuciones a este proyecto.

A mis amigos Marisol, Adriana, Elí, Lupita, Flavio, Eva, Esaú, y Kido, por apoyarme y confiar en mí siempre.

A mi familia, por su apoyo, comprensión y amor.

## DEDICATORIA

A mi papá, por su incansable esfuerzo para que yo pudiera  
estudiar mi carrera y realizar este trabajo de tesis

A mi mamá, por todo su apoyo, comprensión y cariño

A mis hermanas, por ser mi sonrisa de cada día

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACIONES.....	10
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1. SEMILLA DE LINAZA.....	16
2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LINAZA.....	16
2.3. MUCÍLAGO DE LINAZA.....	17
3. PLATA.....	18
3.1. NITRATO DE PLATA.....	19
3.2. NITRITO DE PLATA.....	19
3.3. ÓXIDO DE PLATA.....	20
4. SOLUCIONES COLOIDALES.....	20
4.1. SOLUCIONES.....	20
4.2. COLOIDES.....	20
4.2.1. PROPIEDADES DE LOS COLOIDES.....	21
4.2.1.1. EFECTO TYNDALL.....	21
4.2.1.2. MOVIMIENTO BROWNIANO.....	22
4.2.1.3. EFECTO DE LA CARGA.....	22
4.3 SUSPENSIONES.....	23
5. BACTERIAS DE IMPORTANCIA MÉDICA.....	24
5.1. ESTRUCTURA BACTERIANA.....	25
5.1.1. ESTRUCTURAS CITOPLÁSMICAS.....	25
5.1.2. PARED CELULAR.....	26
5.2. BACTERIAS GRAMPOSITIVAS.....	29
5.3. BACTERIAS GRAMNEGATIVAS.....	31
5.4. FAMILIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....	34
5.4.1. <i>Escherichia coli</i> .....	35
5.5. GÉNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> .....	36

5.5.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
5.6. GÉNERO <i>PSEUDOMONAS</i> .....	39
5.6.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	41
5.7. ANTIMICROBIANOS.....	43
5.7.1. DEFINICIONES.....	43
5.7.2. MODOS DE ACCIÓN.....	43
5.8. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	45
5.8.1. MÉTODO DE DILUCIÓN.....	45
5.8.2. MÉTODO DE DIFUSIÓN.....	46
5.9. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA.....	47.
6. ACCIÓN BACTERICIDA DE LAS Ag-NPs.....	49
7. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS POR AUTORES.....	52
8. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	54
8.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X POR CRISTALES.....	54
8.1.1. LEY DE BRAGG.....	55
8.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN POLVO.....	56
8.2.1. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE CRISTAL.....	57
8.3. TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	59
8.4. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	60
8.4.1. ABSORCIÓN ÓPTICA.....	63
8.5. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE.....	65
8.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	66
9. JUSTIFICACIÓN.....	69
10. HIPÓTESIS.....	70
11. OBJETIVOS.....	70
11.1. OBJETIVO GENERAL.....	70
11.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	70
12. METODOLOGÍA.....	71
12.1. REACTIVOS Y MATERIALES.....	71
12.2. EQUIPOS DE TRABAJO.....	71
12.3. EXTRACCIÓN DEL MUCÍLAGO DE LINAZA.....	72

12.4. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	72
12.5. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN.....	73
12.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	74
12.6.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO.....	75
12.6.2. DETERMINACIÓN DE CMI Y CMB.....	76
13. RESULTADOS.....	78
13.1. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN.....	78
13.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	94
14. CONCLUSIONES.....	107
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del tegumento de la semilla de linaza.....	17
Figura 2. Efecto Tyndall.....	22
Figura 3. Movimiento Browniano.....	22
Figura 4. Efecto de carga en una partícula coloidal.....	23
Figura 5. Pared celular de bacterias grampositivas y gramnegativas.....	29
Figura 6. Envoltura de una bacteria grampositiva.....	30
Figura 7. Envoltura de una bacteria gramnegativa.....	32
Figura 8. Estructura antigénica de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	36
Figura 9. Tinción de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
Figura 10. Tinción de Gram de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
Figura 11. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar Müeller-Hinton.....	42
Figura 12. Mecanismos de acción antibacteriana de NPs-Ag.....	51
Figura 13. Difracción de rayos X para cristales.....	56
Figura 14. Efecto de tamaño de partícula en las curvas de difracción.....	58
Figura 15. Diafragma de funcionamiento del equipo tamaño de partícula.....	59
Figura 16. Modos de vibración por absorción infrarroja.....	61
Figura 17. Interferómetro de Michelson.....	62
Figura 18. Proceso de absorción de un metal.....	64
Figura 19. Funcionamiento del espectrofotómetro UV-Vis.....	66
Figura 20. Esquema del volumen de interacción y señales producidas.....	68
Figura 21. Nitrato de plata 5mM; Mucílago de linaza hidratado; Solución acuosa Ag/Mucílago.....	72
Figura 22. Nanopartículas secadas a 100 °C, 450 °C y 500 °C.....	73
Figura 23. Cepas de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> .....	74
Figura 24. Espectro UV-Vis de solución acuosa Ag/mucílago de linaza.....	78
Figura 25. Espectro FTIR de mucílago de linaza en polvo.....	79
Figura 26. Espectro FTIR de muestra tratada a 100 °C.....	80
Figura 27. Espectro FTIR de muestra tratada a 450 °C.....	81
Figura 28. Espectro FTIR de muestra tratada a 500 °C.....	82

Figura 29. Difractograma de muestra tratada a 100 °C.....	83
Figura 30. Difractograma de muestra tratada a 450 °C.....	84
Figura 31. Difractograma de muestra tratada a 500 °C.....	85
Figura 32. Tamaño de partícula en muestra N100.....	86
Figura 33. Tamaño de partícula en muestra N450.....	87
Figura 34. Tamaño de partícula en muestra N500.....	88
Figura 35. Micrografía MEB de mucílago de linaza y muestra tratada a 100 °C.....	89
Figura 36. Micrografía MEB de muestra tratada a 450 °C.....	90
Figura 37. Micrografía MEB de muestra tratada a 500 °C.....	91
Figura 38. Microanálisis elemental de mucílago de linaza en polvo.....	92.
Figura 39. Microanálisis elemental de muestra N100.....	92
Figura 40. Microanálisis elemental de muestra N450.....	93
Figura 41. Microanálisis elemental de muestra N500.....	93
Figura 42. Gráfica de halos de inhibición promedio obtenidos por difusión en disco para <i>Escherichia coli</i> .....	94
Figura 43. Gráfica de halos de inhibición promedio obtenidos por difusión en disco para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	95
Figura 44. Gráfica de halos de inhibición promedio obtenidos por difusión en disco para <i>Staphylococcus aureus</i> .....	96
Figura 45. CMI sobre <i>Escherichia coli</i> .....	97
Figura 46. CMI sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	98
Figura 47. CMI sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	99
Figura 48. CMI de la muestra N100 sobre los microorganismos ensayados.....	100
Figura 49. CMB sobre <i>Escherichia coli</i> .....	101
Figura 50. CMB sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	102
Figura 51. CMB sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	103
Figura 52. CMB de la muestra N100 sobre los microorganismos ensayados.....	104

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de tipos de soluciones.....	20
Tabla 2. Tipos de coloides y ejemplos.....	21
Tabla 3. Comparación de soluciones, coloides y suspensiones.....	24
Tabla 4. Estructura de la membrana bacteriana.....	27
Tabla 5. Características de la membrana de las bacterias grampositivas y gramnegativas.....	31
Tabla 6. Halos de inhibición promedio y porcentajes de inhibición obtenidos por difusión en disco para <i>Escherichia coli</i> .....	95
Tabla 7. Halos de inhibición promedio y porcentajes de inhibición obtenidos por difusión en disco para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	96
Tabla 8. Halos de inhibición promedio y porcentajes de inhibición obtenidos por difusión en disco para <i>Staphylococcus aureus</i> .....	97

## LISTA DE ABREVIACIONES

- Ag<sup>0</sup>: Plata metálica
- AgNO<sub>2</sub>: Nitrito de plata
- AgNO<sub>3</sub>: Nitrato de plata
- AgNPs: Nanopartículas de plata
- Ag<sub>2</sub>O: Óxido de plata
- ALA: Ácido α-linolénico
- ARNm: ARN mensajero
- ARNr: ARN ribosomal
- CMB: Concentración mínima bactericida
- CMI: Concentración mínima inhibitoria
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DRX: Difracción de rayos X
- E. coli*: *Escherichia coli*
- EDS: Espectroscopía por dispersión de energía
- EDTA: Ácido etilendiamino-tetraacético
- FTIR: Infrarrojo con transformada de Fourier
- IR: Infrarrojo
- LPS: Lipopolisacárido
- MEB: Microscopía electrónica de barrido
- mM: Micromolar
- N100: Muestra secada a 100 °C
- N450: Muestra calcinada a 450 °C
- N500: Muestra calcinada a 500 °C
- NaOH: Hidróxido de sodio

*P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa*

PABA: Ácido para-aminobenzoico

PBP: Proteína de unión a penicilina

RNA: Ácido ribonucleico

*S. aureus: Staphylococcus aureus*

TP: Tamaño de partícula

UV-Vis: Ultravioleta-Visible

## RESUMEN

En el presente trabajo, se logró sintetizar nanopartículas de plata (Ag-NPs, por sus siglas en inglés) con mucílago de linaza (*Linum usitatissimum* L.) liofilizado. Para ello, se hidrató el mucílago, se alcalinizó con NaOH y se filtró. La reacción de síntesis se llevó a cabo utilizando el mucílago preparado y nitrato de plata 5 mM. La solución obtenida se mantuvo en agitación a 65 °C durante 60 minutos, dicha solución tomó un color marrón, que indicó la formación de las Ag-NPs. En seguida, se secó la muestra a 100 °C para obtener un polvo de color café oscuro. Posteriormente, la muestra se calcinó a 450 °C y a 500 °C y se obtuvo un polvo fino de coloración grisácea. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron por medio de espectroscopía UV-Vis, difracción de Rayos X, espectroscopía de Infrarrojo, análisis de tamaño de partícula en Nanosizer, microscopía electrónica de barrido y espectroscopía por dispersión de energía. Adicionalmente, se determinó la actividad antibacteriana de las Ag-NPs en cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*; por la técnica de difusión en disco. Así como la determinación de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de las Ag-NPs.

La solución coloidal Ag/mucílago presentó dos tamaños de partícula: alrededor de 10 nm y 50 nm, la muestra secada a 100 °C conservó dichos tamaños de partícula; mientras que las muestras calcinadas presentaron partículas con tamaños mayores a 100 nm. Se determinó la presencia de grupos funcionales presentes en azúcares y compuestos fenólicos del mucílago; en la muestra secada a 100 °C, se analizó la presencia de estos mismos grupos, así como enlaces nuevos entre el carbono y el nitrógeno; por otro lado, en las muestras calcinadas aparecieron únicamente los enlaces C-N. Se observó que la actividad antibacteriana fue dependiente del tamaño de partícula en las muestras, siendo la muestra N100 la que mayor efecto bactericida mostró. Asimismo, los microorganismos tuvieron variación en cuanto a la sensibilidad que presentaron ante las Ag-NPs; de este modo, se encontró que *E. coli* fue la más sensible, seguida de *P. aeruginosa* y, finalmente, *S. aureus*.

Palabras clave: Nanopartículas, plata, mucílago, DRX, FTIR, MEB, antibacteriana, CMI, CMB, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

## ABSTRACT

In the present assignment work, it was possible to synthesize silver nanoparticles (Ag-NPs) with lyophilized flaxseed mucilage (*Linum usitatissimum* L.) by green synthesis. For this, the mucilage was hydrated, alkalized with NaOH and filtered. The synthesis reaction was carried out using the prepared mucilage and 5 mM silver nitrate. The obtained solution was kept under stirring at 65 °C for 60 minutes, the solution took on a brown color, which indicated the formation of the silver nanoparticles. Next, the sample was dried at 100 °C to obtain a dark brown powder. Subsequently, the sample was calcined at 450 °C and at 500 °C to obtain a fine powder of grayish coloration. The nanoparticles obtained were characterized by UV-Vis spectroscopy, X-ray diffraction, Infrared spectroscopy, particle size analysis in Nanosizer, Scanning electron microscopy and Energy dispersion spectroscopy. Additionally, the antibacterial activity of Ag-NPs was determined in strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*; by disk diffusion technique. Also the determination of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration Ag-NPs.

The colloidal Ag / mucilage solution had two particle sizes: around 10 nm and 50 nm, the sample dried at 100 °C shared those particle sizes; while the calcined samples presented particles with sizes larger than 100 nm. The presence of functional groups present in sugars and phenolic compounds of the mucilage was determined; in the sample dried at 100 °C, the presence of these same groups was analyzed, as well as new bonds between carbon and nitrogen; On the other hand, only the C-N bonds appeared in the calcined samples. It was observed that the antibacterial activity was dependent on the particle size in the samples, with the N100 sample having the best bactericidal effect. Likewise, the microorganisms had variation in terms of the sensitivity they presented to the Ag-NPs; thus, *E. coli* was found as the most sensitive, followed by *P. aeruginosa* and, finally, *S. aureus*.

Keywords: Nanoparticles, silver, mucilage, DRX, FTIR, MEB, antibactericide, CMI, CMB, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La nanociencia y la nanotecnología son disciplinas nuevas; que surgieron en las últimas décadas, al desarrollar tecnologías capaces de visualizar partículas de tamaños nanométricos. La Nanotecnología se define, según Cardoso (2016), como la producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y tamaño de materiales en la escala nanométrica. Esta escala comprende el nivel atómico de alrededor de 0.2 nm hasta aproximadamente 100 nm.

Debido al auge en la producción de nanomateriales, por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, que difieren de las propiedades del material en escala normal; se desarrollaron muchas técnicas para sintetizar nanopartículas metálicas. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas se basa en el uso de reactivos o tecnologías que repercuten en la salud y el medio ambiente; por dicha razón, se ha propuesto una técnica nueva que tiene un impacto ambiental amigable, además de ser más simple y de bajo costo: la síntesis verde o biosíntesis. Esta técnica se lleva a cabo utilizando hongos y extractos de plantas como agentes reductores.

El mucílago de linaza está formado por dos polisacáridos, compuestos principalmente por xilosa y ramnosa. Es bien conocido que los azúcares son buenos agentes reductores por la capacidad del grupo aldehído o cetona para oxidarse. Esto constituye la posibilidad de que el mucílago tenga interacciones electrostáticas con los iones metálicos y, por lo tanto, una estabilización de las nanopartículas de plata que se desean sintetizar.

La aplicación de las nanopartículas continúa expandiéndose en informática, catálisis química, cosméticos, medicina, síntesis de materiales, artículos de consumo (textiles, materiales para deporte, recubrimiento de vidrios), etc. (Cardoso, 2016). Por otro lado, las nanopartículas de plata se han posicionado como buenos agentes antimicrobianos frente a bacterias de importancia médica, debido a la resistencia que dichos microorganismos han desarrollado frente a los antibióticos.

Diferentes autores demuestran la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas por medio de síntesis verde con extractos de *Alternanthera dentate* (Kumar y col., 2014), *Boerhaavia diffusa* (Nakkala y col.,

2014), *Abutilon indicum* (Ashok y col., 2015) y *Cocous nucifera* (Mariselvam y col, 2014), entre otros.

En esta tesis se reporta la obtención de nanopartículas de plata por la técnica de síntesis verde, recurriendo al mucílago de linaza liofilizado en solución acuosa como agente reductor. Además de la caracterización estructural y morfológica de dichas nanopartículas, por medio de espectroscopía UV-Vis, difracción de Rayos X, espectroscopía de Infrarrojo, análisis de tamaño de partícula en Nanosizer, microscopía electrónica de barrido y espectroscopía por dispersión de energía. Así como su actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; por las técnicas: difusión en disco, concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. SEMILLA DE LINAZA

La linaza o semilla del lino (*Linum usitatissimum L.*) es rica en compuestos que se sabe, proporcionan beneficios a la salud humana (ácido  $\alpha$ -linolénico, lignanos y polisacáridos diferentes al almidón).

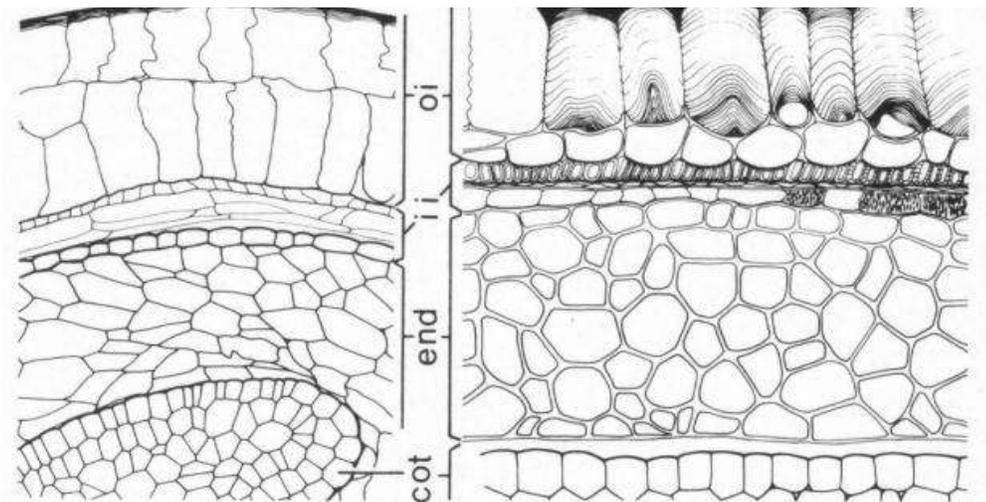
La semilla de linaza es de 4 a 6 mm de longitud, aplanada, de forma oval y con un extremo aguzado. La cubierta de la semilla es de apariencia suave y brillante, y su color puede variar entre marrón oscuro y amarillo claro. El peso de 1000 semillas es de  $(5\pm 1)$  g y su peso del hectolitro fluctúa entre 55 y 70 kg (Daun y col., 2003; Oomah, 2003). La semilla tiene dos cotiledones aplanados, que constituyen la mayor proporción del embrión; este último está rodeado por las cubiertas de la semilla y por una delgada capa de endosperma. La testa tiene una capa exterior que contiene la mayoría de la fibra soluble y dos interiores ricas en fibra y lignanos. Desde un punto de vista estructural, la testa, endosperma y cotiledones representan el 22%, 21% y 57 %, respectivamente (Daun y col., 2003; Oomah, 2003; Wiesenborn y col., 2003). Existen variedades de semillas de color amarillo o doradas y de color marrón; a pesar de la creencia de que el color externo de la semilla es un indicador de la composición química de la linaza, no se han encontrado variaciones que sustenten que haya una diferencia entre ellas más allá de las causadas por las condiciones de cultivo (Daun y col., 2003; Morris y Vaisey-Genserb, 2003).

### 2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LINAZA

La linaza tiene alrededor de 40% de lípidos, 30% de fibra dietética y 20 % de proteína. La composición proximal varía considerablemente entre las variedades y de acuerdo a las condiciones ambientales en las que haya crecido la planta. En los cotiledones se encuentra el 87% de los lípidos y el 76% de la proteína de la semilla, en tanto que en el endosperma está sólo el 17% de los lípidos y el 16% de la proteína (Figura1) (Babu y Wiesenfeld, 2003; Daun y col., 2003; Oohma, 2003). La linaza es una semilla oleaginosa, fuente importante de ácidos grasos omega 3, especialmente  $\alpha$ -linolénico (ALA) que puede constituir hasta el 52% del total de ácidos grasos; de compuestos fenólicos conocidos como lignanos; de una goma

coloidal y de proteína de buena calidad. Estos compuestos, aunque están ubicados en diferentes partes de la semilla, interactúan entre sí durante la extracción y el procesamiento, lo que plantea grandes desafíos para su utilización (Oomah, 2003; Hall y col, 2006).

La linaza tiene, en las capas externas de la semilla, una gran cantidad de fibra dietética (28% de su peso), con una relación de 75% de fibra insoluble y 25 % de fibra soluble o mucílago.



oi= integumento externo; end= endospermo; cot= cotiledones.  
Figura 1. Estructura del tegumento de la semilla de linaza.  
(Figueroa y col., 2008)

### 2.3. MUCÍLAGO DE LINAZA

El mucílago de linaza es un material semejante a una goma, está asociado a la cáscara del grano y está constituido por polisacáridos ácidos y polisacáridos neutros. Las condiciones óptimas para la extracción de la goma son: agua entre 85°C y 90 °C a pH 6.5 a 7.0 y con una relación agua: semilla de 13:1. La suspensión se liofiliza o se seca por atomización, obteniéndose rendimientos de 13% a 14 %. La goma de linaza tiene buena capacidad espumante, estabilidad, resistencia a la presencia de sales y viscosidad estable en un amplio rango de pH (Hall y col, 2006).

El mucílago está compuesto por dos polisacáridos, uno neutro (aproximadamente 75%) y otro ácido. El polímero neutro está formado por una cadena central de  $\beta$ -D-xilosa unidas con enlaces 1-4, que tiene cadenas laterales de

arabinosa y galactosa en posición 2 y 3. El polímero ácido está formado por una cadena principal de residuos de (1→2)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil y de ácido (1→4)-D-galactopiranosilurónico, con cadenas laterales de fucosa y galactosa. El componente principal del polímero neutro es la xilosa (62.8%) y el del polímero ácido es la ramnosa (54.5%), por lo que la relación ramnosa/xilosa se usa frecuentemente para estimar la relación entre polisacáridos ácidos/neutros. Esta relación fluctúa entre 0.3 y 2.2.

### 3. PLATA

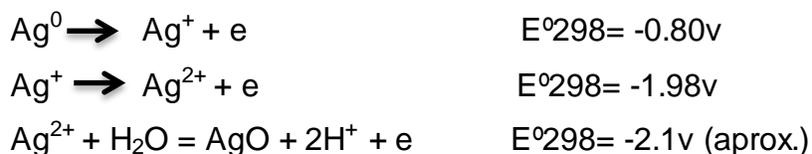
La plata cuyo número atómico es 47, con un peso atómico 107.880, está en el grupo I de la tabla periódica y el subgrupo B que contiene además al Cobre y el Oro. Una característica importante de la plata proviene del hecho de que la capa electrónica d es incompleta. Este atributo le confiere diversas propiedades como son: su coloración, la capacidad para formar compuestos paramagnéticos, poseer actividad catalítica y, en especial, una gran tendencia a formar iones complejos (Chang, 2010). Su número de valencia es +1. Los isótopos naturales son 107 (51.35%) y 109 (48.65%).

La plata tiene una red cristalina cúbica de caras centradas con un parámetro de red de 4.0774 Å, a 18 ° C. La plata es el más reflejante de todos los metales y tiene la más alta reflectividad óptica. Se utiliza principalmente para fotografía galvanoplastia, aleaciones industriales, materiales fotosensibles, etc. Pero su uso es más amplio como nanopartículas en la industria alimenticia, farmacéutica y clínica por sus propiedades antibactericidas y antifúngicas. En la industria alimenticia se aplica en recubrimientos para varias frutas que tienen una vida de anaquel muy corta, dando así su efecto bactericida y antifúngico (Sandoval-Muñoz, 2017). En el ámbito médico, existen apósitos para heridas, instrumental quirúrgico, soluciones tópicas y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con nanopartículas de plata (AgNPs) para así evitar el crecimiento bacteriano.

Las constantes físicas de la plata son: punto de fusión 960.50 ° C (este es uno de los puntos fijos básicos de la escala internacional de temperatura); punto de ebullición de 1950 ° C. La plata es muy resistente a la oxidación atmosférica

cualquiera que sea el contenido de humedad, y resiste a la corrosión por los ácidos diluidos (con excepción del ácido nítrico). Se disuelve con facilidad en el ácido nítrico, y con ayuda de calor, en el ácido sulfúrico concentrado. La plata forma haluros, los cuales, con excepción del fluoruro, son insolubles en agua. La resistencia de la plata a los halógenos secos es buena (Perry, 1980).

El número de valencia usual de la plata es +1, pero se conoce el número de valencia +2 (argéntico) y se ha referido la existencia en solución de la plata con un número de valencia +3. Los potenciales de electrodo normales de los estados de valencia son:



Se ha demostrado que el ion divalente de plata puede ser producido en una solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ).

### 3.1. NITRATO DE PLATA

El nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), de peso molecular 169.89, es la sal más importante de plata y es la materia de partida para la preparación de casi todos los demás compuestos de plata. Se obtiene disolviendo la plata en ácido nítrico y evaporando la solución. Los cristales rómbicos incoloros se separan por enfriamiento. Esta sal se funde a  $212^\circ\text{C}$ , y da un líquido incoloro. Por enfriamiento cristaliza en el sistema trigonal. Calentada la sal fundida, se descompone principalmente en nitrito y oxígeno y finalmente en plata y óxido de nitrógeno (Perry, 1980).

### 3.2. NITRITO DE PLATA

El nitrito de plata ( $\text{AgNO}_2$ ), de peso molecular 153.89, se prepara por precipitación de una solución de nitrato de plata con nitrito de sodio. Se descompone por ebullición en el agua y por calentamiento a  $140^\circ\text{C}$  (Perry, 1980).

### 3.3. ÓXIDO DE PLATA

El óxido de plata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ), de peso molecular 231.76, es un polvo. El compuesto libera oxígeno por calentamiento, la descomposición completa es a 300-340 °C.

## 4. SOLUCIONES COLOIDALES

### 4.1. SOLUCIONES

Las soluciones son mezclas homogéneas, formadas por un soluto y un solvente. Regularmente el soluto suele encontrarse en menor cantidad aunque no siempre es así. Una característica importante en las soluciones es que el soluto se encuentra distribuido uniformemente en la solución y no sedimenta con el tiempo. Las soluciones más comunes son las acuosas (el solvente es el agua), sin embargo, el soluto y el solvente de las soluciones puede presentarse en cualquier estado (sólido, líquido o gas). Algunos ejemplos los encontramos en la tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de tipos de soluciones.

<b>Soluto</b>	<b>Solvente</b>	<b>Solución</b>	<b>Ejemplo</b>
Gas	Gas	Gas	Aire ( $\text{O}_2$ en $\text{N}_2$ )
Gas	Líquido	Líquido	Refrescos ( $\text{CO}_2$ en agua)
Líquido	Líquido	Líquido	Vino (etanol en agua)
Líquido	Sólido	Sólido	Empastes dentales (Hg líq. en plata sólida)
Sólido	Líquido	Líquido	Salmuera ( $\text{NaCl}$ en agua)
Sólido	Sólido	Sólido	Acero (carbono en hierro)

(Universidad de Alcalá, 1993)

### 4.2. COLOIDES

Los coloides son sistemas heterogéneos en el que las fases no se separan. El tamaño de las partículas coloidales va desde 1 nanómetro (nm) hasta 100 nm. Los coloides que están formados por partículas coloidales en agua se denominan hidrocoloides. Estos pueden tomar la forma de sol o gel. En la forma sol presenta

características de una solución común y en la forma gel sus características son más parecidas a un sólido. Existen hidrocoloides reversibles, que pueden estar en cualquiera de los dos estados o alternar.

Los coloides en los cuales un líquido o sólido se encuentra disperso en un gas se conocen como aerosoles, ejemplo de esto es la niebla o el humo. En la tabla 2 se muestran los tipos de coloides y ejemplos de ellos.

Tabla 2. Tipos de coloides y ejemplos.

Fase dispersa	Fase dispersante	Nombre común	Ejemplos
Sólido	Sólido	Sol sólido	Algunas aleaciones (como acero y duraluminio), plásticos pigmentados.
Líquido	Sólido	Emulsión sólida	Queso, mantequilla, jaleas.
Gas	Sólido	Espuma sólida	Goma, esponja, piedra pómez.
Sólido	Líquido	Soles y geles	Leche de magnesio, pinturas.
Líquido	Líquido	Emulsión	Leche, mayonesa.
Gas	Líquido	Espuma	Espuma de afeitar, crema batida.
Sólido	Gas	Aerosol sólido	Humo.
Líquido	Gas	Aerosol líquido	Niebla, nubes,

(Universidad de San Carlos: Guatemala, 2005)

#### 4.2.1. PROPIEDADES DE LOS COLOIDES

##### 4.2.1.1. EFECTO TYNDALL

Una solución coloidal, por lo general, a simple vista se ve opalescente pero no se distinguen las partículas coloidales. El efecto Tyndall es un fenómeno físico, en el cual, al hacer pasar un haz de luz a través de una solución coloidal permite que las partículas sean visibles al dispersar la luz (figura 2). Un ejemplo claro de esto es cuando un rayo de sol entra en una habitación oscura se observan pequeñas partículas suspendidas en el aire que sin ese rayo no podríamos ver.

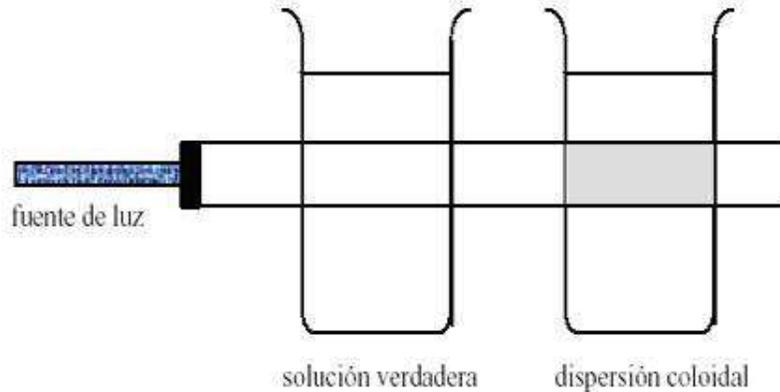


Figura 2. Efecto Tyndall. (Saber de ciencias, S. F.)

#### 4.2.1.2. MOVIMIENTO BROWNIANO

Las partículas coloidales tienen continuamente movimientos que son irregulares (movimiento Browniano), los cuales dependen de los choques de las moléculas del disolvente contra las partículas de la fase dispersa (figura 3). De este movimiento depende, en parte, la estabilidad de la solución ya que representa una fuerza de repulsión entre las partículas y por lo tanto resisten la precipitación (Jiménez-Vargas, 1979).

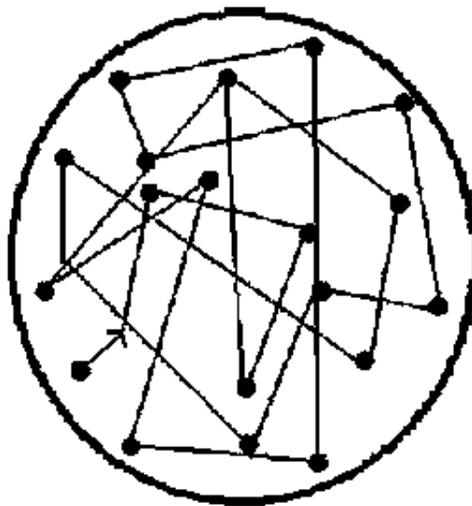


Figura 3. Movimiento Browniano.

(<http://genesis.uag.mx/edmedia/material/quimicaII/sisdisper.cfm>)

#### 4.2.1.3. EFECTO DE LA CARGA

Una partícula coloidal puede adherir a partículas con carga eléctrica en su superficie (iones), las cuales pueden ser positivas o negativas. En un inicio la atracción del coloide negativo hará que se adhieran iones positivos alrededor de él, esta capa de contra iones es conocida como capa de Stern. Adicionalmente iones positivos son atraídos por el coloide negativo pero rechazados por la capa Stern. Los contra iones tendrán una alta concentración cerca de la superficie que disminuye con la distancia hasta lograr un equilibrio en el seno de la solución.

De manera similar, pero opuesta en carga, en la capa difusa hay déficit de iones negativos (co-iones) y su concentración aumenta al alejarse del coloide. De esta manera, la densidad de carga es mayor cerca del coloide y conforme se aleja se alcanza un equilibrio entre las cargas negativas y positivas (Jiménez-Vargas, 1979).

Estas interacciones entre las partículas coloidales y los iones en solución son importantes ya que si disminuye la barrera de esta interacción se llegan a aglomerar las partículas. En la figura 4, se muestra la interacción de una partícula coloidal con los iones en solución y las capas que se forman.

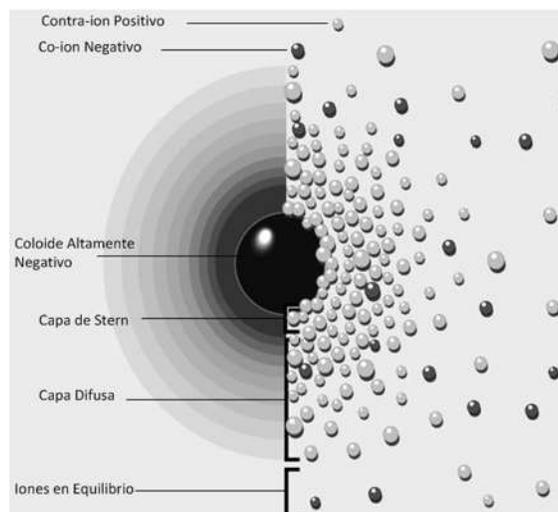


Figura 4. Efecto de carga en una partícula coloidal.  
(<http://apuntescientificos.org/preparacion-colo-qbp.html>).

#### 4.3. SUSPENSIONES

En las suspensiones el tamaño de partícula es mayor a 100 nm por lo cual sedimenta en reposo, distinguiéndose dos fases, decimos entonces que es una mezcla heterogénea. Como ejemplo se puede mencionar una mezcla de agua y arena, al dejar en reposo después de agitación se observa que se separa en dos fases.

En la tabla 3 se pueden observar las diferencias entre soluciones, coloides y suspensiones.

<b>Propiedad</b>	<b>Solución</b>	<b>Coloide</b>	<b>Suspensión</b>
Tamaño de partícula	0.1 – 1.0 nm	1 – 100 nm	>100 nm
Homogeneidad	Homogénea	En el límite	Heterogénea
Sedimentación	No sedimenta	No sedimenta	Sedimenta en reposo
Filtrabilidad	Pasa a través del papel filtro ordinario	Pasa a través del papel filtro ordinario	Se separa mediante papel filtro ordinario
Dispersión de la luz	No dispersa la luz	Dispersa la luz	Dispersa la luz
Ejemplos	Urea	Albúmina	Glóbulos rojos

Tabla 3. Comparación de soluciones, coloides y suspensiones. (<http://genesis.uag.mx/edmedia/material/quimicall/pdf2/II.%20Sistemas%20dispersos.pdf>)

## 5. BACTERIAS DE IMPORTANCIA MÉDICA

Durante la mayor parte de la existencia de la humanidad, las enfermedades infecciosas han sido la causa predominante de enfermedad y de muerte, que no solo han restringido el bienestar de las personas sino que, además, han cercenado la prosperidad social. Recién en el siglo XX las mejoras en las condiciones de vida, la sanidad y las intervenciones médicas lograron que las sociedades desarrolladas emergieran de la devastación provocada por las enfermedades infecciosas.

Las bacterias comprenden el mayor número de especies patógenas para los seres humanos. Son organismos unicelulares y contienen DNA y RNA, pero no están diferenciadas en núcleo y citoplasma; se reproducen por fisión binaria (Winn y col., 2008).

Las células de los animales, las plantas y los hongos son eucariotas (palabra de origen griego que significa «núcleo verdadero»), mientras que las bacterias, las *archaea* y las algas azul-verdosas son miembros de las procariotas (del griego «núcleo primitivo»). Además de carecer de núcleo y organelos, el cromosoma bacteriano se distingue del humano en varios aspectos.

Las características distintivas de las procariotas son su tamaño relativamente pequeño, casi siempre del orden de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, y la ausencia de una membrana nuclear. El DNA de casi todas las bacterias es un círculo con una longitud aproximada de 1 mm; este es el cromosoma procariótico. La mayor parte de las células procariotas posee un solo cromosoma. El tamaño tan pequeño del cromosoma procariótico limita la cantidad de información genética que puede contener (Murray y col., 2013).

La información más reciente basada en las secuencias del genoma indica que el número de genes dentro de una célula procariota varía de 468 en *Mycoplasma genitalium* a 7825 en *Streptomyces coelicolor* y que muchos de estos genes se dedican a funciones básicas como generación de energía, síntesis macromolecular y multiplicación celular. Las procariotas poseen relativamente pocos genes que permiten la adaptación fisiológica del microorganismo a su ambiente. El espectro de ambientes procarióticos potenciales es inconcebiblemente amplio, por lo que el grupo procariótico comprende a una categoría heterogénea de especialistas, cada uno adaptado a un entorno circunscrito bastante estrecho (Brooks y col., 2011).

## 5.1. ESTRUCTURA BACTERIANA

### 5.1.1. Estructuras citoplásmicas

El citoplasma de la célula bacteriana contiene ADN cromosómico, ARN mensajero (ARNm), ribosomas, proteínas y metabolitos. A diferencia del cromosoma de los eucariotes, el cromosoma bacteriano se compone de una única molécula circular de doble cadena que no está contenida en un núcleo, sino en una zona definida conocida como nucleoide. Asimismo, este cromosoma carece de histonas que mantengan la conformación del ADN y éste no forma nucleosomas. La célula

también puede poseer plásmidos, unas moléculas extracromosómicas circulares más cortas de ADN. Los plásmidos, aunque por regla general no son esenciales para la supervivencia de la célula, le proporcionan a menudo una ventaja selectiva: muchos de ellos confieren resistencia frente a uno o más antibióticos.

La ausencia de membrana nuclear simplifica las necesidades y los mecanismos de control de la síntesis de proteínas. La falta de esta membrana nuclear conlleva el acoplamiento de los procesos de transcripción y de traducción; en otras palabras, los ribosomas se fijan al ARNm y fabrican proteínas a medida que se está sintetizando el ARNm aún unido al ADN.

El ribosoma bacteriano consta de dos subunidades de 30S y 50S que forman un ribosoma 70S. Este ribosoma es distinto del ribosoma 80S (subunidades 40S y 60S) de los eucariotes. Las proteínas y el ARN del ribosoma bacteriano son muy distintos de los observados en los ribosomas de los eucariotes y constituyen un señalado objetivo de los fármacos antibacterianos.

La membrana citoplásmica posee una estructura lipídica de doble capa semejante a la observada en las membranas de los eucariotes, pero no contiene esteroides (p. ej., colesterol); una excepción a esta regla son los micoplasmas. La membrana citoplásmica lleva a cabo muchas de las funciones atribuibles a los orgánulos de los eucariotas. Entre estas tareas destacan el transporte y la producción de energía, que normalmente se realizan en las mitocondrias. Además, la membrana contiene unas proteínas de transporte que permiten la captación de metabolitos y la liberación de otras sustancias, así como bombas de iones (para mantener un potencial de membrana) y enzimas. La cara interna de la membrana se encuentra tapizada de filamentos proteicos tipo actina, los cuales participan en la determinación de la forma de la bacteria y la división celular.

#### 5.1.2. Pared celular

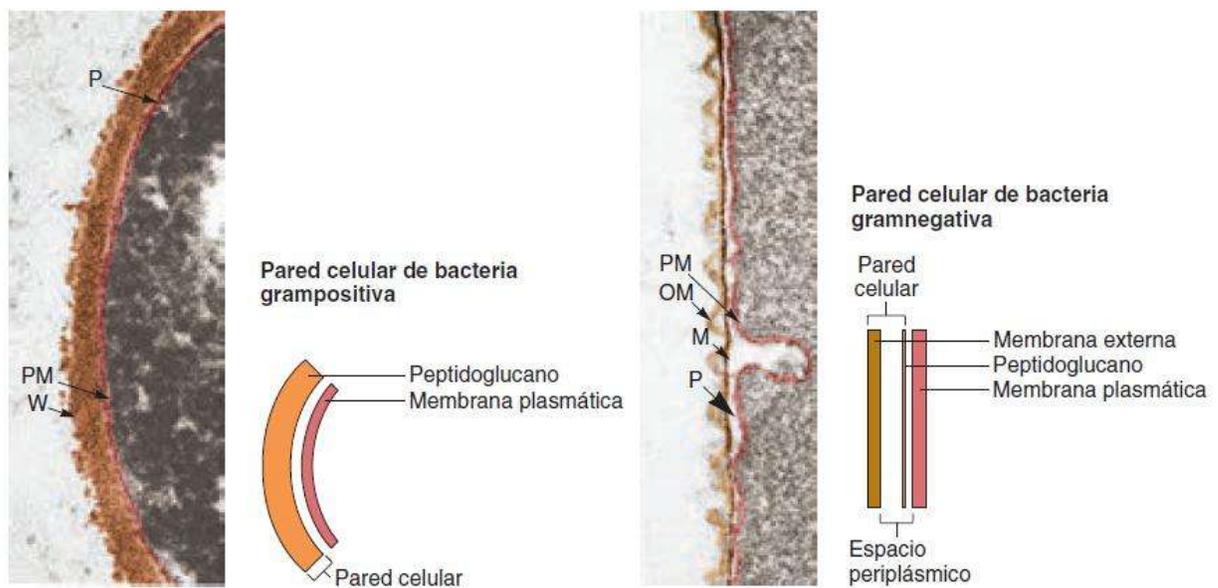
Las bacterias grampositivas se diferencian de las gramnegativas en la estructura de la pared celular (Figura 5) y en sus componentes y sus funciones (tabla 4). Los componentes de la pared celular también son exclusivos de las bacterias, y su estructura repetitiva se une a receptores de tipo toll de las células humanas para

desencadenar respuestas protectoras innatas. Las membranas citoplásmicas de la mayor parte de los procariotes están rodeadas de unas rígidas capas de peptidoglucano (mureína), salvo en los organismos *Archaea* (que contienen pseudoglucanos o pseudomureínas relacionadas con el peptidoglucano), los micoplasmas (que carecen de pared celular) y las clamidias (que no tienen peptidoglucano). El peptidoglucano es el elemento que proporciona rigidez, por lo que también determina la forma de cada célula bacteriana. Las bacterias gramnegativas están envueltas además por membranas externas (Murray y col., 2013).

<b>Estructura</b>	<b>Constituyentes químicos</b>	<b>Funciones</b>
<b>Membrana plasmática</b>	Fosfolípidos, proteínas y enzimas	Contención, generación de energía, potencial de membrana y transporte
<b>Pared celular</b>		
<b>Bacteria grampositivas</b>		
<b>Peptidoglucano</b>	Cadenas de glucanos de GlcNAc y MurNAc entrecruzados por un puente peptídico	Forma y estructura celular; protección frente al ambiente y destrucción por el complemento
<b>Ácido teicoico</b> <b>Ácido lipoteicoico</b>	Polirribitol fosfato o glicerol fosfato unido al peptidoglucano Ácido teicoico unido a lípido	Refuerza la pared celular; secuestro del ion calcio; activador de protecciones innatas del hospedador
<b>Bacterias gramnegativas</b>		
<b>Peptidoglucano</b>	Versión más delgada de la que se encuentra en las bacterias grampositivas	Forma y estructura celulares
<b>Espacio periplásmico</b>		Enzimas implicadas en el transporte, la degradación y la síntesis
<b>Membrana externa</b>		
<b>Proteínas</b>	Canal de porina	Penetración de pequeñas moléculas hidrófilas; restringe algunos antibióticos
	Dispositivos secretores	Penetra y libera proteínas a

	(tipos I, II, III, IV)	través de las membranas, incluidos factores de virulencia
<b>LPS</b>	Lipoproteína	Unión de la membrana externa al peptidoglucano
	Lípido A, polisacárido de la región central, antígeno O	Estructura de la membrana externa; potente activador de respuestas innatas del hospedador
<b>Fosfolípidos</b>	Con ácidos grasos saturados	
<b>Otras estructuras</b>		
<b>Cápsula</b>	Polisacáridos (disacáridos y trisacáridos) y polipéptidos	Antifagocítica
<b>Biopelícula</b>	Polisacáridos	Protección de la colonia frente al ambiente, antimicrobianos y respuesta del hospedador
<b>Pili</b>	Pilina, adhesinas	Adherencia, <i>pili</i> sexuales
<b>Flagelo</b>	Proteínas motoras, flagelina	Movimiento, quimiotaxia
<b>Proteínas</b>	Proteína M de estreptococos (por ejemplo)	Varias
GlcNAc, N-acetilglucosamina; LPS, lipopolisacárido; MurNAc, ácido N-acetilmurámico.		

Tabla 4. Estructuras de la membrana bacteriana. (Murray y col., 2013)



M: peptidoglucano o capa de mureína; OM: membrana externa; PM: membrana plasmática; P: espacio periplásmico; W: pared de peptidoglucano de la bacteria grampositiva.

Figura 5. Pared celular de bacterias grampositivas y gramnegativas. (Brooks y col., 2011)

## 5.2. Bacterias grampositivas

Una bacteria grampositiva posee una pared celular gruesa que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglucano (150 a 500 Å) que rodea la membrana citoplásmica (Figura 6). El peptidoglucano es un exoesqueleto en forma de malla con una función semejante a la del exoesqueleto de los insectos. Sin embargo, y a diferencia de esta última estructura, el peptidoglucano de la célula es lo suficientemente poroso como para permitir la difusión de los metabolitos a la membrana plasmática. Un nuevo modelo para los peptidoglucanos sugiere que el glucano se extiende desde la membrana plasmática a modo de púas unidas entre ellas por cortas cadenas peptídicas. El peptidoglucano es un elemento clave para la estructura, la replicación y la supervivencia de la célula en las condiciones normalmente hostiles en las que proliferan las bacterias.

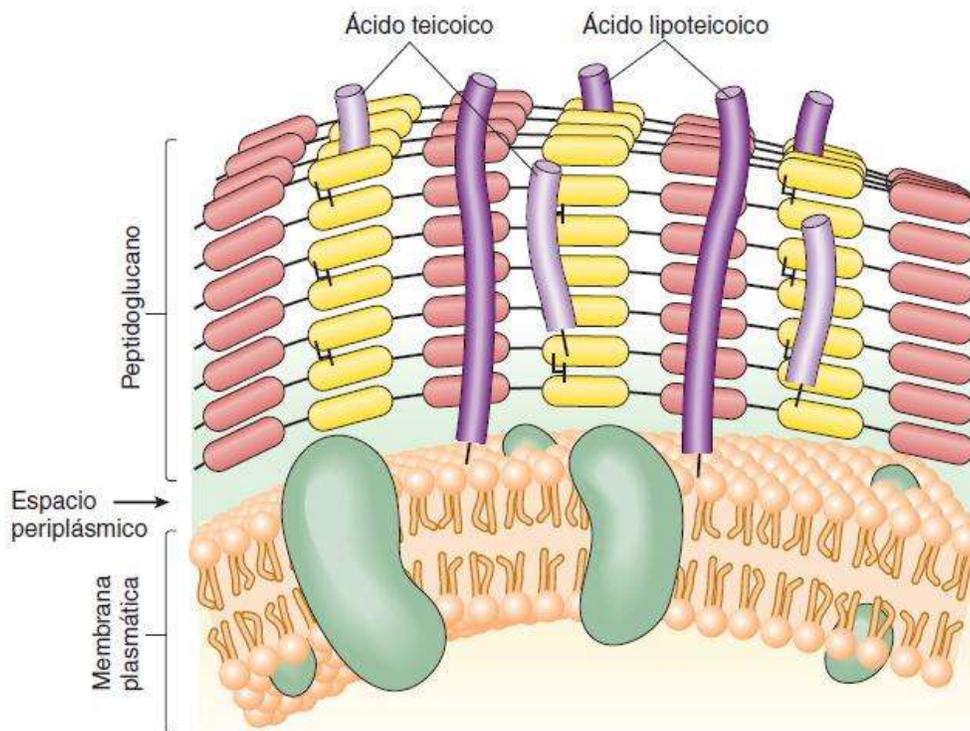


Figura 6. Envoltura de una bacteria grampositiva. (Brooks y col., 2011)

El peptidoglucano puede degradarse mediante el tratamiento con lisozima. La lisozima es una enzima presente en la mucosidad y las lágrimas del ser humano que también producen las bacterias y otros microorganismos. Esta enzima es capaz de desdoblar el esqueleto de glucano del peptidoglucano. Sin el peptidoglucano, la bacteria sucumbe a las grandes diferencias de presión osmótica existentes a uno y a otro lado de la membrana citoplásmica y experimenta un fenómeno de lisis. La eliminación de la pared celular produce un protoplasto, el cual experimenta un proceso de lisis a no ser que se estabilice osmóticamente.

La célula grampositiva puede poseer también otros componentes, como las proteínas, los ácidos teicoicos y lipoteicoicos y polisacáridos complejos (generalmente denominados polisacáridos C). La proteína M de los estreptococos y la proteína R de los estafilococos se asocian al peptidoglucano.

Los ácidos teicoicos son unos polímeros hidrosolubles de fosfatos de polioli que están unidos al peptidoglucano mediante enlaces covalentes y son fundamentales para la viabilidad celular. Los ácidos lipoteicoicos poseen un ácido graso y se encuentran unidos a la membrana citoplásmica. Estas moléculas son antígenos de superficie frecuentes que diferencian los serotipos bacterianos y favorecen la fijación a otras bacterias y a receptores específicos localizados en la superficie de las células de los mamíferos (adherencia).

Los ácidos teicoicos constituyen unos señalados factores de virulencia. Los ácidos lipoteicoicos son expulsados hacia el medio circundante y al medio intercelular del organismo hospedador y, aunque débiles, son capaces de desencadenar respuestas inmunitarias del hospedador semejantes a las de las endotoxinas.

<b>Características</b>	<b>Grampositivas</b>	<b>Gramnegativas</b>
<b>Membrana externa</b>	-	+
<b>Pared celular</b>	Gruesa	Delgada
<b>Lipopolisacárido</b>	-	+
<b>Endotoxina</b>	-	+
<b>Ácido teicoico</b>	Presente a menudo	-

<b>Esporulación</b>	En algunas cepas	-
<b>Cápsula</b>	Presente a veces	Presente a veces
<b>Lisozima</b>	Sensible	Resistente
<b>Actividad antibacteriana de la penicilina</b>	Más susceptible	Más resistente
<b>Producción de exotoxina</b>	Algunas cepas	Algunas cepas

Tabla 5. Características de la membrana de las bacterias grampositivas y gramnegativas. (Murray y col., 2013)

### 5.3. Bacterias gramnegativas

Las paredes celulares gramnegativas son más complejas (tanto desde el punto de vista estructural como químico) que las de las células grampositivas (Tabla 5). Desde el punto de vista estructural, una pared celular gramnegativa contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplásmica (Figura 7). Inmediatamente por fuera de la membrana citoplásmica se encuentra una delgada capa de peptidoglucano que representa tan sólo entre un 5% y un 10% del peso de la pared celular. Además, la pared celular gramnegativa no contiene ácidos teicoicos ni lipoteicoicos. En la parte externa de la capa de peptidoglucano se halla la membrana externa, la cual es exclusiva de las bacterias gramnegativas. La zona comprendida entre la superficie externa de la membrana citoplásmica y la superficie interna de la membrana externa se conoce como espacio periplásmico. Este espacio es un compartimento que contiene diversas enzimas hidrolíticas importantes para la degradación y metabolización por la célula de las macromoléculas de gran tamaño. Habitualmente, estas enzimas son proteasas, fosfatasas, lipasas, nucleasas y enzimas metabolizadoras de carbohidratos. En el caso de las especies bacterianas gramnegativas patógenas, muchos de los factores de virulencia líticos (p. ej., colagenasas, hialuronidasas, proteasas y  $\beta$ -lactamasa) se encuentran en el espacio periplásmico.

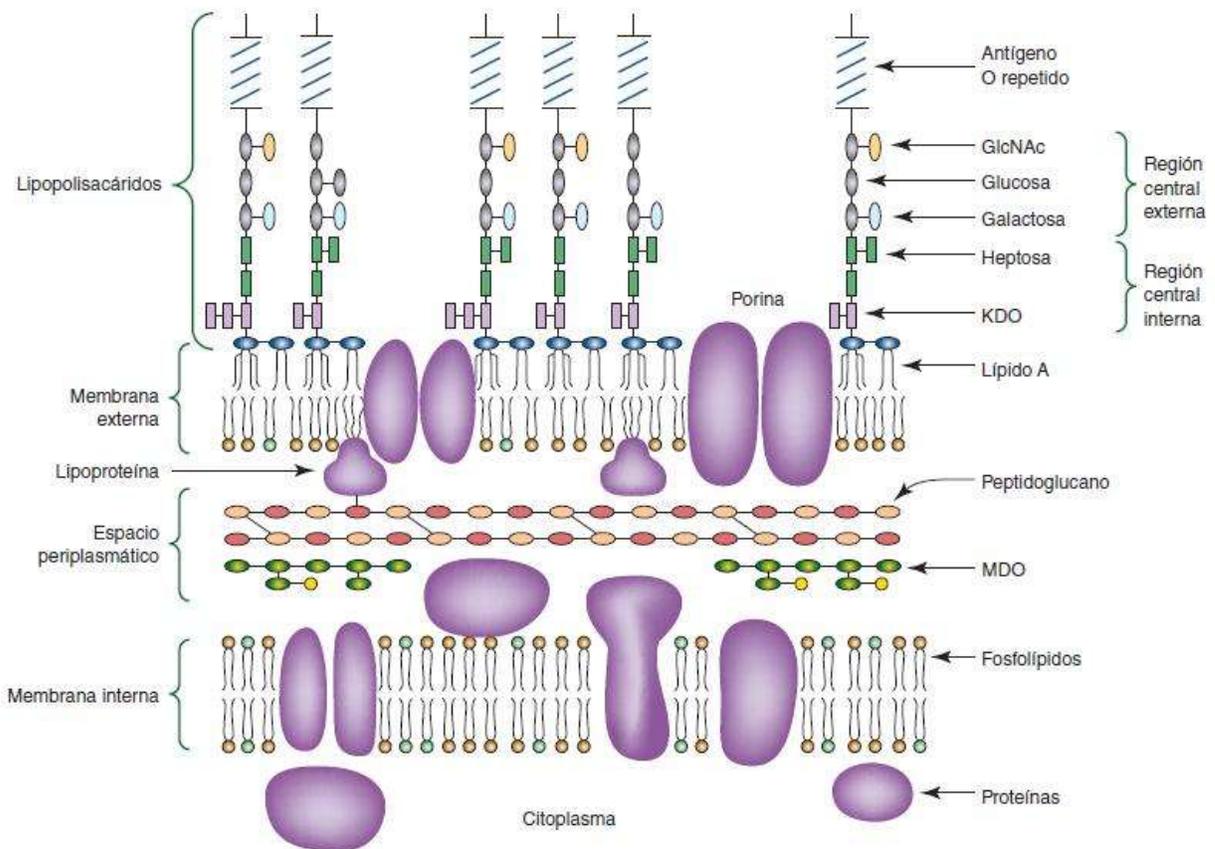


Figura 7. Envoltura de una bacteria gramnegativa. (Brooks y col., 2011)

La pared celular de los gramnegativos está atravesada también por distintos sistemas de transporte, que incluyen los dispositivos de secreción de tipos I, II, III, IV y V. Estos sistemas de transporte aportan mecanismos para la captación y liberación de distintos metabolitos y otros compuestos. La producción de dispositivos de secreción puede ser inducida durante la infección y contribuir a la virulencia del microbio al transportar moléculas que facilitan la adherencia bacteriana o la proliferación intracelular. El dispositivo de secreción III es un factor de virulencia fundamental en algunas bacterias con una estructura compleja que cruza las membranas interna y externa y puede actuar a modo de jeringa para inyectar proteínas dentro de otras células.

La membrana externa forma una especie de saco de lona rígido alrededor de la bacteria. La membrana externa mantiene la estructura bacteriana y constituye una barrera impermeable a moléculas de gran tamaño (p. ej., proteínas como la lisozima)

y moléculas hidrófobas (p. ej., algunos antimicrobianos). También ofrece protección frente a condiciones ambientales adversas (p. ej., el sistema digestivo del organismo hospedador, un factor importante en los microorganismos de *Enterobacteriaceae*). La membrana externa posee una configuración asimétrica y es una bicapa lipídica que difiere de cualquier otra membrana biológica por la estructura de su zona externa. La zona interna de esta membrana externa contiene los fosfolípidos que normalmente aparecen en las membranas bacterianas. Sin embargo, la zona externa está formada fundamentalmente por lipopolisacárido (LPS). Con excepción de las moléculas de LPS presentes en el proceso de síntesis, la zona externa de la membrana externa es la única localización donde aparecen moléculas de LPS.

Aunque la gama de proteínas presentes en las membranas externas de los gramnegativos es limitada, algunas de ellas se encuentran a una concentración elevada, con lo que el contenido proteico total es superior al que existe en la membrana citoplásmica. Muchas de estas proteínas atraviesan toda la bicapa lipídica, por lo que se habla de proteínas transmembranales. Un grupo de ellas recibe el nombre de porinas puesto que forman poros que permiten la difusión a través de la membrana de moléculas hidrófilas de menos de 700 Da de peso. El canal de la porina permite el paso de metabolitos y antimicrobianos hidrófilos de pequeño tamaño. Igualmente, la membrana externa contiene proteínas estructurales y moléculas receptoras para los bacteriófagos y otros ligandos y componentes del sistema de transporte y secreción.

La membrana externa se conecta a la membrana citoplásmica a través de unas zonas de adhesión y, por otra parte, se une al peptidoglucano por medio de una lipoproteína. Esta lipoproteína se une al peptidoglucano por un enlace covalente y también se ancla a la membrana externa. Las zonas de adhesión proporcionan una vía membranosa para el paso de los componentes recién sintetizados de la membrana externa hacia ésta.

La membrana externa se mantiene mediante enlaces catiónicos divalentes ( $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ ) formados entre los fosfatos de las moléculas de LPS y por interacciones hidrófobas entre el LPS y las proteínas existentes. Estas interacciones producen una membrana rígida y fuerte que puede verse afectada por la acción de

antibióticos (p. ej., polimixina) o mediante la eliminación de los iones de magnesio y calcio (quelación con ácido etilendiamino-tetraacético [EDTA] o tetraciclina). La alteración de la membrana externa debilita a la bacteria y favorece el paso de moléculas hidrófobas de gran tamaño. La adición de lisozima a células con una membrana externa alterada produce unos esferoplastos que, al igual que los protoplastos, son sensibles a los cambios osmóticos (Murray y col., 2013).

#### 5.4. FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE*

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos con importancia clínica. Se han descrito 50 géneros y cientos de especies y subespecies. Estos géneros se han clasificado en función de sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica, hibridación ADN-ADN y secuenciación del ARNr 16S. A pesar de la complejidad de esta familia, la mayoría de las infecciones humanas están causadas por relativamente pocas especies.

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos, se encuentran de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación y son parte de la flora intestinal normal de muchos animales, incluido el ser humano. Producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano, que incluyen un tercio de todas las bacteriemias, más del 70% de las infecciones del tracto urinario (ITU) y muchas infecciones intestinales. Algunos microorganismos (p. ej., *Salmonella* serotipo Typhi, *Shigella*, *Yersinia pestis*) se asocian siempre a enfermedad en el ser humano, mientras que otros (p. ej., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) forman parte de la microbiota comensal normal y pueden producir infecciones oportunistas. Existe un tercer grupo de enterobacterias: normalmente son microorganismos comensales, pero se pueden convertir en patógenas cuando adquieren genes de virulencia presentes en plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad.

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos gramnegativos de tamaño intermedio (0.3 a 1.0 X 1.0 a 6.0 µm). Comparten un antígeno común (antígeno común enterobacteriano), pueden ser inmóviles o móviles con flagelos peritricos (uniformemente distribuidos sobre la célula) y no forman esporas (Figura 8). Todos los miembros pueden crecer rápidamente de forma aerobia o anaerobia

(anaerobios facultativos) en varios medios no selectivos (p. ej., agar sangre) y selectivos (p. ej., agar MacConkey).

La familia *Enterobacteriaceae* tiene unos requerimientos nutricionales sencillos: fermentan la glucosa, reducen los nitratos y son catalasa-positivos y oxidasa-negativos. La ausencia de actividad de citocromo oxidasa es una característica importante, debido a que se puede determinar rápidamente mediante una sencilla prueba, y se utiliza para diferenciar a las enterobacterias de otros bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores (p. ej., *Vibrio*, *Pseudomonas*).

#### 5.4.1. *Escherichia coli*

*E. coli* es el miembro más frecuente e importante del género *Escherichia*. Este microorganismo se asocia a múltiples enfermedades, que incluyen la gastroenteritis e infecciones extraintestinales, como las ITU, meningitis y sepsis. Multitud de cepas son capaces de producir enfermedad y algunos serotipos se asocian a una mayor virulencia (p. ej., *E. coli* O157 es la causa más frecuente de colitis hemorrágica y el síndrome hemolítico urémico) (Murray y col., 2013).

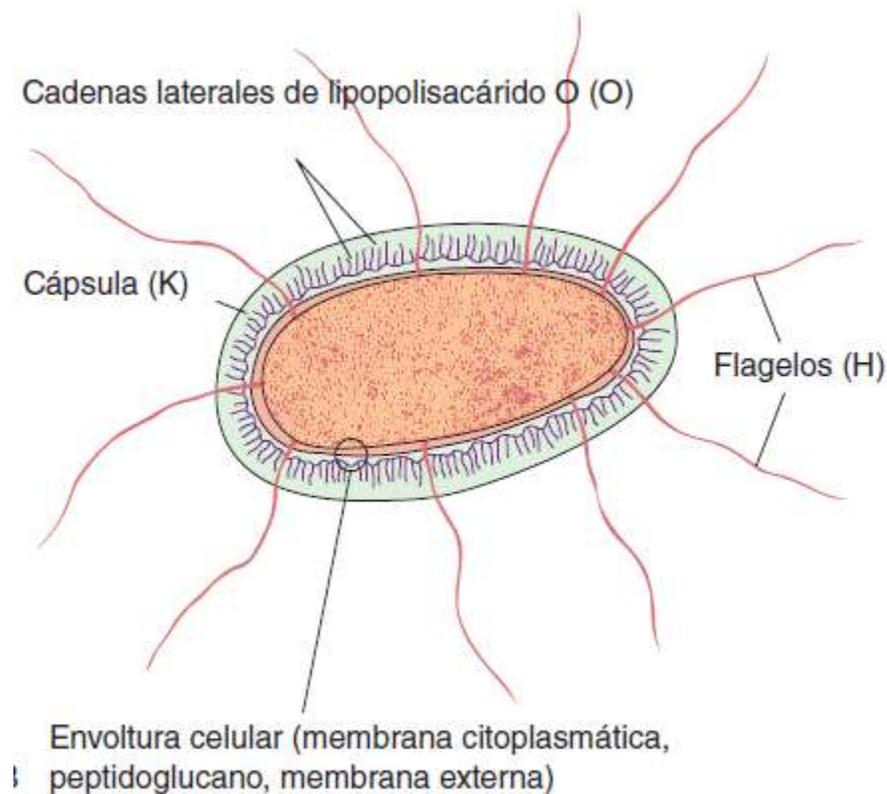


Figura 8. Estructura antigénica de la familia *Enterobacteriaceae*. (Brooks y col., 2011)

### 5.5. GÉNERO *STAPHYLOCOCCUS*

Los cocos grampositivos son un grupo heterogéneo de bacterias. Las características que tienen en común son su forma esférica, su reacción a la tinción de Gram y la ausencia de endosporas. La presencia o ausencia de actividad catalasa es una prueba sencilla que se utiliza para subdividirlos en varios géneros. Las catalasas son enzimas que convierten peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso. Cuando se pone en contacto una gota de solución de peróxido de hidrógeno con una colonia productora de catalasa, aparecen burbujas a medida que se forma oxígeno gaseoso.

El nombre del género *Staphylococcus* se refiere a que estos cocos grampositivos se desarrollan en un patrón que recuerda a un racimo de uvas (Figura 9); sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas. La mayor parte de los

estafilococos tiene un diámetro de entre 0.5 y 1.5  $\mu\text{m}$ , son inmóviles y capaces de crecer en una variedad de condiciones aeróbica y anaeróbicamente en presencia de una elevada concentración de sal (p. ej., cloruro sódico al 10%) y a temperaturas de 18° C-40° C.

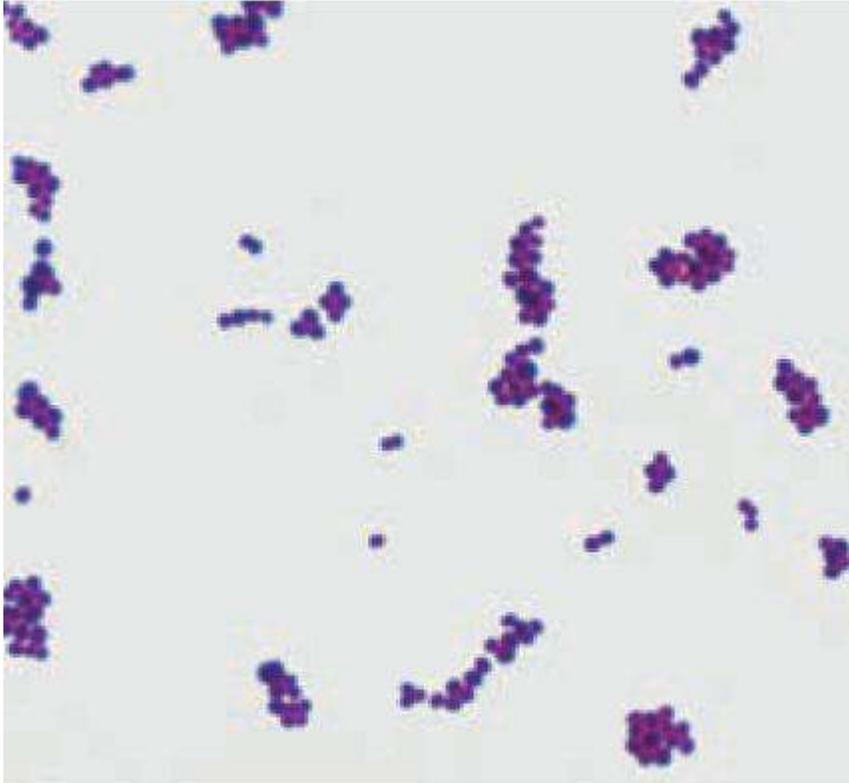


Figura 9. Tinción de Gram de *Staphylococcus aureus*. (Brooks y col., 2011)

Estas bacterias están presentes en la piel y las mucosas del ser humano. En la actualidad, el género comprende 45 especies y 24 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en el ser humano. Algunas especies se encuentran comúnmente en nichos muy específicos. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* coloniza las narinas anteriores, *Staphylococcus capitis* crece en regiones con glándulas sebáceas (como la frente); por otro lado, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus hominis* se hallan en zonas dotadas de glándulas apocrinas (como la axila).

Los estafilococos conforman un importante grupo de patógenos en el ser humano y originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas que pueden

poner en peligro la vida, infecciones de la piel, los tejidos blandos, los huesos y el aparato genitourinario e infecciones oportunistas. Las especies que se asocian con mayor frecuencia a enfermedad en el ser humano son *S. aureus* (el miembro más virulento y mejor conocido del género), *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus*. *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) es importante porque produce graves infecciones en pacientes hospitalizados y también de forma extrahospitalaria en niños y adultos previamente sanos.

Las colonias de *S. aureus* pueden tener un color amarillo o dorado por los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento y que dan el nombre a la especie. Es la especie más común presente en las personas, produce la enzima coagulasa y, por consiguiente, esta propiedad es una prueba diagnóstica útil. Cuando se suspende una colonia de *S. aureus* en un tubo con plasma, la coagulasa se une a un factor sérico y el complejo convierte el fibrinógeno en fibrina, lo que da lugar a un coágulo. Dado que las restantes especies estafilocócicas carecen de la capacidad de producir coagulasa, son conocidas colectivamente como estafilococos coagulasa-negativos.

#### 5.5.1. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* causa enfermedad mediante la producción de toxinas o a través de la invasión directa y la destrucción del tejido. Las manifestaciones clínicas de algunas enfermedades estafilocócicas se deben casi exclusivamente a la actividad de la toxina (p. ej., Síndrome de la piel escaldada por estafilococos, intoxicación alimentaria por estafilococos y Síndrome de shock tóxico), mientras que otras afecciones son consecuencia de la proliferación de los microorganismos, la cual da lugar a la formación de abscesos y la destrucción tisular (p. ej., infecciones cutáneas, endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis y artritis séptica).

La producción de enfermedad en presencia de un cuerpo extraño (p. ej., astilla, catéter, anastomosis, prótesis valvular o articular) requiere un número significativamente menor de estafilococos. Del mismo modo, los pacientes con alteraciones congénitas asociadas a defectos en la quimiotaxis o la respuesta

fagocítica (como el síndrome de Job, el síndrome de Wiskott-Aldrich o la enfermedad granulomatosa crónica) son más vulnerables a las enfermedades estafilocócicas (Murray y col., 2013).

## 5.6. GÉNERO *PSEUDOMONAS*

El género *Pseudomonas* estaba constituido inicialmente por una gran colección heterogénea de bacterias sin capacidad de fermentación que se agruparon por sus parecidos morfológicos. Se denominaron *pseudomonas* porque se suelen disponer en parejas de células que recuerdan a una célula única. En 1992, este género se subdividió en una serie de géneros nuevos (incluidas *Burkholderia* y *Stenotrophomonas*); sin embargo, *Pseudomonas* sigue incluyendo casi 200 especies.

Los miembros de este género se encuentran en el suelo, en los compuestos orgánicos en descomposición, en la vegetación y en el agua. Por desgracia, se encuentran en todo el ambiente hospitalario, en reservorios húmedos como los alimentos, las flores cortadas, los lavabos, los baños, las mopas para fregar suelos, los equipos de diálisis y terapia respiratoria e incluso en las soluciones desinfectantes. Es raro que las personas sean portadoras dentro de la biota microbiana normal, salvo en los pacientes hospitalizados y en hospedadores inmunodeprimidos ambulatorios.

El amplio entorno en el que se distribuye *Pseudomonas* se explica por sus sencillas exigencias para crecer y versatilidad nutricional. Pueden emplear muchos compuestos orgánicos como fuente de carbono y nitrógeno, y algunas cepas consiguen incluso crecer en agua destilada empleando oligonutrientes. Estos microorganismos tienen también muchos factores estructurales, toxinas y enzimas que potencian su virulencia y los hacen resistentes a la mayor parte de los antibióticos de uso habitual. De hecho, resulta sorprendente que no sean patógenos más frecuentes, dada su presencia ubicua, la capacidad de crecer en casi todos los entornos, la virulencia y la resistencia a muchos antibióticos. Por suerte, las infecciones por *Pseudomonas* son fundamentalmente oportunistas (es decir, se limitan a pacientes tratados con antibióticos de amplio espectro que suprimen las

poblaciones de bacterias intestinales normales o en pacientes con alteraciones de las defensas).

La especie *Pseudomonas* suele incluir bacilos gramnegativos rectos o ligeramente curvados en general móviles (0.5-1.0 por 1.5-5.0  $\mu\text{m}$ ), que se disponen típicamente en parejas (Figura 10). Los microorganismos emplean los carbohidratos mediante la respiración aerobia de forma que el oxígeno es el aceptor terminal de los electrones. Aunque se describen como aerobios obligados, pueden crecer de forma anaerobia utilizando nitratos o arginina como aceptor alternativo para los electrones. La presencia de citocromo oxidasa (que se detecta en una prueba rápida de 5 minutos) en la especie de *Pseudomonas* se emplea para distinguirla de las *Enterobacteriaceae* y *Stenotrophomonas*. Algunas cepas aparecen mucoides por la abundancia de una cápsula de polisacárido; estas cepas resultan especialmente frecuentes en los pacientes con fibrosis quística (FQ). Algunas especies producen pigmentos difusibles (p. ej., piocianina [azul], pioverdina [verde-amarillento] y piorrubina [pardo-rojizo]), que explican su aspecto característico en el cultivo y simplifican la identificación preliminar.

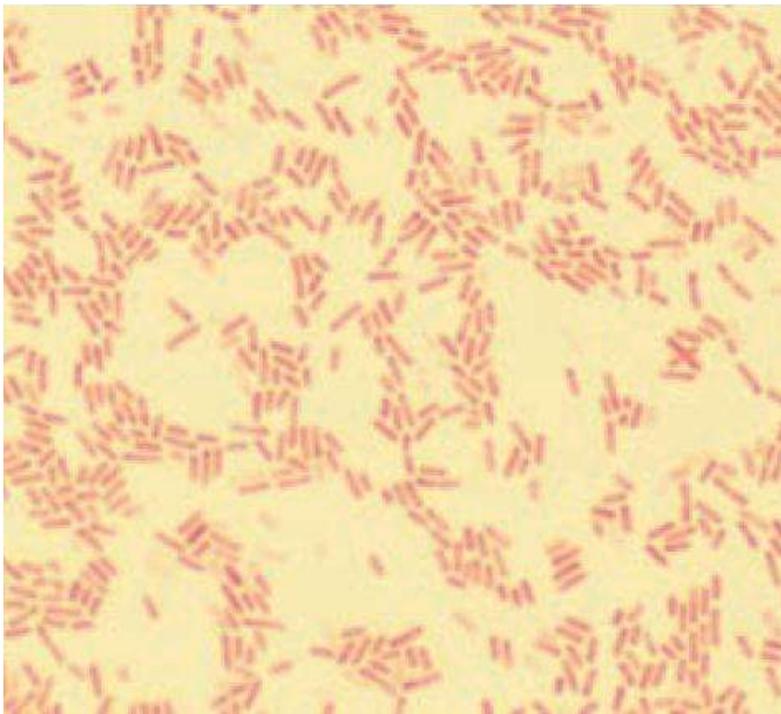


Figura 10. Tinción de Gram de *Pseudomonas aeruginosa*. (Brooks y col., 2011)

### 5.6.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* a menudo está presente en pequeñas cantidades en la microbiota intestinal normal y en la piel del ser humano; es el principal microorganismo patógeno del grupo. Tiene una amplia distribución en la naturaleza y suele estar presente en medios húmedos en los hospitales. Puede colonizar al ser humano normal en quien es un saprófito. Causa enfermedades en personas inmunocomprometidas.

Es móvil, tiene forma de bastón, mide casi  $0.6 \times 2 \mu\text{m}$ . Es gramnegativo y muestra una disposición en bacterias individuales, en pares y a veces en cadenas cortas. Es un aerobio obligado que se multiplica fácilmente en muchos tipos de medios de cultivo, produciendo en ocasiones un olor dulce o parecido al de las uvas o a la tortilla de maíz.

*P. aeruginosa* forma colonias redondas y lisas con un color verdoso fluorescente. Suele producir el pigmento azulado no fluorescente piocianina, que se difunde hacia el agar. Otras especies de *Pseudomonas* no producen piocianina. Muchas cepas de *P. aeruginosa* también producen el pigmento fluorescente pioverdina, que le confiere un color verdoso al agar (Figura 11).



Figura 11. *Pseudomonas aeruginosa* en agar Mueller-Hinton. (Brooks y col., 2011)

*P. aeruginosa* en un cultivo puede producir múltiples tipos de colonias. Estos diferentes tipos de colonias también tienen diferentes actividades bioquímicas y enzimáticas y diferentes tipos de susceptibilidad antimicrobiana. A veces no está claro si los tipos de colonia representan diferentes cepas de *P. aeruginosa* o si son variantes de la misma cepa. Los cultivos de pacientes con fibrosis quística, a menudo, generan microorganismos de *P. aeruginosa* que forman colonias mucoides como resultado de la producción excesiva de alginato, un exopolisacárido. En los pacientes con fibrosis quística, el exopolisacárido al parecer proporciona la matriz para que los microorganismos vivan en una biopelícula.

*P. aeruginosa* se multiplica bien a una temperatura de 37°C a 42°C; su crecimiento a 42°C ayuda a distinguirla de otras especies de *pseudomonas* en el grupo fluorescente. Es oxidasa positiva. No fermenta carbohidratos, pero muchas cepas oxidan glucosa. La identificación suele basarse en la morfología de la colonia,

la positividad para oxidasa, la presencia de pigmentos característicos y su multiplicación a una temperatura de 42 °C (Murray y col., 2013).

## 5.7. ANTIMICROBIANOS

### 5.7.1. Definiciones

Los términos siguientes se utilizan a menudo en relación con los antimicrobianos y sus aplicaciones.

- A. Biocida. Sustancia química o física, por lo general de amplio espectro, que desactiva microorganismos. Dos biocidas químicos son el peróxido de hidrógeno y los fenoles y dos biocidas físicos son el calor y las radiaciones. Por lo general los biocidas son de amplio espectro, a diferencia de los antiinfecciosos, que poseen una actividad antimicrobiana menor.
- B. Bacteriostático. Término específico que se refiere a la propiedad por medio de la cual un biocida puede inhibir la multiplicación bacteriana; la multiplicación se reanuda una vez que se elimina la sustancia.
- C. Bactericida. Término específico que se refiere a la propiedad por medio de la cual un biocida aniquila bacterias. La acción bactericida difiere de la bacteriostática sólo en el sentido de que es irreversible; esto es, los organismos “aniquilados” ya no se pueden reproducir, aunque se retiren del contacto con la sustancia. En ciertos casos, la sustancia provoca lisis (disolución) de las células; en otros, la célula permanece intacta y en ocasiones incluso con actividad metabólica.

### 5.7.2. Modos de acción

- A. Daño al DNA. Diversas sustancias tanto físicas como químicas actúan dañando al DNA; éstas comprenden a las radiaciones ionizantes, luz ultravioleta y sustancias químicas que reaccionan con el DNA. Esta última categoría comprende a las sustancias alquilantes y otros compuestos que reaccionan de manera covalente con las bases purina y pirimidina para formar aductos de DNA o enlaces cruzados entre tiras. Las radiaciones

lesionan al DNA de diversas formas: la luz ultravioleta, por ejemplo, induce enlaces cruzados entre pirimidinas adyacentes en alguna de las dos tiras de polinucleótidos, formando dímeros de pirimidina; las radiaciones ionizantes rompen las tiras únicas y dobles.

- B. Desnaturalización de proteínas. Las proteínas existen en un estado plegado tridimensional que depende de enlaces disulfuro covalentes intramoleculares y de varios enlaces no covalentes como puentes iónicos, hidrófobos y de hidrógeno. Este estado se denomina estructura terciaria de la proteína; se desorganiza fácilmente con diversas sustancias físicas o químicas y la proteína deja de funcionar. La desorganización de la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria de una proteína se denomina desnaturalización.
- C. Desorganización de la membrana o pared celular. La membrana celular actúa como barrera selectiva, puesto que permite el paso de algunos solutos y excluye el de otros. Muchos compuestos se transportan de manera activa a través de la membrana, con lo que se concentran dentro de la pared. La membrana también contiene a las enzimas que participan en la biosíntesis de los componentes de la cubierta celular. Las sustancias que se concentran en la superficie celular modifican las propiedades físicas y químicas de la membrana, evitando sus funciones normales y por lo tanto aniquilando o inhibiendo a la célula. La pared celular actúa como estructura constrictiva, protegiendo a la célula de la lisis osmótica. Por lo tanto, las sustancias que destruyen la pared (p. ej., lisozimas) o evitan su síntesis normal (p. ej., penicilina) provocan la lisis celular.
- D. Sustracción de los grupos sulfhidrilo libres. Las proteínas enzimáticas que contienen cisteína poseen cadenas laterales que terminan en grupos sulfhidrilo. Además, las coenzimas como la coenzima A y el dihidrolipoato contienen grupos sulfhidrilo libres. Tales enzimas y coenzimas no pueden funcionar a menos que los grupos sulfhidrilo permanezcan libres y reducidos. De esta manera, las sustancias oxidantes interfieren con el metabolismo al formar enlaces disulfuro entre grupos sulfhidrilo vecinos:



La célula contiene numerosas enzimas con sulfhidrilo; por lo tanto, los oxidantes y metales pesados dañan extensamente a la célula (Murray y col., 2013).

## 5.8. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La actividad antimicrobiana se mide in vitro para establecer: 1) la potencia de un antimicrobiano en solución; 2) su concentración en los líquidos corporales y tejidos, y 3) la sensibilidad de determinado microorganismo a una concentración conocida del fármaco.

La sensibilidad de una bacteria patógena a un antimicrobiano se mide por medio de dos métodos principales: dilución o difusión. Es importante utilizar un método estandarizado que regule todos los factores que repercuten en la actividad antimicrobiana. Utilizando el microorganismo de prueba correcto y una muestra conocida del fármaco para fines de comparación, estos métodos se utilizan para establecer la potencia del antibiótico en la muestra o la sensibilidad del microorganismo.

### 5.8.1. Método de dilución

En este método se incorporan cantidades escalonadas de antimicrobianos a un medio bacteriológico líquido o sólido. Por lo general se utilizan diluciones del doble  $[\log(2)]$  de las sustancias antimicrobianas. Posteriormente, los medios son inoculados con bacterias de prueba y se incuban. El criterio de valoración corresponde a la cantidad de sustancia antimicrobiana necesaria para inhibir la proliferación de la bacteria de prueba o su aniquilación. Las pruebas de sensibilidad por dilución en agar son tardadas y su aplicación se limita a circunstancias especiales.

Las pruebas de dilución en caldo eran engorrosas y se usaban poco cuando era necesario hacer diluciones en tubos de ensayo; sin embargo, el advenimiento de series preparadas de dilución en caldo para diversos fármacos en placas de

microdilución, ha mejorado y simplificado considerablemente este método. La ventaja de las pruebas de microdilución en caldo es que permiten obtener un resultado cuantitativo, indicando la cantidad necesaria de determinado fármaco para inhibir (o aniquilar) al microorganismo investigado.

#### 5.8.2. Método de difusión

El método más utilizado es la prueba de difusión en disco. Se coloca un disco de papel filtro que contiene determinada cantidad de un fármaco en la superficie de un medio sólido en el que se ha sembrado el microorganismo investigado. Después de la incubación, se mide el diámetro de la zona transparente de inhibición que rodea al disco como medida del poder de inhibición que tiene el fármaco contra el microorganismo investigado.

Este método está sujeto a una serie de factores físicos y químicos además de la interacción simple entre el fármaco y el microorganismo (p. ej., la naturaleza del medio y el potencial de difusión, el tamaño molecular y la estabilidad del fármaco). Sin embargo, la estandarización de estas circunstancias permite establecer la sensibilidad del microorganismo.

La interpretación de los resultados de las pruebas de difusión se debe basar en comparaciones entre métodos de dilución y difusión. Estas comparaciones han ocasionado la creación de referencias estándar. Las curvas de regresión lineal expresan la relación entre el logaritmo de la concentración mínima inhibidora en las pruebas de dilución y el diámetro de las zonas de inhibición en las pruebas de difusión.

Si se utiliza un solo disco para cada antibiótico con estandarización cuidadosa de las condiciones de la prueba, es posible establecer si un microorganismo es sensible o resistente al comparar el tamaño de la zona de inhibición con un estándar del mismo fármaco.

La inhibición alrededor de un disco que contiene cierta cantidad de un antimicrobiano, no significa que el microorganismo sea sensible a esa misma concentración por mililitro de medio de cultivo, sangre u orina (Brooks y col., 2011).

## 5.9. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA

Existen numerosos mecanismos a través de los cuales los microorganismos adquieren resistencia contra los fármacos.

- 1) Los microorganismos producen enzimas que destruyen al fármaco activo. Ejemplos: el estafilococo resistente a la penicilina G produce lactamasa  $\beta$  que destruye al fármaco. Los bacilos gramnegativos producen otras lactamasas  $\beta$ . Las bacterias gramnegativas que son resistentes a los aminoglucósidos (debido a un plásmido) producen enzimas adeniladoras, fosforiladoras o acetiladoras que destruyen al fármaco.
- 2) Los microorganismos cambian su permeabilidad al fármaco. Ejemplos: las tetraciclinas se acumulan en las bacterias sensibles pero no en las resistentes. Asimismo, la resistencia a las polimixinas está vinculada con un cambio en la permeabilidad a los fármacos. Los estreptococos poseen una barrera natural de permeabilidad contra los aminoglucósidos. Esta característica se puede vencer parcialmente por medio de la presencia simultánea de un fármaco activo en la pared celular, por ejemplo, una penicilina. La resistencia a la amikacina y otros aminoglucósidos depende en ocasiones de la falta de permeabilidad a los medicamentos, aparentemente por un cambio de la membrana externa que daña el transporte activo hacia el interior de la célula.
- 3) Los microorganismos forman un sitio de acción estructural modificado para el fármaco. Ejemplos: los microorganismos resistentes a la eritromicina tienen un receptor modificado en la subunidad 50S del ribosoma, que es resultado de la metilación de un RNA ribosómico 23S. La resistencia a ciertas penicilinas y cefalosporinas puede ser función de la pérdida o alteración de las PBP. La resistencia a la penicilina en los *Streptococcus pneumoniae* y enterococos es secundaria a PBP alterados.
- 4) Los microorganismos forman una vía metabólica modificada que desvía la reacción que es inhibida por el fármaco. Ejemplo: algunas bacterias resistentes a las sulfonamidas no necesitan PABA extracelular pero, al igual que los mamíferos, pueden utilizar ácido fólico preformado.

- 5) Los microorganismos producen una enzima modificada que aún puede llevar a cabo su función metabólica pero resulta mucho menos alterada por el fármaco. Ejemplo: en las bacterias resistentes al trimetoprim, la reductasa de ácido dihidrofólico se inhibe con mucha menos eficacia que en las bacterias sensibles al trimetoprim.

En 1944, la mayor parte de los estafilococos era sensible a la penicilina G, si bien se habían observado unas cuantas cepas resistentes. Después del empleo masivo de penicilina, entre 65% y 85% de los estafilococos aislados en hospitales en 1948 eran productores de lactamasa  $\beta$  y por lo tanto resistentes a la penicilina G.

El advenimiento de las penicilinas resistentes a la lactamasa  $\beta$  (p. ej., nafcilina) ofreció una tregua temporal, pero ahora son frecuentes las infecciones por estafilococos resistentes a la nafcilina. En la actualidad, los estafilococos resistentes a la penicilina comprenden no sólo a los que se adquieren en los hospitales, sino también a 80% a 90% de los que se obtienen en la población. Estos microorganismos también tienden a ser resistentes a otros fármacos como las tetraciclinas. Los estafilococos resistentes a la nafcilina son frecuentes en los hospitales de atención terciaria.

El principal antibiótico utilizado para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* resistente a la nafcilina es la vancomicina, pero la obtención de cepas con resistencia intermedia y las publicaciones sobre varios casos de gran resistencia a la vancomicina han incitado la búsqueda de otros fármacos nuevos.

La mayor parte de la farmacorresistencia en las bacterias intestinales se atribuye a la transmisión extensa de plásmidos de resistencia entre distintos géneros. Cerca de 50% de las cepas de la especie *Shigella* en muchas partes del mundo ahora es resistente a múltiples fármacos.

Las salmonelas transportadas por animales han desarrollado también resistencia, en especial a las tetraciclinas, incorporadas en los alimentos de los animales. La costumbre de incorporar fármacos en los alimentos de los animales provoca que los animales de granja crezcan con mayor rapidez, pero también aumenta la cantidad de microorganismos intestinales resistentes a fármacos en la flora fecal de los granjeros. En Estados Unidos, la adición continua de tetraciclinas a

los alimentos de los animales quizá contribuye a la propagación de plásmidos de resistencia y de salmonela resistente a fármacos.

Los plásmidos que transportan genes de farmacoresistencia, existen en muchas bacterias gramnegativas de la flora intestinal normal. El uso excesivo de antimicrobianos (en especial en los pacientes hospitalizados) provoca la supresión de los microorganismos sensibles al fármaco en la flora intestinal y favorece la persistencia y proliferación de bacterias resistentes a fármacos, incluidos *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Serratia*. Estos microorganismos generan problemas especialmente difíciles en los pacientes granulocitopénicos e inmunodeprimidos. El ambiente cerrado de los hospitales facilita la transmisión de estos microorganismos resistentes a través del personal y los fómites, así como por contacto directo (Brooks y col., 2011).

## 6. ACCIÓN BACTERICIDA DE LAS Ag-NPs

Existe un número creciente de informes sobre la actividad bactericida de Ag-NPs. En la literatura se sugiere que las Ag-NPs poseen mayor potencia bactericida que la plata iónica *per se*. Generalmente se considera que la plata iónica interactúa con múltiples sitios “target” (objetivos) microbianos. Su actividad antimicrobiana resulta de la combinación y alteración de proteínas microbianas, con eventual disrupción estructural y metabólica. Para la plata iónica, uno de los principales sitios “target” se encuentra a nivel de la membrana de la célula bacteriana, donde puede inhibir la fuerza motriz de protones y el transporte de electrones de la cadena respiratoria, lo que puede afectar la permeabilidad de la membrana resultando en la muerte de la célula bacteriana.

Se requiere la presencia de humedad para la penetración de plata iónica dentro de la bacteria, lo que pone de relieve algunos problemas potenciales con superficies “antimicrobianas” conteniendo plata “seca” (Cardoso, 2016).

Se sugiere que la carga positiva de los iones  $Ag^+$  es vital para su actividad antimicrobiana. Se encuentra en la literatura que, la atracción electrostática entre nanopartículas cargadas positivamente y la célula bacteriana cargada negativamente, sugiere ser el agente bactericida más notable. El efecto

antibacteriano es dependiente de la dosis e independiente de la resistencia bacteriana frente a antibióticos.

Las bacterias grampositivas son menos susceptibles a los iones  $\text{Ag}^+$  que las bacterias gramnegativas. Esto es debido a que la pared celular de las bacterias grampositivas está compuesta de moléculas de peptidoglicano y tiene más peptidoglicano que las bacterias gramnegativas. Como la pared celular de las bacterias grampositivas es más gruesa y, debido a la carga negativa del peptidoglicano; los iones de plata que están cargados positivamente, más plata puede quedar atrapada (Ahmed y col., 2016).

El mecanismo de acción microbicida de Ag-NPs generalmente se encuentra menos estudiado comparado con el de la plata iónica. Se describen diferentes mecanismos, algunos ligados a la interacción directa con la membrana y otros con la generación de plata iónica. El mecanismo de acción de las Ag-NPs se relaciona con su habilidad de generar mayor cantidad de plata iónica e incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno. Ambos, la plata iónica y las Ag-NPs parecen compartir un mecanismo de acción similar sobre la membrana objetivo, aunque las Ag-NPs son más eficientes para una concentración efectiva en el rango de nanogramos en comparación con el rango de microgramos para la plata iónica.

Cardoso (2016), cita a Sondi y col. (2004), y menciona que se observa la acumulación de Ag-NPs en la membrana de la *E. coli* con el consecuente daño a la membrana bacteriana.

De igual manera, Cardoso (2016) menciona que Xu y col. (2004) reportan que las Ag-NPs con un tamaño que va hasta los 80 nm pueden acumularse dentro de la bacteria (*P. aeruginosa*) y que dicha acumulación puede estar relacionada a la permeabilidad de membrana. Además podrían existir algunas diferencias importantes en las interacciones de Ag-NPs entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas; el glutatión revestido de Ag-NPs demuestra penetrar el citoplasma bacteriano de *E. coli*, resultando en un incremento del efecto antimicrobiano, mientras que en el *S. aureus*, la falta de penetración significa una interacción limitada a la superficie bacteriana.

Los mecanismos de acción microbicidas de las Ag-NPs parecen depender del tamaño, aunque se reportan datos conflictivos sobre cuál es el rango de tamaño responsable en conferirle un efecto bactericida. Las Ag-NPs de hasta 80 nm pueden penetrar en la membrana bacteriana interior y exterior, mientras que las Ag-NPs con diámetro menor a 10 nm ocasionan fuga citoplasmática por la formación de poros sobre la pared de la célula bacteriana. Las Ag-NPs demuestran afectar la motilidad bacteriana y la quimiotaxis en la *Pseudomonas putida* y en *Bacillus subtilis* (Cardoso, 2016).

La producción de radicales libres en combinación con  $H_2O_2$  es también otra forma de aumentar la actividad bactericida para la desinfección de superficies inanimadas o agua. Existen evidencias de que la plata iónica reacciona con proteínas claves conduciendo a disrupciones estructurales y metabólicas. Se propone un efecto directo sobre la permeabilidad/estabilidad de la membrana bacteriana como un mecanismo específico de las Ag-NPs (Figura 12).

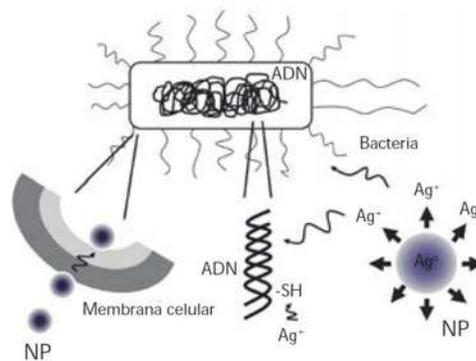


Figura 12. Mecanismos de acción antibacteriana de NPs-Ag. (Leyva, 2013)

De manera general, estableciendo una comparación entre la actividad antibacteriana de las Nps-Ag y los iones de plata se ha comprobado que los primeros presentan esa actividad en niveles nanomolares; mientras que los últimos lo exhiben en niveles macromolares, evidenciando su efectividad por el diseño de formulación. Se ha observado un aspecto sinérgico cuando las Nps-Ag son oxidadas por el medio, y un fenómeno de desorción provoca la liberación de iones de plata, de tal manera que cuando es comparada la misma formulación con o sin la presencia

de oxígeno, se observa un mayor efecto antibacteriano en la presencia de este oxidante (Cardoso, 2016).

## 7. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DESCRITA POR DIVERSOS AUTORES

La síntesis de nanopartículas ha sido de importancia para muchos investigadores, por las propiedades que presentan y el amplio uso que tienen en la actualidad. Estas propiedades son producto en gran medida de la gran área superficial que poseen. La nanotecnología requiere la síntesis de nanomateriales de diferentes composiciones químicas, tamaños y morfología con un excelente control sobre estas características.

Para sintetizar estas nanopartículas existen métodos físicos y químicos. En los métodos físicos se pueden encontrar ablación laser, termólisis, irradiación con microondas y síntesis electroquímica. Dentro de los métodos químicos destaca la reducción química de sales metálicas en solución, en ella se usan como agentes reductores borohidruro de sodio, hidracina y dimetilformamida, reactivos que son muy tóxicos. En ocasiones estas moléculas tóxicas llegan a adherirse a en la superficie de la nanopartícula durante la síntesis y es posible que no se eliminen por completo aun repitiendo el procedimiento de lavado. Por tales motivos es que se buscó una manera más sencilla e igualmente efectiva para la síntesis de nanopartículas metálicas.

El desarrollo de procesos confiables, respetuosos del medio ambiente para la síntesis de nanomateriales es un aspecto importante de la nanotecnología. Es por eso que surge una alternativa para la síntesis de nanopartículas denominada síntesis biológica, la cual hace uso de microorganismos, plantas y sus extractos como fuentes reductoras.

Esta síntesis biológica es también conocida como síntesis verde, Paul J. Anastas es considerado el padre de la química verde por su trabajo en este campo. Paul define química verde como aquella filosofía de trabajo que implica la utilización de herramientas y caminos alternativos que prevengan la contaminación; hay doce principios básicos en los que se basa la química verde, de los cuales el tercero dice:

la metodología de síntesis debe procurar generar el número mínimo de sustancias tóxicas para el ser humano y el medio ambiente (Salinas-Estevané, 2012).

La síntesis verde, es una síntesis que representa una alternativa presumiblemente no tóxica, amigable con el medio ambiente y que además su uso en algunas ocasiones iguala o sobrepasa las expectativas de las nanopartículas sintetizadas por métodos físicos y químicos, en cuanto a costo y características de las nanopartículas obtenidas.

Por lo anterior, en la síntesis por los métodos, así denominados verdes o de química verde, la síntesis y purificación de nanopartículas metálicas es simple, económicamente costeable, conveniente, compatible y ambientalmente segura. Razón por la cual varios grupos se han enfocado hacia el uso de la síntesis verde para la fabricación de nanopartículas metálicas con diferente tamaño y morfología. Además se cuenta con una enorme cantidad de recursos biológicos para elegir el que mejor convenga a las necesidades o importancia para la síntesis.

Partiendo de una síntesis verde, el tamaño de la partícula puede variar dependiendo de factores tales como temperatura, pH, tipo y concentración de extracto, entre otros; los cuales, se deben tener en cuenta antes de realizar la síntesis de nanopartículas. Carrillo y col. (2014), utilizaron el extracto de epazote (*Chenopodium ambrosioides*) para sintetizar nanopartículas de plata a temperatura ambiente, el tamaño de partícula osciló entre 4.9 nm y 8.5 nm.

Por otro lado, se ha encontrado también la formación de nanopartículas de plata por medio del hongo *Verticillium* (Mukherjee y col., 2001). Exponiendo la biomasa fúngica en una solución acuosa a iones  $Ag^+$ , resultó la reducción intracelular de los iones de metal y la formación de nanopartículas de plata de dimensiones  $25\pm 12$  nm. Realzan que los hongos secretan grandes cantidades de proteínas, aumentando de ese modo significativamente la productividad de este enfoque biosintético.

Asimismo, Ajitha y col. (2016) lograron sintetizar nanopartículas de plata con un tamaño calculado de 12 nm utilizando extracto de hoja de *Lawsonia inermis* y evaluaron su capacidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.* y *Staphylococcus spp.* por el método de difusión en disco. Mientras que, Sharma

y col. (2009), determinaron la actividad antibacteriana de nanopartículas de plata sintetizadas con sacáridos en cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, expresándolo en concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida. Del mismo modo, Guzmán y col. (2012), obtuvieron la actividad antimicrobiana por difusión en disco y la concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de plata sintetizadas con citrato de sodio en cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Por otro lado, Govindaraju y col. (2010), valoraron la actividad antibacteriana de nanopartículas de plata de 14 nm obtenidas con extracto de hojas de *Solanum torvum* en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en disco. De igual forma, se encontró la concentración mínima bactericida y la inhibición (Método de difusión en disco) de nanopartículas de plata con diámetro de 70 nm sintetizadas con extracto de *Aloe vera* en *Pseudomonas aeruginosa* (Tippayawat y col., 2016).

Singh y col. (2010), estudiaron los halos de inhibición por difusión en disco obtenidos por nanopartículas de plata de 20 nm sintetizadas con extracto de *Argemone mexicana* en *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Mientras que Alvarado y col. (2014) y Monge (2009), reportan la determinación de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de nanopartículas de plata sintetizadas por métodos químicos en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## 8. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

### 8.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X POR CRISTALES

El fundamento de esta técnica reside en los fenómenos que se producen cuando la radiación X incide sobre la materia (Albella y col, 1996). El primer fenómeno que se puede observar es que la radiación incidente es parcialmente atenuada por el material irradiado; es decir, solo una cierta fracción de la intensidad de esta radiación la atraviesa sin que se produzcan cambios en su energía o longitud de onda. La medida de esta intensidad transmitida es la base de la técnica de absorción de rayos X. La atenuación de la radiación se produce por dos

mecanismos principales: absorción fotoeléctrica y dispersión (scattering); la absorción fotoeléctrica se traduce en la emisión, por la muestra irradiada, de radiación X y de electrones; el estudio, tanto del espectro de rayos X como de los electrones emitidos, conduce a una serie de técnicas de análisis químico, etc. (Albella y col, 1996).

Uno de los mecanismos en que los rayos X interactúan con la materia es la dispersión, por el cual una parte de la radiación incidente, es desviada de su dirección original por la interacción con el material irradiado. En este fenómeno está basada la difracción de rayos X.

Cuando sobre un átomo incide un haz de rayos X, puede considerarse, desde el punto de vista geométrico, que éste se comporta como un radiador puntual que dispersa elásticamente (sin modificar su longitud de onda) la radiación en todas las direcciones del espacio. Ahora, si el haz de rayos X incide sobre un cristal, es decir, sobre una agrupación de átomos periódicamente ordenados en el espacio, entre las ondas dispersadas por cada uno de ellos se producen fenómenos de interferencia que (normalmente), en la mayor parte de las direcciones será de tipo destructivo, cancelándose la resultante en mayor o menor proporción. Sin embargo, en determinadas direcciones, y debido a la ordenación periódica de los átomos, puede ocurrir que las ondas dispersadas estén en fase y se refuercen mutuamente, obteniéndose interferencia constructiva.

### 8.1.1 LEY DE BRAGG

Las condiciones necesarias para que se produzca interferencia constructiva vienen determinadas por la Ley de Bragg. Consideremos una familia de planos cristalinos con índices de Miller ( $hkl$ ) y espaciado  $d_{hkl}$ . Si sobre estos planos (figura 13) incide un haz de rayos X monocromático, en una dirección que forma un ángulo  $\theta$  con la superficie de los planos, sólo se producirá interferencia constructiva cuando el ángulo de incidencia, la longitud de onda de la radiación, y el espacio de la familia de planos cumplan la siguiente relación conocida como Ley de Bragg:

$$n\lambda = 2dhklsen\theta$$

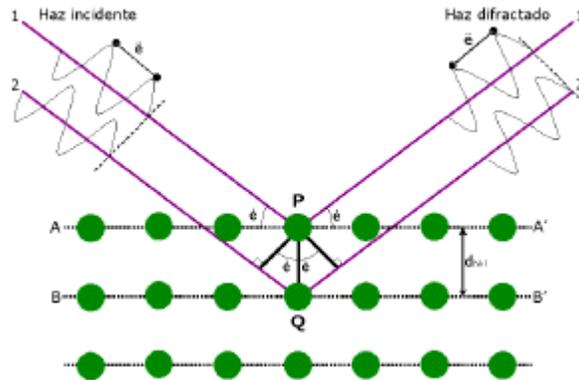


Figura 13. Difracción de Rayos X para cristales. (Albella y col, 1996).

La dirección en la que emerge el haz difractado forma también un ángulo  $\theta$  con la superficie de la familia de planos que difractan, es decir, un ángulo  $2\theta$  con la dirección de incidencia del haz de rayos X. Además, la dirección del haz incidente y la dirección de haz difractado están contenidas en un plano que es perpendicular a las familias de planos que difractan.

En la obtención de la información que proporciona la difracción de los rayos X pueden distinguirse dos aspectos claramente diferenciados y complementarios: por una parte, la geometría de las líneas de difracción, que está condicionada únicamente por el tamaño y la forma de la celda elemental del cristal. Conociendo estas líneas será posible averiguar el sistema cristalino y las dimensiones de la celda. El otro aspecto viene dado por las intensidades de estos rayos difractados, que están íntimamente relacionadas con la naturaleza de los átomos y con las posiciones que éstos ocupan en la red cristalina, de forma que su medida constituye un procedimiento para obtener información tridimensional acerca de la estructura interna del cristal.

## 8.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN POLVO

Un material cristalino en forma de polvo, está formado por cristalitas orientados en todas las posibles direcciones, por esta razón el patrón de difracción que se obtiene, contiene todas las líneas de difracción con las intensidades relativas

que les corresponden de acuerdo con la estructura cristalina del material (Culity, 1978). Por lo tanto, para identificar un material utilizando rayos X, la forma de preparación de la muestra más conveniente es el polvo, ya que de esta manera se obtiene una mayor cantidad de líneas de difracción del material analizado, con lo que se obtiene información suficiente sobre la posición (espaciamientos interplanares) e intensidades relativas, parámetros suficientes para identificar el material. Este método nos permitirá identificar sustancias cristalinas, así como la determinación del tamaño de los cristales.

### 8.2.1. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DEL CRISTAL

Para obtener máximos de interferencia, las condiciones son que dos ondas involucradas deben estar desfasadas por un número entero de longitudes de onda. Si la diferencia en trayectoria de los rayos dispersados por los primeros dos planos es ligeramente distinta de un número entero de longitud de onda, entonces el plano que dispersa un rayo, con la diferencia de fase adecuada con el rayo del primer plano, se encontrará a una mayor profundidad en el cristal. Si el cristal es lo suficientemente pequeño, para que este plano no exista, entonces no tendrá una coincidencia completa de todos los rayos dispersados, por lo que no se tendrá el efecto de cancelación o reforzamiento de todos los rayos difractados.

Se observa entonces que existe una conexión entre la diferencia total de fase que puede ser tolerada y el tamaño del cristal. Se ha encontrado que cristales muy pequeños causan un ensanchamiento (una pequeña divergencia angular) del rayo difractado, es decir, dispersión alrededor de ángulos cercanos, pero no iguales, al ángulo de Bragg. El ancho de la curva de difracción se incrementa cuando el tamaño del cristal disminuye (figura 14).

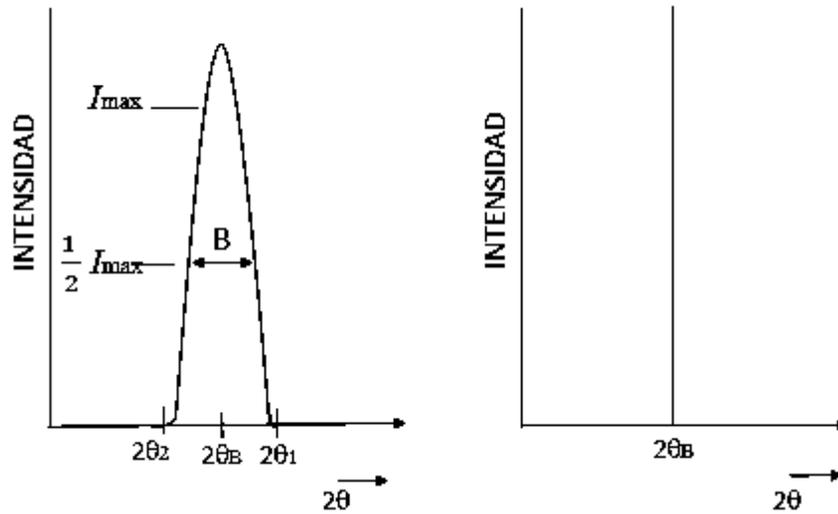


Figura 14. Efecto de tamaño de partícula en las curvas de difracción. (Albella y col., 1996).

El ancho B es usualmente medido en radianes a una intensidad igual a la mitad de la intensidad máxima. Para una medida aproximada de B, se toma la mitad de la diferencia entre los dos ángulos extremos en los que la intensidad es cero, entonces:

$$B = \frac{1}{2} (2\theta_1 - 2\theta_2) = \theta_1 - \theta_2$$

Se puede demostrar por la ley de Bragg que para estos ángulos, considerando que el cristal está formado por  $m+1$  planos (ancho total), la relación entre el tamaño del cristal T y el ancho de la dispersión  $\beta$ , está dado por la ecuación de Scherrer:

$$T = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Donde:

T = tamaño del cristal

$\lambda$  = número de onda del rayo difractado  
 $\beta$  = ancho de dispersión (FWHM)  
 $\theta$  = ángulo de difracción

### 8.3. TAMAÑO DE PARTÍCULA

El tamaño de partícula (TP) es medido por la dispersión dinámica de la luz. Se introduce una fuente de luz en la celda y la luz dispersa se recoge a  $90^\circ$  o  $173^\circ$  como se muestra en el diagrama. El sistema selecciona automáticamente el ángulo óptimo de dispersión y la posición de la celda, dependiendo de la concentración e intensidad de la muestra.

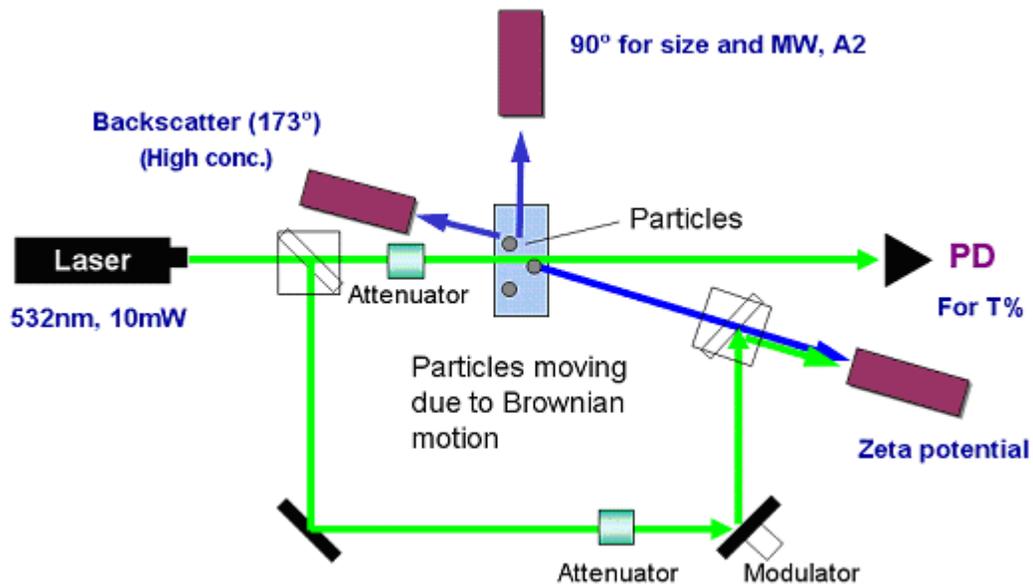


Figura 15. Diagrama de funcionamiento del equipo tamaño de partícula. (Velázquez-González, (2017))

La señal obtenida de la luz difundida se alimenta a un correlador multicanal que genera una función utilizada para determinar el coeficiente de difusión traslacional de las partículas analizadas. La ecuación de Stokes-Einstein se utiliza entonces para calcular el tamaño de partícula. Se dispone de un rango de células de muestra y los objetivos de medición, como se muestra en la figura 15.

El análisis de tamaño de partículas (TP) se realiza mediante dispersión de la luz. Dependiendo de las propiedades físicas de la muestra, el rango dinámico es de 0.3 nm a 8  $\mu$ m. El límite inferior está influenciado por la concentración de la muestra y la presencia de partículas grandes no deseadas. Mientras que el límite superior de la muestra está influenciado por la densidad de la muestra, ya que la dispersión dinámica de la luz esta modelada en todo el movimiento procedente del movimiento browniano, y no del asentamiento gravitatorio.

#### 8.4. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

En la espectroscopía de infrarrojo (IR) se mide la absorción de las ondas caloríficas que se debe a movimientos intramoleculares; es decir, la estructura interna de la molécula determina el tipo de absorción.

Los átomos que constituyen a una molécula están unidos entre sí por fuerzas de origen electrostático, que asemejan uniones elásticas y sus movimientos son periódicos o cuasiperiódicos. Todos los movimientos relativos de los átomos en una molécula son la superposición de los llamados modos normales de vibración, en los cuales todos los átomos se encuentran vibrando con la misma fase y frecuencia normal. El número de modos normales de vibración define el espectro vibracional de cada molécula. Estos espectros también dependen de las masas de los átomos involucrados, su arreglo geométrico dentro de la molécula y la elasticidad de los enlaces químicos. Un IR se obtiene al pasar radiación a través de una muestra y determinar que fracción de esta radiación incidente ha sido absorbida. La energía particular a la que aparece cada pico en un espectro guarda relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula.

La espectroscopía de infrarrojo mide los cambios vibracionales que experimentan las moléculas al absorber la energía electromagnética, estos cambios o movimientos pueden clasificarse en modos de estiramiento, donde la longitud del enlace cambia de manera periódica durante la vibración; o modos de doblamiento, donde el ángulo entre los enlaces cambia de forma periódica durante las vibraciones.

La figura 16 muestra los modos de tensión que se dividen en simétrica y antisimétrica, mientras que los modos de flexión se dividen en:

**Balaneo en plano:** esto ocurre cuando la unidad estructural se balancea en el plano de simetría de la molécula.

**Tijereteo en plano:** sucede cuando los átomos unidos a un átomo central se alejan y se acercan uno respecto de otro, deformando el ángulo de valencia.

**Aleteo fuera de plano:** se presenta cuando la unidad estructural se balancea en el plano perpendicular al de simetría de la molécula.

**Torsión fuera de plano:** se manifiesta cuando la unidad estructural gira en vaivén alrededor del enlace que la une con el resto de la molécula.

**Acoplamiento vibracional:** se puede dar el caso de una interacción entre algunas de las vibraciones mencionadas, si los enlaces vibrantes están unidos a un átomo central.

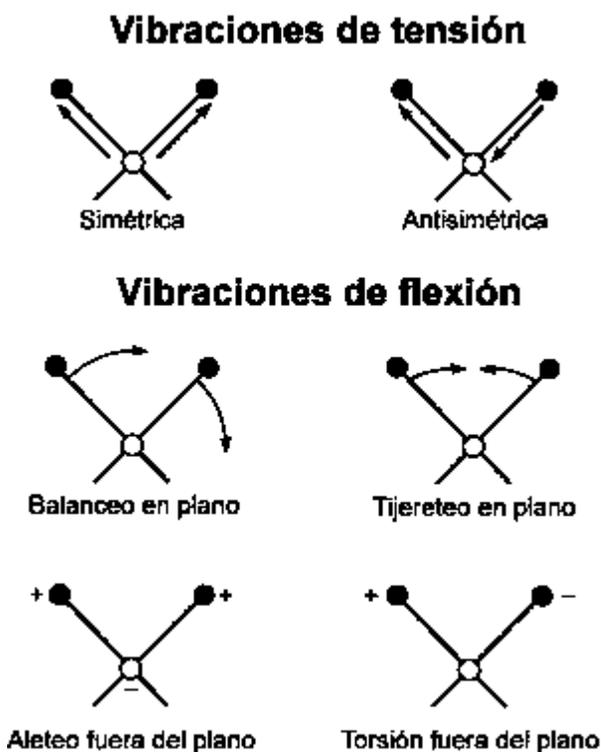


Figura 16. Modos de vibración por absorción infrarroja.  
(<http://www.ehu.es/imacris/PIE06/web/IR.htm>).

Para la obtención de los espectros infrarrojos, se utilizan interferómetros y transformada de Fourier. La radiación de infrarrojo es analizada en este caso por medio de un interferómetro de Michelson, como se observa en la figura 17, que consiste en un montaje óptico en el que se produce el fenómeno de interferencia de ondas electromagnéticas. El principio del IR es que la radiación policromática de la fuente de infrarrojo, es colimada por un espejo semireflectante y el haz resultante es dividido y pasado a dos espejos uno fijo y el otro móvil, después de reflejarse los dos haces se recombinan nuevamente en el espejo semireflectante. Cuando el espejo móvil está posicionado, de tal manera que los dos caminos ópticos sean iguales, simultáneamente todas las longitudes de onda de la luz proporcionan una interferencia constructiva y si se encuentran desfasados, la interferencia es destructiva (Velázquez-González, 2017).

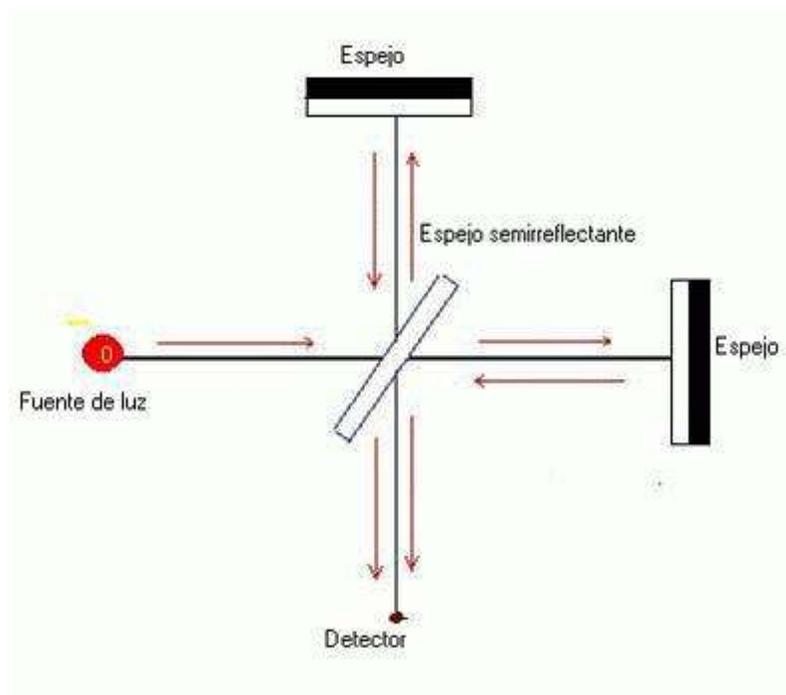


Figura 17. Interferómetro de Michelson. (Velázquez-González, 2017)

Las características más relevantes de esta espectroscopía son:

- Si dos moléculas están constituidas por átomos distintos, o tienen distinta distribución isotópica, o se encuentran en ambientes distintos, los espectros infrarrojos serán distintos.
- Una sustancia definida puede identificarse por su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados como las huellas digitales de dicha sustancia.
- Los espectros muestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares (C-H, C=C, O-H, etc.) y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos.
- A partir de los espectros se pueden inferir las estructuras moleculares.
- Las intensidades en las bandas del espectro de una mezcla, son por lo regular proporcionales a las concentraciones de los componentes individuales. Por ello, es posible determinar la concentración de una sustancia y realizar análisis de muestras con varias componentes.
- La espectroscopía infrarroja es una técnica de análisis no destructiva y rápida ya que se pueden obtener y almacenar los espectros en cuestión de minutos.

#### 8.4.1. ABSORCIÓN ÓPTICA

La absorción es la transformación de la energía asociada a la luz incidente en un material a otras formas tales como energía calorífica, luminosa, química, etc.

La energía asociada en la diferencia de intensidades ( $I_0 - I$ ) se transforma en otro tipo de energía del material (figura 18).

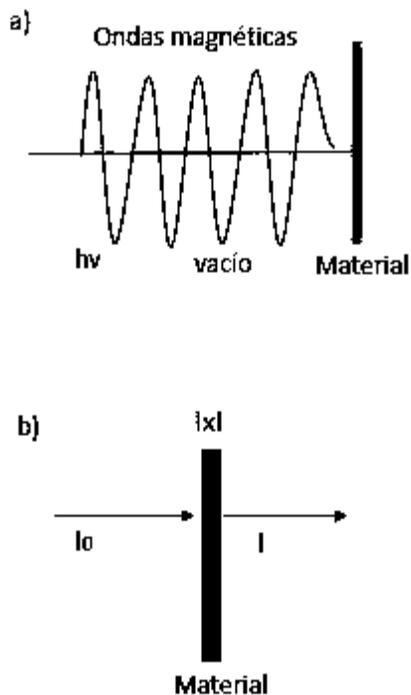


Figura 18. Proceso de absorción en un metal. (Velázquez-González, 2017)

Cuando la luz se propaga en un medio diferente al vacío su intensidad decrece con la distancia (figura 9), es decir:

$$dI = -\alpha dx$$

Donde  $\alpha = (\lambda)$  se conoce como coeficiente de absorción óptica. A partir de la expresión anterior es posible obtener una ecuación que nos relacione la intensidad de la luz absorbida por un material ( $I$ ) al incidir en él un haz de luz de intensidad conocida ( $I_0$ ), el cual pase a través de una distancia  $x$  dentro del material (figura 9).

$$dI = -\alpha dx$$

$$dI \alpha - I_0$$

$$dI = -\alpha I_0 dx$$

Integrando desde 0 hasta x queda:

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = - \int_0^x \alpha dx$$

$$\ln \frac{I_0}{I} = -\alpha x$$

Resolviendo para la intensidad final, obtenemos la ley de Lambert y Beer.

$$I(x) = I_0 e^{-\alpha x}$$

Con ella se puede determinar la intensidad de luz absorbida por un material con coeficiente de absorción óptica  $\alpha$  sobre el cual incide un haz de intensidad  $I_0$  y atraviesa una longitud  $x$  (Wooten, 1972).

## 8.5. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

La espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), se realiza en el espectrofotómetro, el cual es un instrumento que permite a partir de una fuente de radiación hacer pasar un haz de luz dirigido por un monocromador a una solución para comparar la radiación absorbida o transmitida por la solución o sustrato que contiene una cantidad desconocida de soluto y una cantidad conocida de la misma sustancia, para medir la diferencia en la emisión o absorción de la muestra, medir las transiciones electrónicas y cuantificarlas, como se muestra en la figura 19.

La espectroscopía ultravioleta-visible utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones ultravioleta (200-380 nm), visible (380-800 nm) y cercano infrarrojo (800-2500 nm). La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas.

El principio de la espectroscopía ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a su estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda comprende entre 190-700 nm.

La luz visible o ultravioleta es absorbida por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible, así como en el ultravioleta.

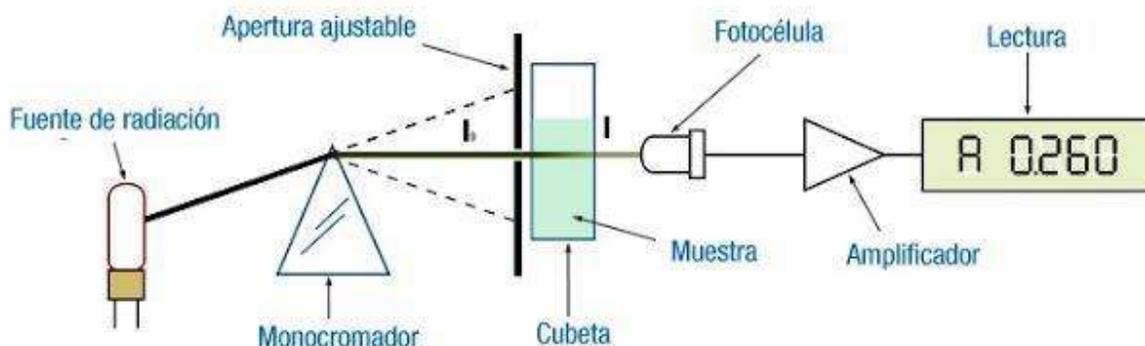


Figura 19. Funcionamiento del espectrofotómetro de UV-Vis. (Velázquez-González, 2017)

## 8.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Se pueden obtener así imágenes de todo tipo de materiales estructurales o de material biológico con un mínimo de preparación previa y observar directamente todo tipo de superficies con una gran *profundidad de foco*. Esta es una característica privativa de los instrumentos electrónicos que permite la obtención de micrografías en foco de superficies irregulares como una superficie de fractura.

Para esto solamente es necesario asegurar que las muestras sean limpias, secas, resistentes al alto vacío del instrumento y buenas conductoras eléctricas. Si se trata de observar un material no conductor, normalmente se recubren las

muestras con una delgada capa metálica, p.ej. oro, o desecando previamente las muestras que tuviesen altos contenidos de vapor de agua.

Las imágenes de un microscopio electrónico se obtienen mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales resultantes de las interacciones entre un haz de electrones de alta energía con la materia. Estas interacciones pueden proporcionar información sobre topografía, composición y estructura cristalográfica.

En un microscopio electrónico de barrido la imagen se obtiene a partir de las señales emitidas por la muestra y se va formando a medida que el haz de electrones se desplaza sobre una porción de su superficie. Este barrido (*scanning*) se realiza línea por línea sobre una pequeña zona de forma rectangular (*raster*). Esta zona es la que se visualiza ampliada en la imagen final. A medida que el haz explora la muestra de esta manera la intensidad de la señal generada varía según el punto particular analizado en cada instante. La señal detectada puede ser entonces analizada y ampliada, tanto en su forma analógica como digital, y finalmente procesada convenientemente.

A diferencia de una imagen óptica, el microscopio electrónico de barrido no forma una imagen real del objeto sino que construye una imagen virtual a partir de alguna de las señales emitidas por la muestra. La imagen se visualiza en un tubo de rayos catódicos donde las bobinas de deflexión del haz están sincronizadas con el barrido del haz de electrones en el microscopio. Modulando la intensidad del haz del tubo de rayos catódicos se obtiene finalmente un registro punto a punto en la pantalla que es precisamente la imagen electrónica proporcionada por el microscopio. Actualmente la visualización se realiza en la pantalla de una computadora.

Las señales que se utilizan para la obtención de la imagen provienen de un cierto volumen debajo de la superficie de la muestra. El haz de electrones penetra una cierta distancia debajo de la superficie e interactúa con los átomos de la muestra a lo largo de su trayectoria. Las señales que se originan por estas interacciones provienen entonces del llamado **volumen de interacción**. La forma y dimensiones de este volumen son otros factores que determinan la resolución del microscopio. En

la figura 20 se esquematiza la forma característica de este volumen y los tipos de señales generadas por la interacción electrón-muestra. Se puede ver que siendo las dimensiones de este volumen mayores que el diámetro del haz incidente son las que, finalmente, limitan el poder de resolución de un SEM (Ipohorski y Bozzano, 2013).

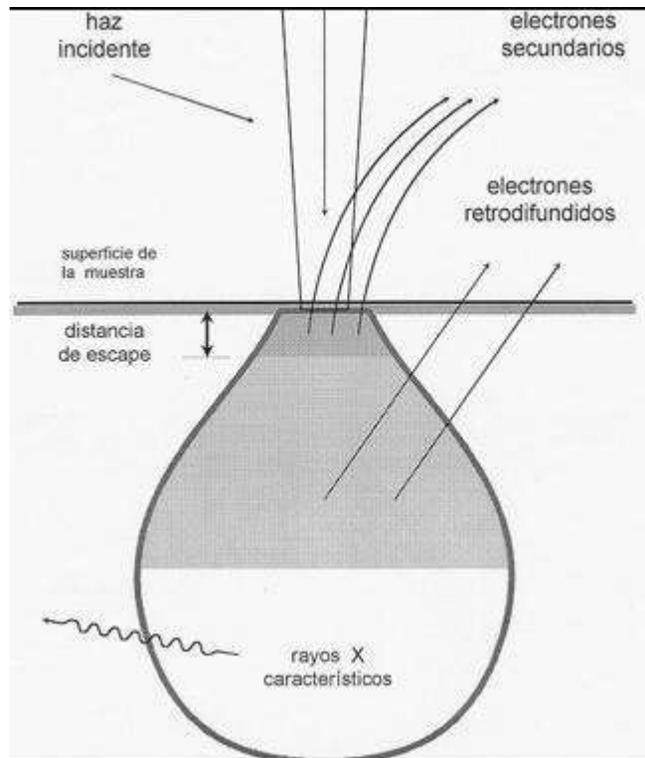


Figura 20. Esquema del volumen de interacción y las señales producidas. (Ipohorski y Bozzano, 2013)

## 9. JUSTIFICACION

Históricamente, la plata fue utilizada durante siglos como agente antimicrobiano. Sin embargo, fue desplazada por el uso de antibióticos. Actualmente, la resistencia presentada por diferentes microorganismos de relevancia médica a gran variedad de estos antibióticos, ha traído consigo el resurgimiento del interés sobre el uso de la plata y nuevas formas de aplicarla en el control de infecciones. De acuerdo a Cardoso (2016), la disminución en el tamaño de una partícula, provoca un incremento en el radio entre el área de superficie y el volumen en forma muy importante, lo que lleva a modificaciones significativas en sus propiedades físicas, químicas y biológicas; es por ello que se puede obtener una mejor acción antibacteriana en las nanopartículas de plata.

La síntesis verde es una técnica novedosa que permite sintetizar nanopartículas de forma económica, fácil y sobre todo, amable con el medio ambiente. El fundamento de este método es el uso de microorganismos y extractos de plantas como agentes reductores en la reacción de síntesis.

Se encuentran varios estudios sobre el mucílago de linaza en relación a ciertos padecimientos intestinales y el control de colesterol en el organismo. Sin embargo, no hay estudios sobre su aplicación en la síntesis de nanopartículas de plata. Por tal motivo, se decidió trabajar con mucílago liofilizado de linaza para llevar a cabo la biosíntesis de nanopartículas de plata y su aplicación como agente antibacteriano frente a microorganismos de relevancia médica, como son: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

## 10. HIPOTESIS

Las nanopartículas de plata obtenidas por medio de síntesis verde utilizando mucílago de linaza como agente reductor, tendrán un efecto antimicrobiano sobre las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

## 11. OBJETIVOS

### 11.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad antibacteriana de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de mucílago de linaza en cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

### 11.2. Objetivos específicos

- Establecer las condiciones para la síntesis de nanopartículas de plata con mucílago de linaza liofilizado.
- Caracterizar estructural y morfológicamente las nanopartículas de plata sintetizadas.
- Determinar la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de plata obtenidas, por medio de la técnica de difusión en disco, concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) en las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## 12. METODOLOGIA

### 12.1. REACTIVOS Y MATERIALES

Mucílago de linaza en polvo

Nitrato de plata (J. T. Baker)

Hidróxido de sodio (98.7%, Fermont)

Agua desionizada

Agua destilada

Agar Müeller-Hinton

Agar nutritivo

Caldo Nutritivo

Solución salina (NaCl 0.85%)

Hisopos estériles

Discos de papel filtro (6mm)

Pinzas

Mechero de Fisher

Asa bacteriológica

Micropipeta (100-1000  $\mu$ L y 10-100  $\mu$ L)

### 12.2. EQUIPOS DE TRABAJO

Horno de secado Ecoshell 9023

Mufla Felisa

Balanza analítica

Parrilla de agitación magnética

Magneto permanente

Microprocesador pH meter (Hanna Instruments, pH 210)

Gabinete de Bioseguridad clase II (ECOSHEL, Modelo IIA2)

Incubadora DUROCELL

Autoclave vertical de tres calores Man-Olve

### 12.3. EXTRACCIÓN DEL MUCÍLAGO DE LINAZA

Se utilizó mucílago de linaza liofilizado previamente extraído por Arenas (2015). La extracción del mucílago se realizó usando el método descrito por Qian y col. (2012), con algunas modificaciones. Su composición química proximal es: humedad 12.67%, cenizas 4.91%, grasa 1.14%, proteína 0.94% y fibra dietética 75.46%. Asimismo, contiene los compuestos bioactivos: taninos condensados 1.97 mg E Catequina/g de muestra, compuestos fenólicos T. 8.76 mg E Ac. Gálico/g de muestra y flavonoides T. 10.11 mg E Rutina/g de muestra (Arenas, 2015).

### 12.4. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

La síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando mucílago liofilizado de linaza como agente reductor. Se realizó rehidratando 0.1 g de mucílago de linaza en 40 mL de agua desionizada como primer paso; a continuación, se filtró la solución en papel filtro de poro abierto y se ajustó el pH (10) con una solución de NaOH 0.1M. Se preparó también una solución de  $\text{AgNO}_3$  5mM.

Posteriormente, la reacción de síntesis se llevó a cabo en un matraz en proporción 8:3 de  $\text{AgNO}_3$  y mucílago hidratado, respectivamente. Se mantuvo en agitación constante durante 60 minutos a 65 °C. Pasados 50 minutos de reacción apareció el color marrón, indicando la formación de nanopartículas de plata tal como lo reporta Mukherjee y col., (2001). En la figura 21 se pueden observar las soluciones de mucílago hidratado, así como el coloide obtenido de la síntesis.

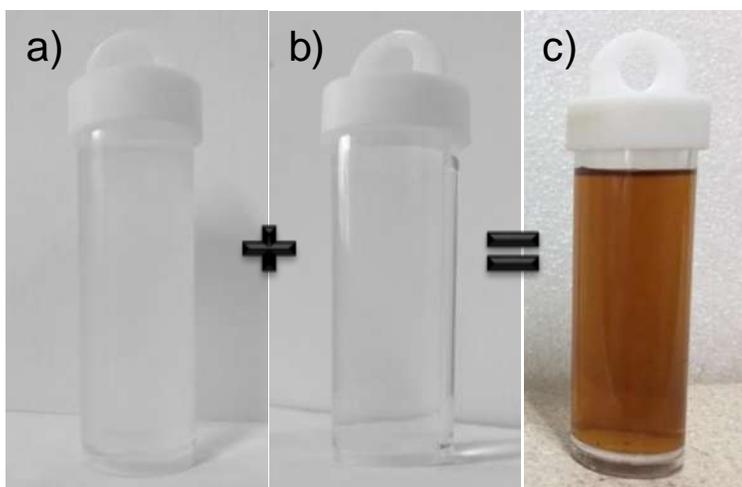


Figura 21. a) Nitrato de plata 5mM; b) Mucílago de linaza hidratado; c) Solución acuosa Ag/Mucílago.

A continuación, se colocó la muestra en estufa a 100 °C durante una hora para obtener un polvo fino. Posteriormente, una parte de la muestra se calcinó a 450 °C y otra a 500 °C por una hora; de esta manera se obtuvieron 3 polvos con diferentes características físicas, de color café oscuro (muestra secada a 100 °C) a tonalidades más claras (muestras calcinadas a 450 °C y a 500 °C), como se observa en la figura 22.

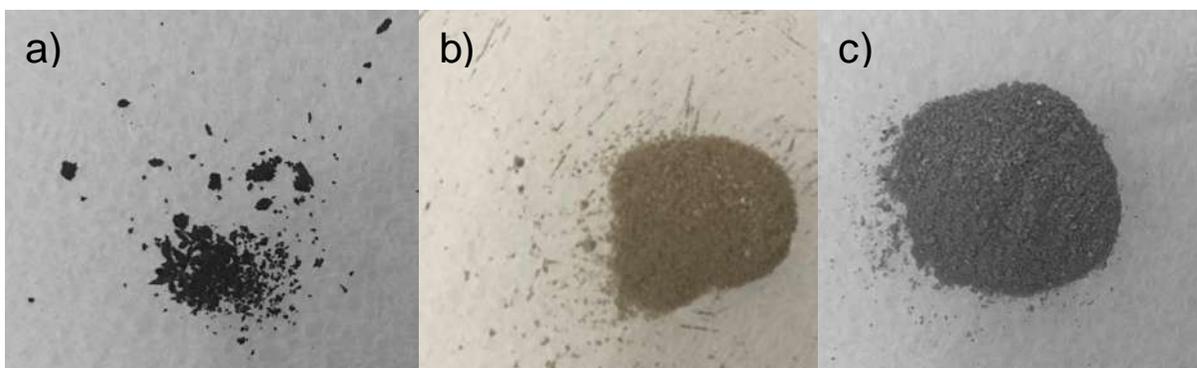


Figura 22. Nanopartículas secadas a 100 °C (a), 450 °C (b) y 500 °C (c).

## 12.5. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

La solución coloidal Ag-mucílago se caracterizó utilizando un espectrofotómetro UV-Vis marca Lambda 365 Perkin Elmer mediante los espectros de absorbancia dentro del espectro visible, corriendo la muestra a una longitud de onda de 350 a 700 nm.

Se utilizó espectroscopía de infrarrojo para caracterizar las muestras en forma de polvo, usando el equipo FTIR BRUKER VERTEX 70/70V; bajo las siguientes condiciones de análisis: 40 ciclos de barrido, 2  $\text{cm}^{-1}$  de resolución y en un rango de 500 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

El análisis de rayos X se realizó con un equipo de difracción de rayos X modelo D8 ADAVANCE DAVINCI equipado con ánodo de cobre con radiación  $\text{Cu-K}\alpha$

y un monocromador de grafito. Las muestras fueron escaneadas con un rango de 15-80°.

El análisis de tamaño de partícula, se llevó a cabo en el Nanosizer SZ marca HORIBA SCIENTIFIC. Las condiciones de análisis fueron temperatura de 25 °C, con índice de refracción de la plata 0.16, duración de la corrida 3s, celda de cristal, sistema monodisperso. Las muestras N100, N450 y N500 se hidrataron en una concentración de 5 mg/mL y se homogenizaron en un baño ultrasónico 8892 de 60 Hz a 25°C/ 30 minutos de acuerdo con lo descrito por Guzmán y col. (2012).

El equipo que se utilizó para realizar la caracterización por microscopía, fue un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Jeol modelo JSM-7600F, equipado con haz atenuante (gentle beam) especial para muestras no conductoras y espectroscopía EDS Bruker. La muestra secada a 100 °C y se sometió a tratamiento en una Metalizadora “Sputter-Coater” para recubrimientos de muestras no-conductoras, las muestras tratadas a 450 °C y 500 °C fueron observadas sin tratamiento previo. Se realizó también un microanálisis elemental mediante una sonda acoplada al microscopio a cada una de las muestras.

## 12.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se evaluó la capacidad antibacteriana de las nanopartículas de plata sintetizadas (N100, N450 y N500), sobre las cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 23); proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán, México.

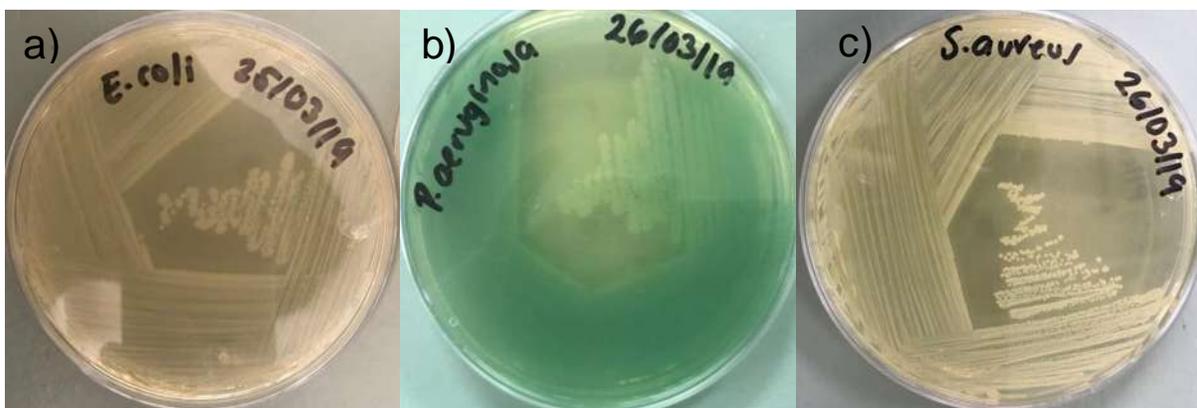


Figura 23. Cepas, *Escherichia coli* ATCC 25922 (a), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (b) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (c).

#### 12.6.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

Se utilizó la metodología descrita por Taroco y col. (2006). Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los discos estériles de papel filtro Whatman #1 (2.5 µm) de 6 mm de diámetro se dejaron en contacto durante 24 h con los diferentes tratamientos que fueron; antibióticos como controles positivos para la inhibición bacteriana; siendo gentamicina (5 mg/ml) para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y cloranfenicol (5 mg/ml) como control positivo para de *Staphylococcus aureus*. Y como control negativo se utilizó agua destilada estéril. La actividad antibacteriana se evaluó en tres muestras de nanopartículas de plata; N100, N450 y N500, cada muestra se ajustó a 5 mg/ml en agua destilada estéril (Azam, Ahmed, Arshi, Chaman, & Naqvi, 2009) y se homogenizó en un baño ultrasónico 8892 de 60 Hz a 25°C/ 30 minutos (Guzmán, Dille, & Godet, 2012).

Antes de realizar cada determinación, las cepas se sembraron en agar nutritivo e incubaron a 37°C/24 h para obtener un cultivo fresco. Al observar el crecimiento adecuado, se prepararon inóculos con cada una de las cepas en solución salina al 0.85%, el inóculo se ajustó entre 0.08-0.09 de absorbancia a 625 nm (0.5 en escala de McFarland) con un espectrofotómetro UV-Visible Velab, modelo VE-5100UV.

A continuación, se introdujo un hisopo de algodón estéril en el inóculo bacteriano preparado y se sembró en la placa de Agar Müller Hinton con estría en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la placa, este procedimiento se repitió dos veces más rotando la placa 60°.

En las placas con agar Müller Hinton inoculadas con cada cepa correspondiente, se colocaron los discos de papel filtro impregnados con cada tratamiento respectivo. Estas placas se dividieron previamente en 5 secciones, en cada sección se colocó un disco con el control positivo, un disco con el control negativo y tres discos con la muestra de nanopartículas de plata correspondiente y se dejaron secar durante 20 minutos. Finalmente, las placas se incubaron a 37°C/24

h y se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos y se calculó el porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, se utilizó la fórmula establecida por Martínez (1996).

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{Diámetro halo de inhibición Muestra}}{\text{Diámetro halo de inhibición control positivo}} \times 100$$

#### 12.6.2. DETERMINACIÓN DE CMI Y CMB

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) se determinaron mediante el método de las diluciones seriadas en tubos de ensaye con medio caldo nutritivo de acuerdo con la metodología descrita Taroco y col. (2006) y Sánchez y col. (2016). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Se colocó 1 mL de las diferentes muestras de nanopartículas de plata: N100, N450 y N500, las cuales fueron preparadas como se mencionó anteriormente, las concentraciones que se evaluaron fueron desde 5 mg/ml hasta 0.78 µg/mL, se incluyeron dos controles de crecimiento bacteriano un control positivo al cual se inocularía posteriormente (1 mL de agua destilada), y un control negativo (1 mL de agua destilada). Posteriormente se colocó 1 mL de caldo nutritivo a cada tubo.

A continuación, se preparó la suspensión del inóculo de cada cepa en estudio; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, la concentración del inóculo empleada en este experimento se ajustó a 0.5 en la escala de McFarland (absorbancia 0.08-0.09 a 625 nm) y se diluyó 1:200 en caldo nutritivo. Se añadió 1mL de inóculo respectivamente en cada uno de los tubos que contenían la dilución correspondiente de nanopartículas de plata a analizar, así como en el control positivo y en el control negativo se agregó 1mL de caldo nutritivo sin inóculo para igualar los volúmenes. Los tubos se incubaron a 37°C/24 h. Los resultados se expresaron de la siguiente manera:

La CMI (Concentración mínima inhibitoria) correspondió a la mínima concentración de nanopartículas de plata en donde no se observó desarrollo (turbidez). La CIM se expresó en µg/mL.

La CMB (Concentración mínima bactericida) se determinó con la verificación del crecimiento bacteriano en cada tubo por siembra en placa. Se inocularon por triplicado 20µL de caldo de cada uno de los tubos en agar nutritivo y se incubaron a 37°C/24 h. Y se estableció como CMB a la ausencia de crecimiento de bacterias en la caja Petri (Struthers y Westran, 2005). La CMB se expresó en µg/mL.

## 13. RESULTADOS

### 13.1. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

A continuación se presentan los resultados y discusión de los resultados obtenidos por las distintas técnicas de caracterización.

En la figura 24, se presentan los resultados de absorbancia de: mucílago de linaza hidratado, nitrato de plata y el coloide Ag/mucílago. Para el espectro de absorbancia del coloide, se observa que presentan dos absorbancias del plasmón, alrededor de 399 nm y 420 nm. Las cuales son relacionadas a la absorción de plata cuadrupolar y a la plata dipolar, respectivamente. En base a esto, podemos asociar que la intensidad de absorbancia en 399 nm corresponde a un tamaño de partícula de 10 nm, mientras que la banda en 420 nm, se asocia a tamaños de 50 nm aproximadamente y a una morfología esférica, tal como reporta Hlaing y col (2016). Lo cual concuerda con lo reportado por Mohanty y Jena (2017), quienes obtuvieron nanopartículas de plata esféricas de tamaños 15-35 nm con extracto de *D. indica*, las cuales mostraron una banda de absorción alrededor 421 nm.

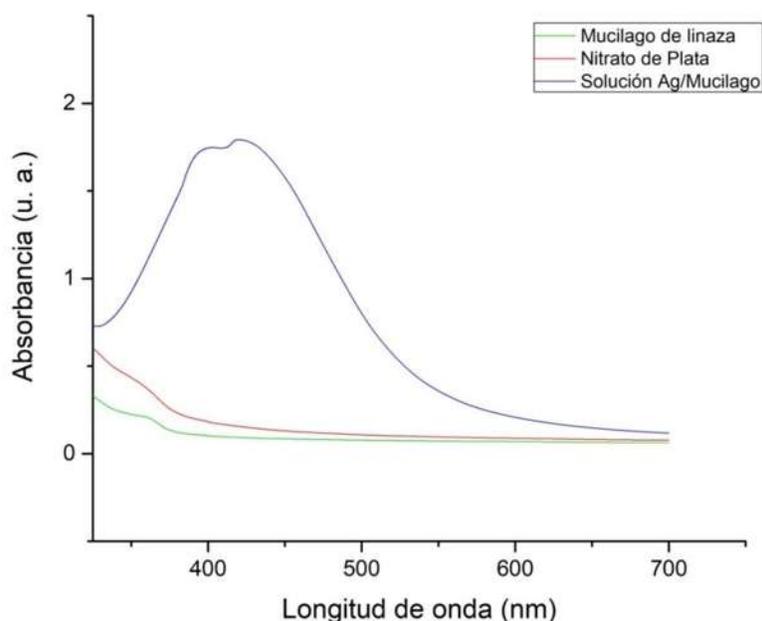


Figura 24. Espectro UV-Vis de solución acuosa Ag/Mucílago linaza.

En la caracterización por espectroscopía de infrarrojo, el mucílago de linaza en polvo (Figura 25) muestra una banda en  $3297\text{ cm}^{-1}$ , característica de la vibración de tensión de los grupos O-H atribuida a grupos alcoholes primarios y secundarios que se enlazan a los iones de plata (Suarez y col., 2017; Prasannaraj y Venkatachalam, 2017); esta banda puede atribuirse a los hidroxilos presentes en la ramnosa y la xilosa del mucílago. La banda observada en  $1612\text{ cm}^{-1}$  se debe a la vibración de tensión del enlace C=C en anillos aromáticos (Mohanty y Jena, 2017), puede interpretarse como el enlace presente en los compuestos fenólicos, flavonoides y taninos del mucílago. Mientras que las bandas en  $2922\text{ cm}^{-1}$  y  $1403\text{ cm}^{-1}$ , son características de las vibraciones de tensión del grupo C-H presente en carbohidratos (Prasannaraj y Venkatachalam, 2017; Cerchiaro y col., 2005). El pico característico del enlace C-H unido a un anillo aromático se observa en  $801\text{ cm}^{-1}$  (Prasannaraj y Venkatachalam, 2017). Las bandas en  $1037\text{ cm}^{-1}$  y  $617\text{ cm}^{-1}$  que son características de la vibración de tensión de grupos C-O-H y C-O, que están presentes en polisacáridos y en la D-xilosa (Weircigroch y col., 2017).

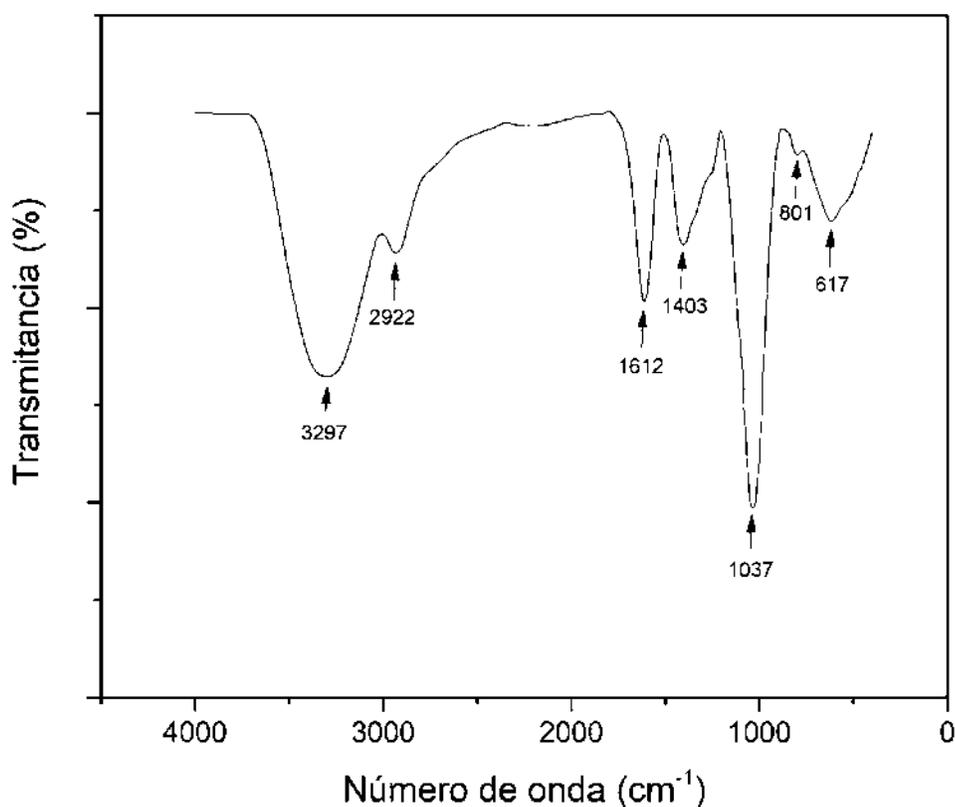


Figura 25. Espectro FTIR de mucílago de linaza en polvo.

La muestra de Ag-NPs tratada a 100 °C (N100), arrojó un gráfico (Figura 26) donde se pueden apreciar bandas presentes también en el espectro FTIR del mucílago, lo cual nos indica la conservación de los enlaces a lo largo de la reacción de síntesis con un ligero cambio en la vibración, ya que sufrieron un desplazamiento hacia la derecha; estas bandas son asociadas: en 3297  $\text{cm}^{-1}$  (vibración O-H), 2914  $\text{cm}^{-1}$  (vibración C-H unido a alcano), 1595  $\text{cm}^{-1}$  (vibración C=C en anillo aromático) y 794  $\text{cm}^{-1}$  (vibración C-H unido a un anillo aromático). También, se distingue una banda en 2346  $\text{cm}^{-1}$  perteneciente a la vibración del grupo C≡N y otra banda en 2102  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al enlace C≡C (Ramírez, 2017). En 1290  $\text{cm}^{-1}$  tenemos una banda que refiere una vibración de tensión del grupo C-N (Al-Shalafeh y col., 2017), la aparición de estas bandas nos indica la interacción entre los átomos de carbono, presentes en los esqueletos carbonados del mucílago, y los átomos de nitrógeno, provenientes del nitrato de plata. Finalmente, la banda en 1010  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra relacionada con el grupo C-OH de alcoholes secundarios (Ajitha y col., 2016).

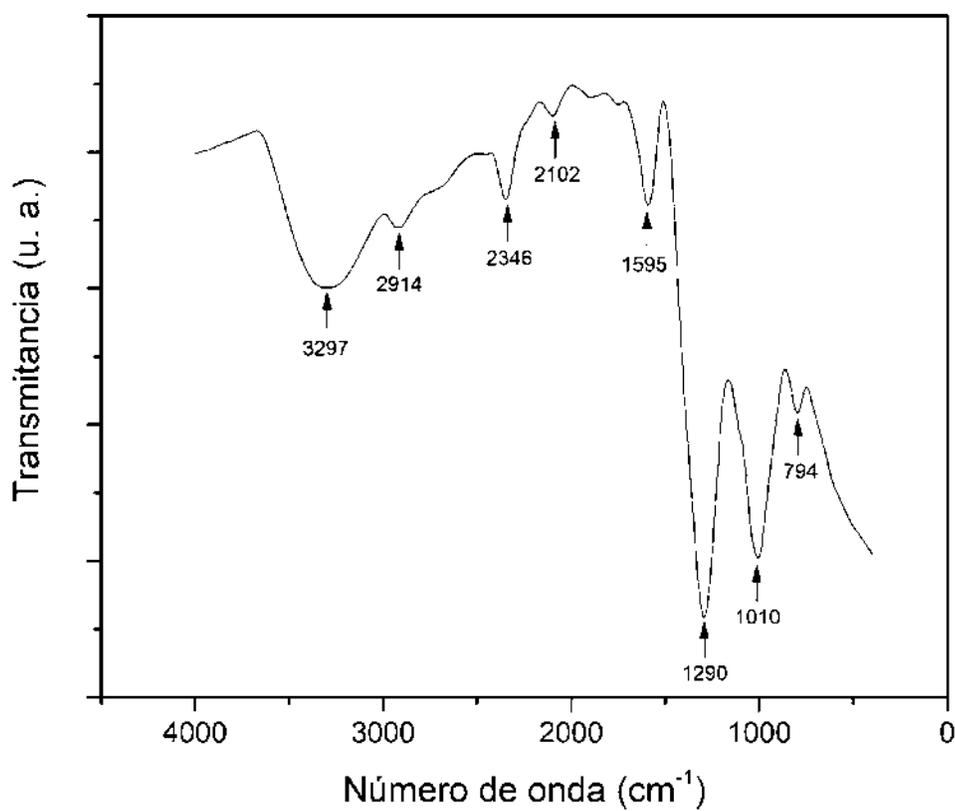


Figura 26. Espectro FTIR de muestra tratada a 100 °C.

Los espectros FTIR arrojados por las muestras calcinadas a 450 °C (Figura 27) y 500 °C (Figura 28) mostraron las mismas bandas vibracionales en 2337  $\text{cm}^{-1}$  [vibración  $\text{C}\equiv\text{N}$  (Ramírez, 2017)], 2093  $\text{cm}^{-1}$  [vibración  $\text{C}\equiv\text{C}$  (Ramírez, 2017)] y 845  $\text{cm}^{-1}$  [vibración de tensión  $\text{C}-\text{N}$  (Al-Shalalfeh y col., 2017)]. Las banda en 1395  $\text{cm}^{-1}$  observada en la muestra N450 se encuentra ligeramente desplazada hacia la derecha, respecto a la banda en 1403  $\text{cm}^{-1}$  de la muestra N500; éstas, corresponden a la vibración de tensión del grupo  $\text{C}-\text{N}$  (Al-Shalalfeh y col., 2017). Esto nos devela la permanencia de los enlaces  $\text{C}-\text{N}$ ,  $\text{C}\equiv\text{C}$  y  $\text{C}\equiv\text{N}$ ; así como la eliminación de enlaces de carbono con elementos como hidrógeno y oxígeno en las muestras, al ser sometidas a tratamiento térmico de altas temperaturas.

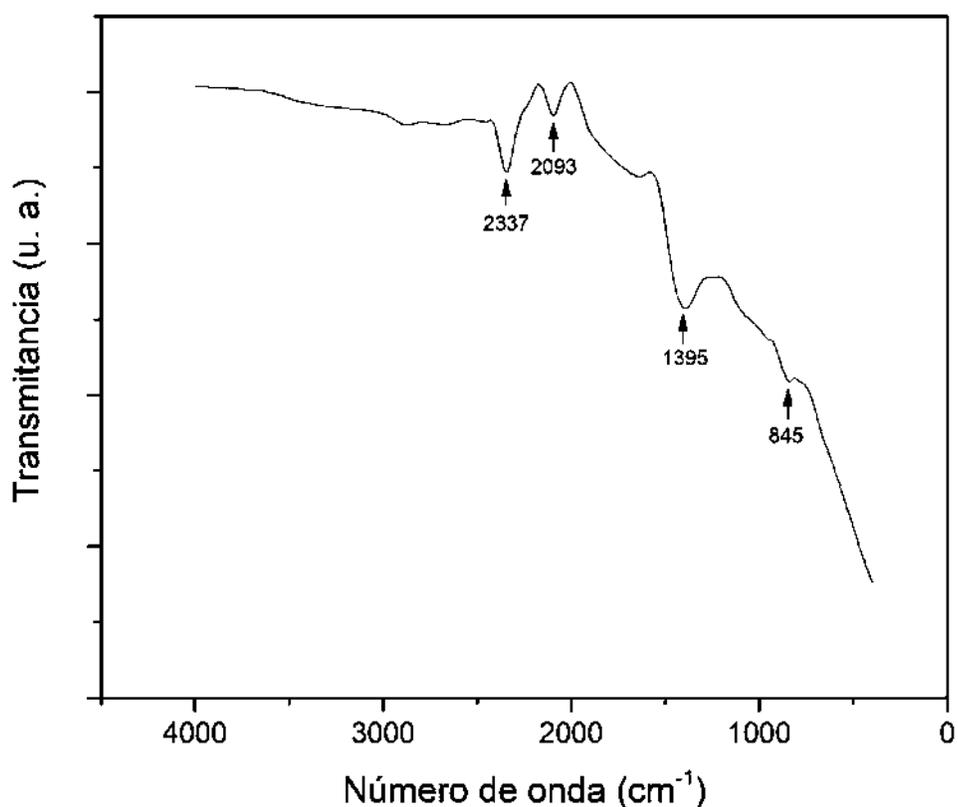


Figura 27. Espectro FTIR de muestra tratada a 450 °C.

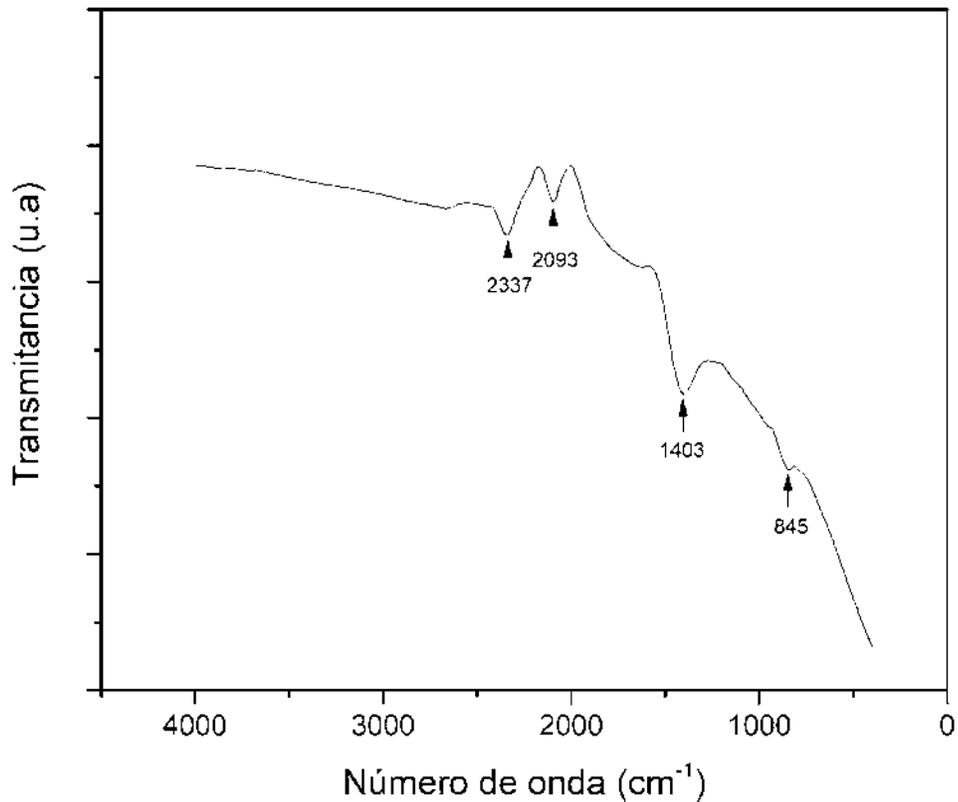


Figura 28. Espectro FTIR de muestra tratada a 500 °C.

De lo anterior, podemos concluir que para las muestras de N100, N450 y N500, la plata no forma parte de la red, esto puede asociarse a que la plata se encuentra de forma intersticial dentro de la red.

El análisis mediante difracción de rayos X mostró un difractograma para la muestra N100 (Figura 29), donde se observan los patrones de difracción de las nanopartículas de plata (número 1) que están asociados a los ángulos  $2\theta$ : 38.1°, 64.5° y 77.4°, los cuales corresponden a los planos cristalinos (111), (220) y (311) asociado a la estructura cúbica centrada en la cara (JCPDS 04-0783), respectivamente. Además, se perciben también picos de difracción de otros componentes de plata, como son: Nitrito de plata (número 2) asociado a los ángulos  $2\theta$ : 29.4°, 32.1°, 46.3°, 48.1° y 56.2°; y el Óxido de plata (número 3) en el ángulo  $2\theta$ : 42.2°. Asimismo, se observan picos de difracción correspondientes a componentes del muclago de linaza sin identificar en los ángulos 18.97°, 21.76°, 24.57°, 28.04°,

35.79°, 43.7°, 49.63°, 70.07°, 72.22° y 47.68°. Se calculó el tamaño de cristal en la muestra en el plano cristalino (111), utilizando la ecuación de Scherrer, cuyo valor fue de 0.0125 nm. Es importante mencionar que el tamaño de cristal no equivale al tamaño de partícula, ya que esta se encuentra conformada por aglomerados de cristales.

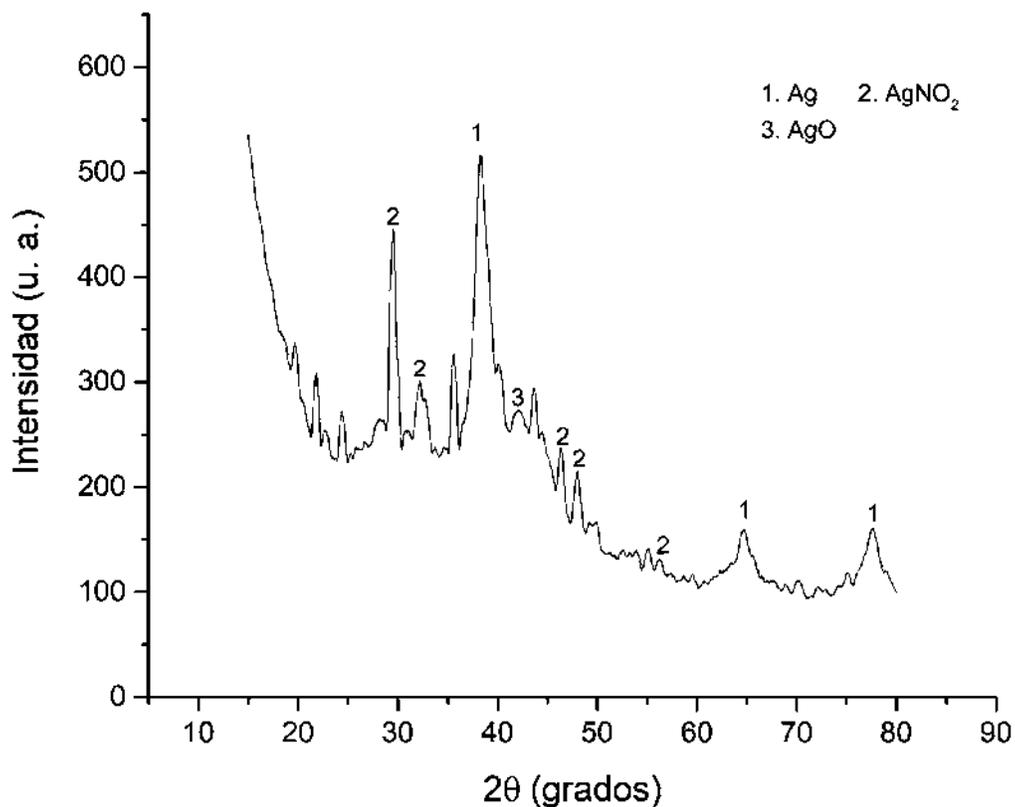


Figura 29. Difractograma de muestra tratada a 100 °C.

El espectro de difracción de rayos X de la muestra N450 (Figura 30), presenta los picos de difracción en ángulos en el espectro de difracción de rayos X asociados con la presencia de los patrones de difracción de las nanopartículas de plata (número 1) en los ángulos  $2\theta$ :  $38.1^\circ$ ,  $44.3^\circ$ ,  $64.4^\circ$  y  $77.3^\circ$ , cuyos planos cristalinos son correspondientes a los planos cristalinos (111), (200), (220) y (311) de la plata de estructuras cúbicas centradas en la cara (JCPDS 04-0783), respectivamente. De igual modo, se calculó el tamaño de cristal, que corresponde a 4.1983 nm.

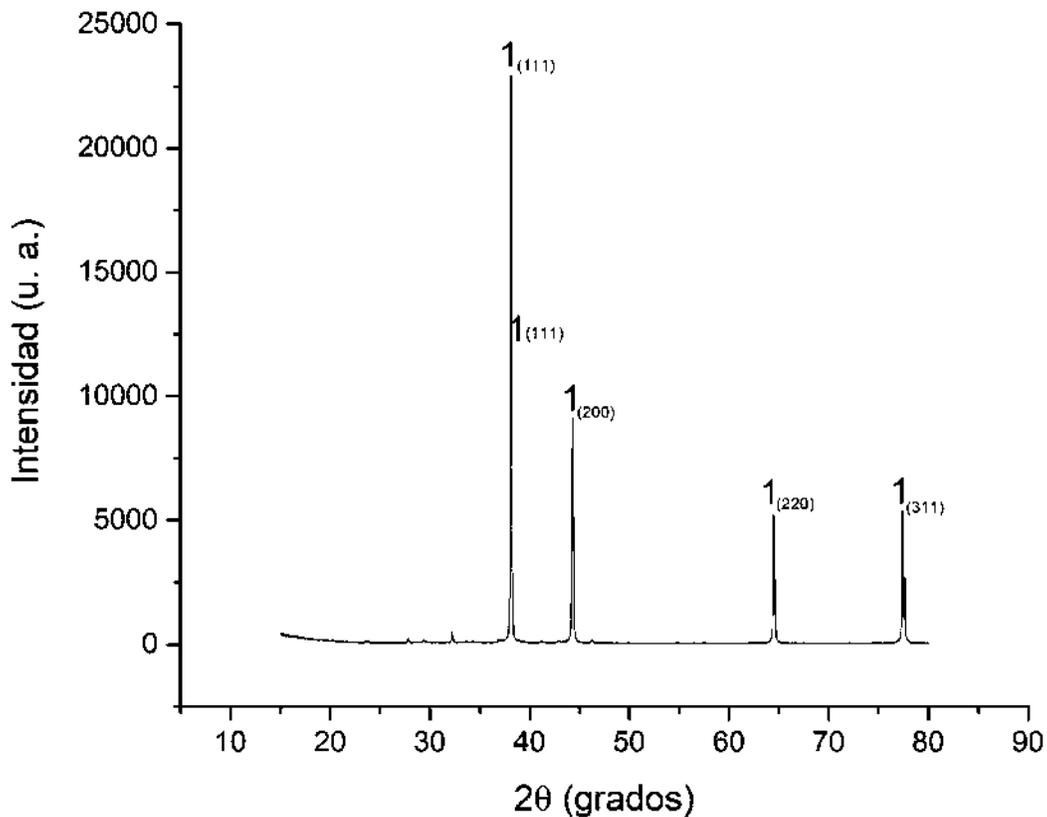


Figura 30. Difractograma de muestra tratada a  $450^\circ\text{C}$ .

Finalmente, en el espectro de difracción de la muestra N500 (Figura 31) se observaron los picos de difracción de las nanopartículas de plata (número 1) en los ángulos  $2\theta$ :  $38.16^\circ$ ,  $44.36^\circ$ ,  $64.34^\circ$ ,  $77.33^\circ$  y  $81.3^\circ$ , correspondientes a los planos cristalinos (111), (200), (220), (311) y (222) de la estructura cúbica centrada en la cara de la plata (JCPDS 04-0783), respectivamente. El tamaño de cristal obtenido fue de 6.0152 nm. La presencia de dicha estructura cristalina, nos exhibe que se han eliminado todos los compuestos residuales provenientes de la síntesis de nanopartículas de plata como eran los  $\text{NO}_x$ , óxidos y compuestos orgánicos, que corresponden al nitrato de plata y al mucílago de linaza. Por lo anterior, se puede concluir que las nanopartículas de plata fueron atrapadas dentro de la red conformada por el mucílago de linaza, esto fue verificado por medio de difracción de rayos x.

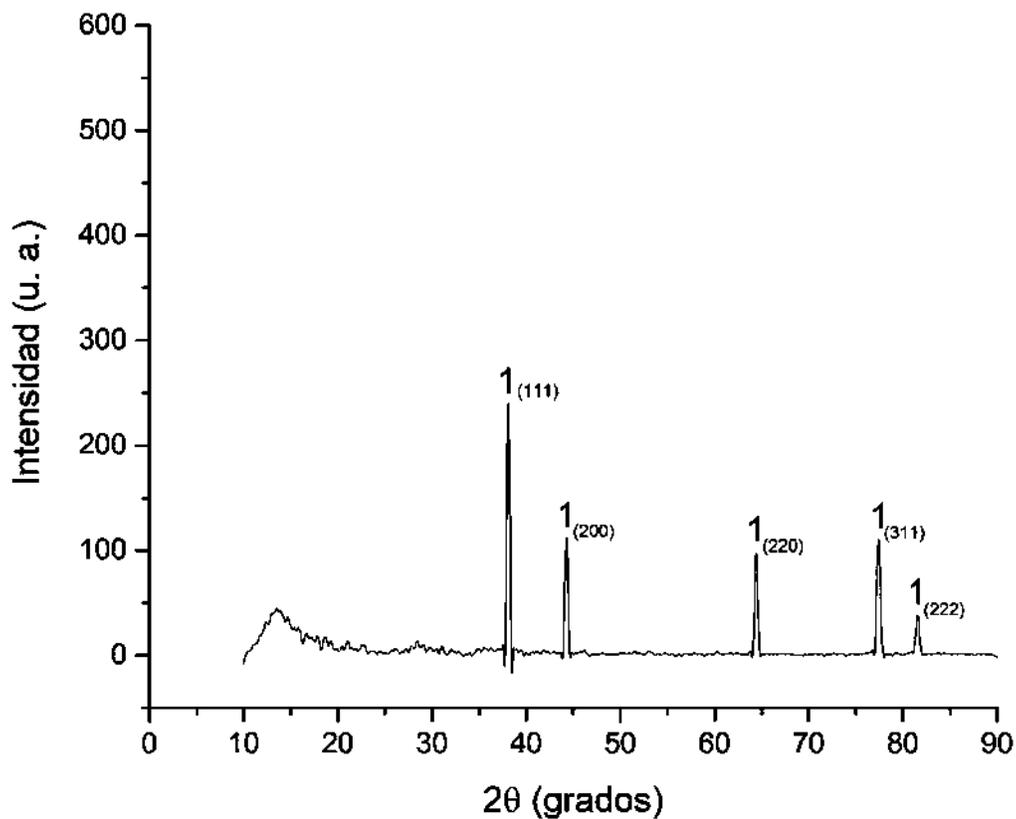


Figura 31. Difractograma de muestra tratada a 500 °C.

Se llevó a cabo la medición de tamaño de partícula en un NanoSizer en las 3 muestras: N100, N450 y N 500; las cuales fueron hidratadas con agua destilada en una concentración de 5 mg/mL y homogenizadas en baño ultrasónico; se utilizó el índice de la plata. La muestra N100 presentó diámetros de partícula de alrededor de 7.9 nm, 10.8 nm y 78.7 nm (Figura 32), con porcentajes de frecuencia de 38.07%, 50.48% y 30.22%, respectivamente; de esta manera, los resultados arrojados determinan que esta muestra tiene partículas de orden nanométrico; lo cual, coincide con los resultados arrojados por la técnica de espectroscopía UV-Vis.

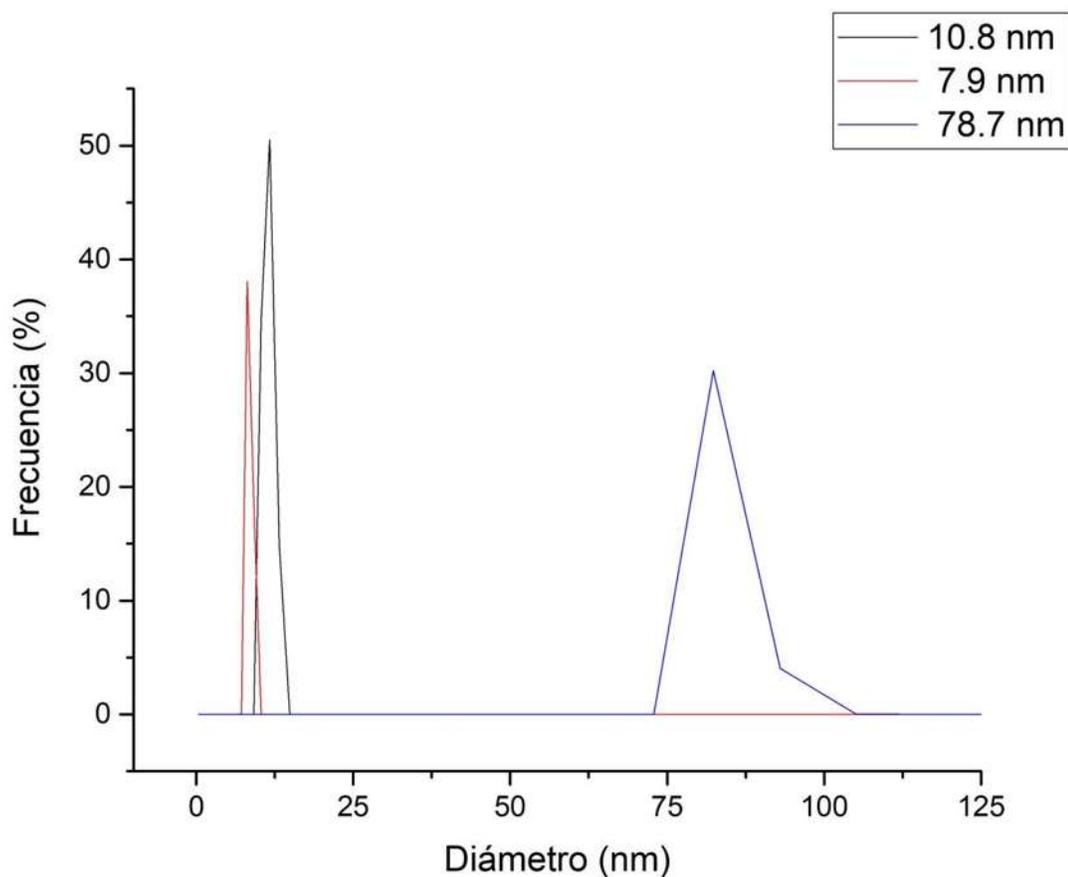


Figura 32. Tamaño de partícula en muestra N100.

De la misma manera, se determinaron los diámetros de partícula presentes en la muestra N450 (Figura 33), que fueron de 29.2 nm, 80.5 nm y 241.0 nm, correspondientes a porcentajes de frecuencia de 99.8%, 21.19% y 71.14%, respectivamente.

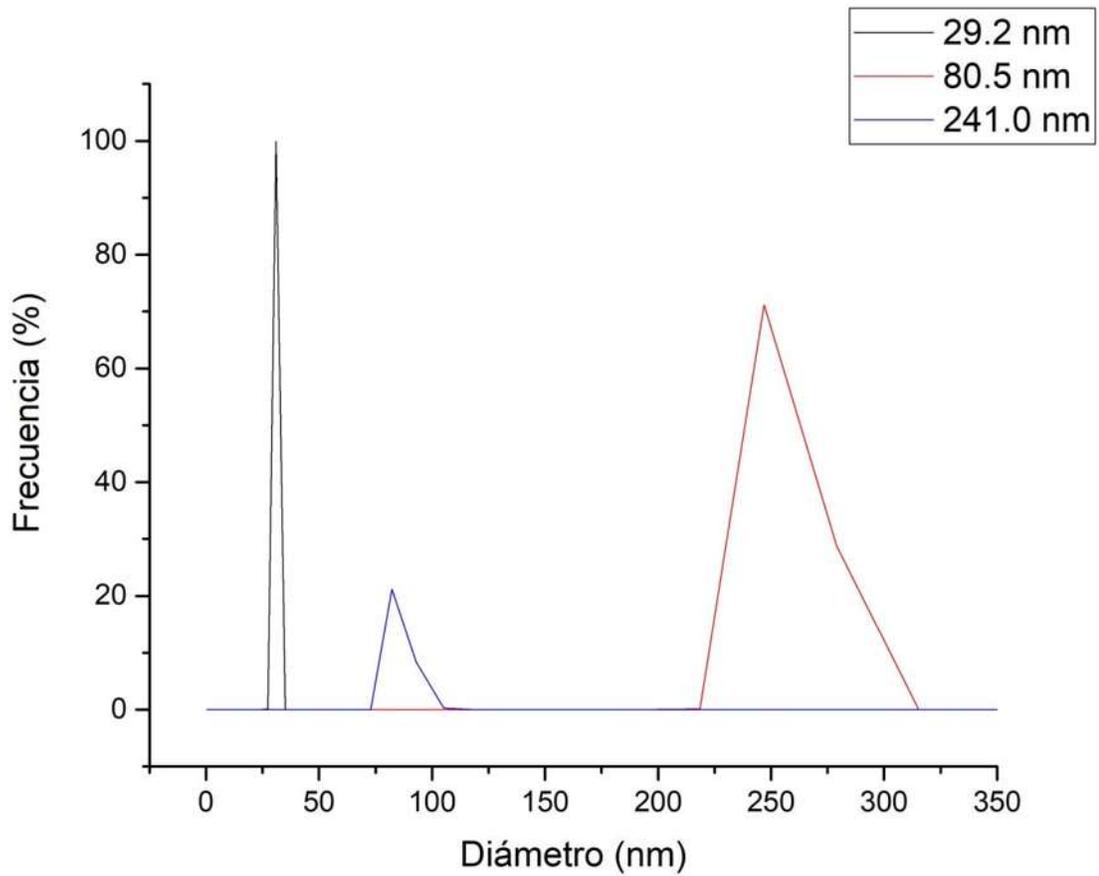


Figura 33. Tamaño de partícula en muestra N450.

Finalmente, los diámetros observados en la muestra N500 (Figura 34) fueron de 78.0 nm, 211.0 nm y 292.3 nm; con 94.53%, 79.7% y 12.72% de frecuencia, respectivamente.

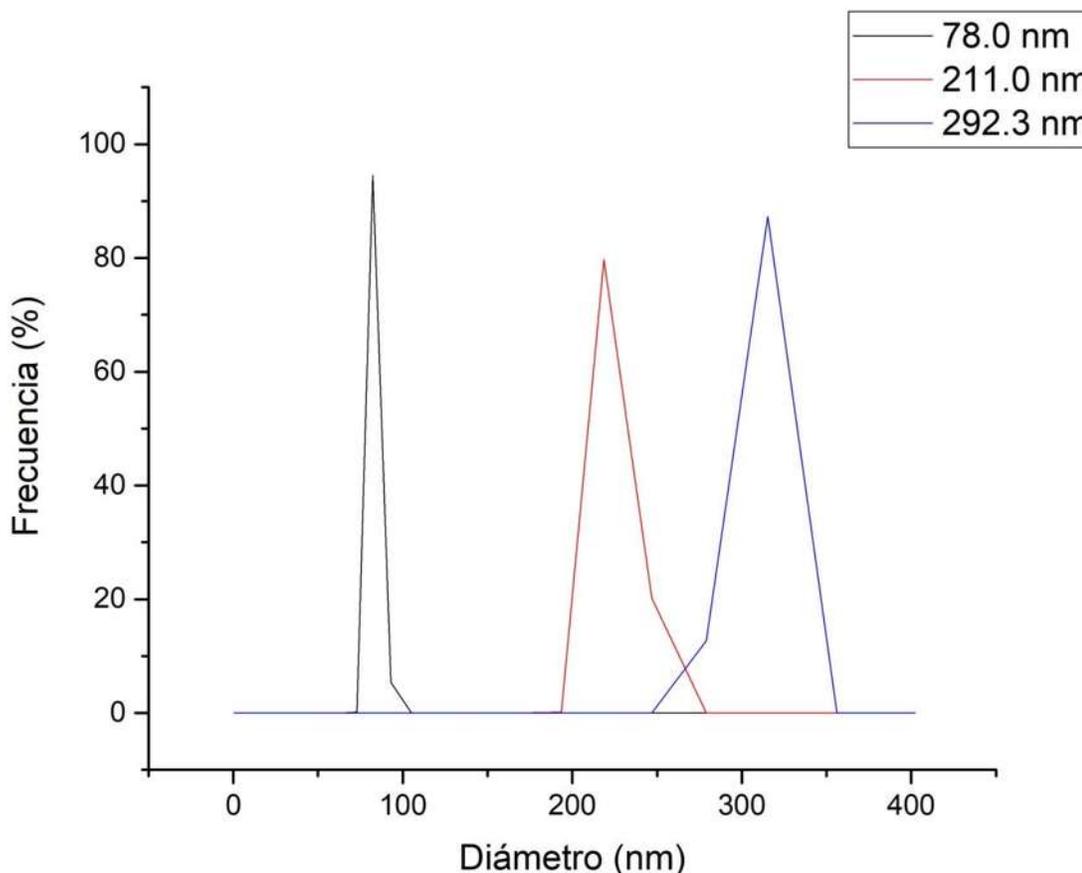


Figura 34. Tamaño de partícula en muestra N500.

Los resultados derivados de la medición de tamaño de partícula de las tres muestras nos indican el incremento de tamaño de partícula conforme aumenta la temperatura de tratamiento; esto puede deberse a la pérdida de la estructura del mucílago de linaza en la que se estabilizan las nanopartículas por los grupos O-H que se enlazan a los iones plata (Prasannaraj, 2017), lo que provoca que las nanopartículas formen agregados de tamaños mucho mayores.

A continuación, se presentan las imágenes obtenidas por medio de Microscopía Electrónica de Barrido. En la figura 35, inciso a, se presenta la micrografía del mucílago de linaza a 10000X, donde se observa la estructura en forma de red donde pueden albergarse las nanopartículas de plata. En el inciso b de la figura 35, la micrografía de las nanopartículas de plata secadas a 100°C a 60000X, muestra la existencia de partículas de orden menor a 100 nm, lo cual concuerda con el tamaño de partícula medido a través del Nanosizer que determina el tamaños de partícula menores a 100 nm. Además, se confirma la presencia de nanopartículas de plata de tamaño alrededor de 50 nm como se suponía en la caracterización por medio de espectroscopía UV-Vis.

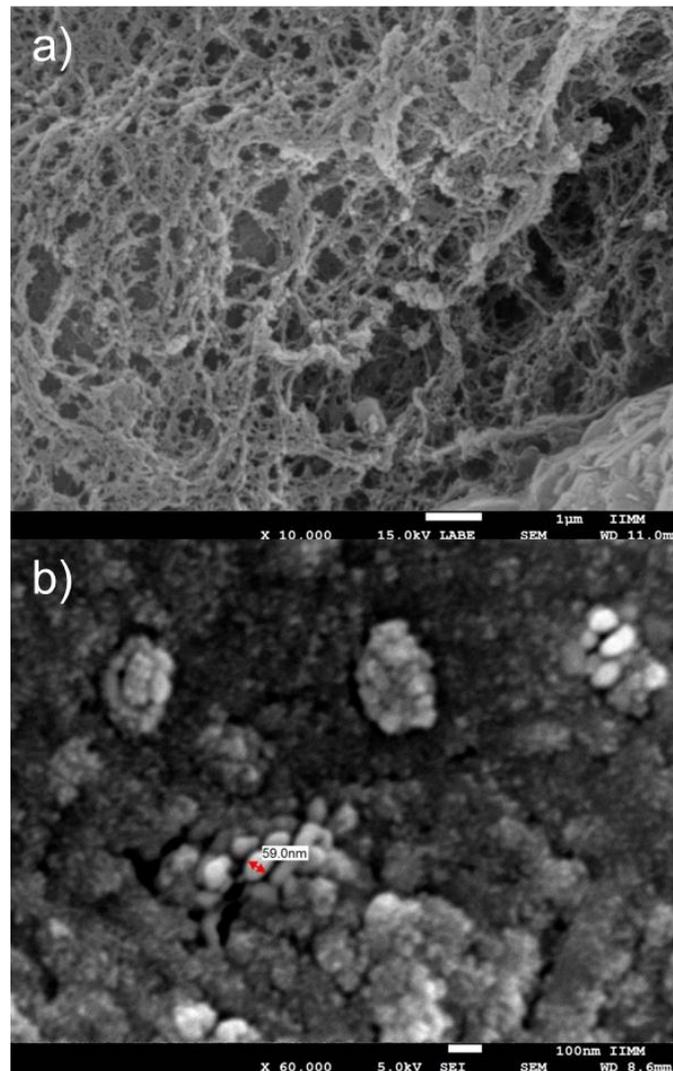


Figura 35. Micrografía MEB de: a) Mucílago de linaza; b) Muestra tratada a 100 °C.

En la figura 36 se presentan las micrografías de nanopartículas de plata tratadas a 450° a 40000X, en las cuales se puede observar que existen partículas de tamaños mayores a 100 nm; lo cual, corrobora los diámetros obtenidos por medición de tamaño de partícula. Se observan también aglomeraciones de nanopartículas en el medio, cuya presencia puede relacionarse con el aumento en los diámetros de la medición de tamaño de partícula, mencionados anteriormente.

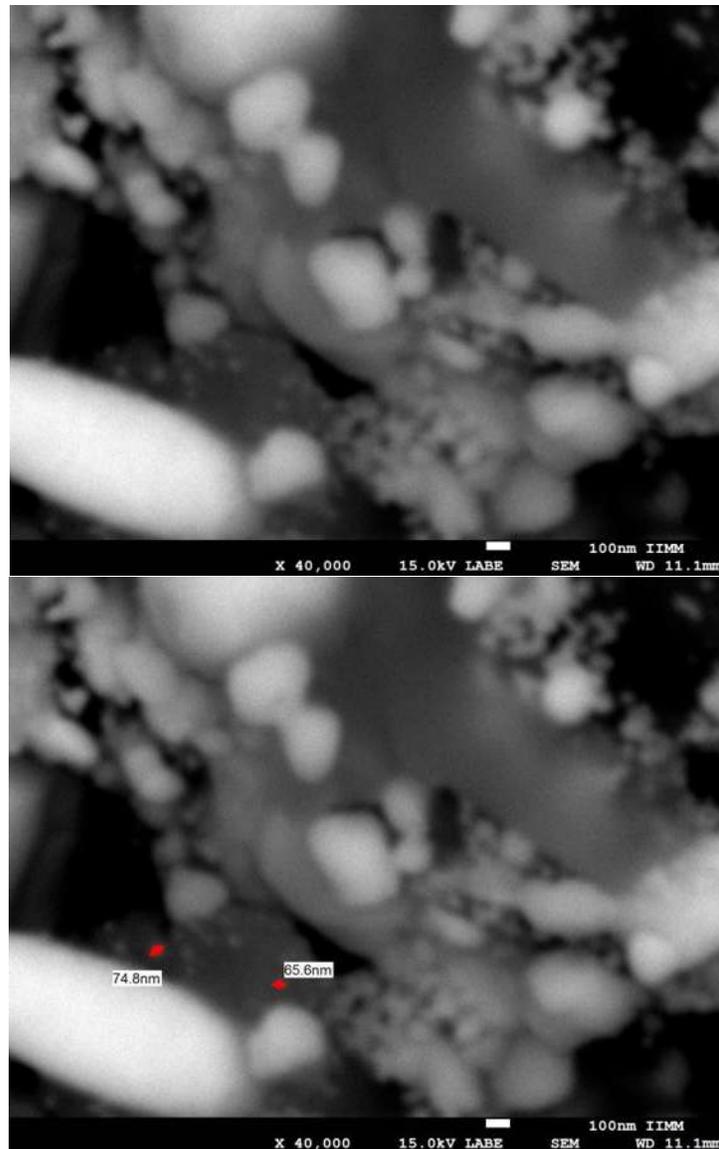


Figura 36. Micrografías MEB muestra tratada a 450 °C.

En la muestra N500 se observan nanopartículas de forma semejante a una esfera, con tamaños de partícula mayores a 100 nm (Figura 37); esto coincide con los diámetros de partícula resultantes de la medición en el Nanosizer. De igual manera, se advierten aglomeraciones de nanopartículas de plata.

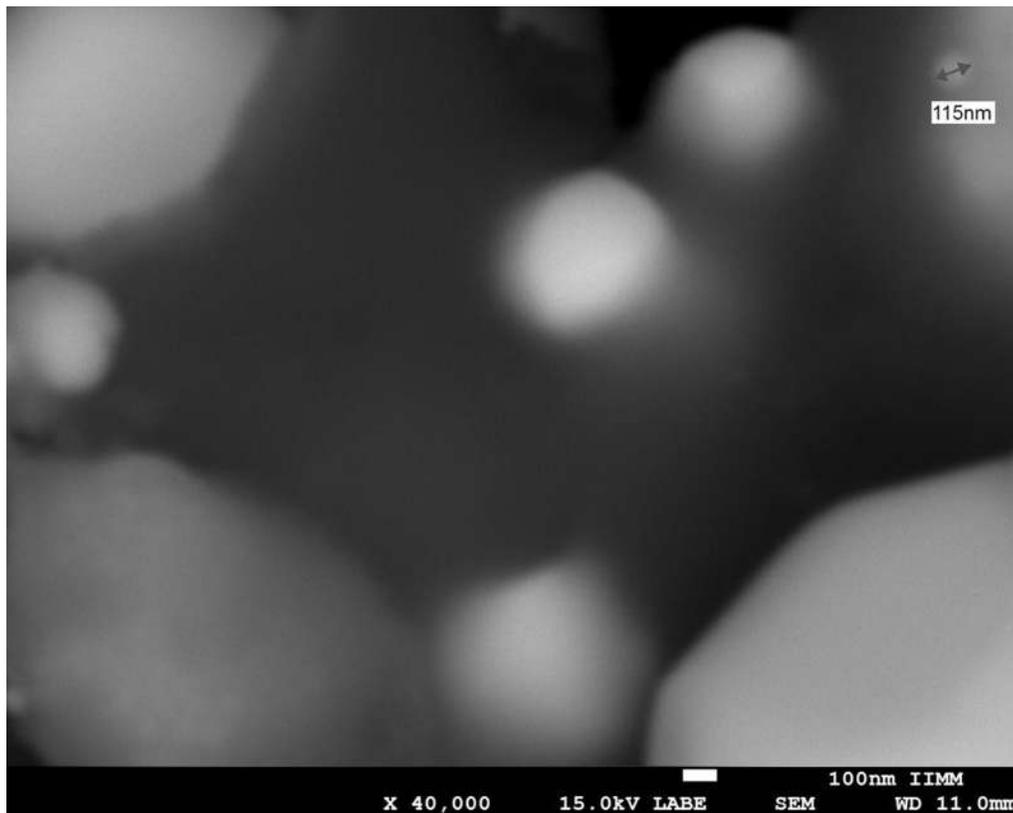


Figura 37. Micrografía MEB muestra tratada a 500 °C.

Adicionalmente, se llevó a cabo en cada una de las muestras un Espectroscopía por Dispersión de Energía (EDS por sus siglas en inglés) que aporta información sobre los elementos químicos presentes en cada una de las muestras:

i) El mucílago (Figura 38) presenta los siguientes elementos químicos: oxígeno, carbono, calcio, potasio y magnesio. Los cuales conforman la composición del mucílago de linaza, correspondiente a dos polisacáridos: uno neutro (Arabinosilanos neutros) y otro ácido (polisacáridos ácidos de ramnosa), compuestos fenólicos y los minerales del mucílago (Arenas, 2015).

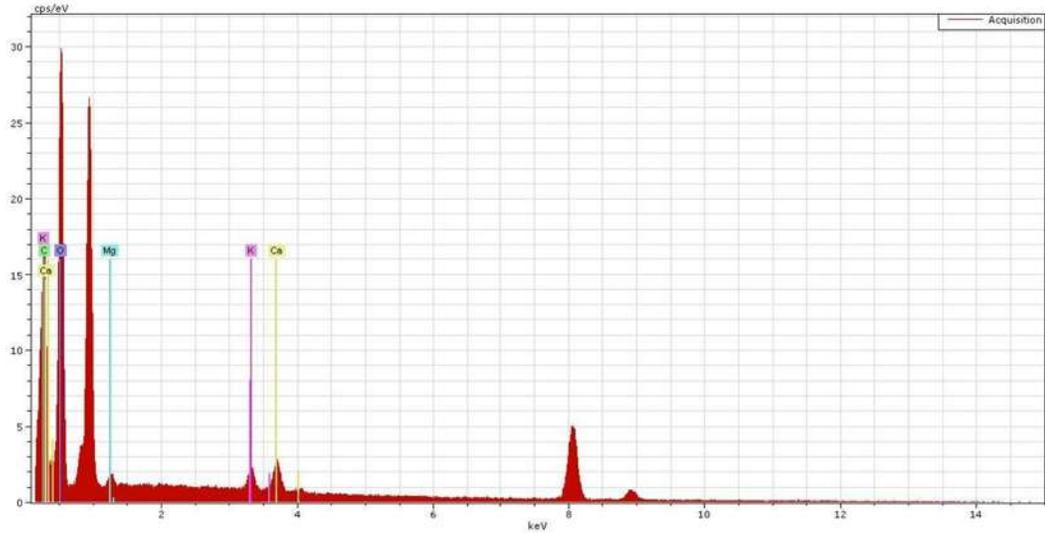


Figura 38. Microanálisis elemental de mucílago de linaza en polvo.

f) Para la muestra N100, se obtuvo la siguiente composición química (Figura 39): plata y sodio, asociada a las nanopartículas; oxígeno, carbono, magnesio, calcio y potasio, asociados a los azúcares y minerales del mucílago. El cobre presente es debido a la metalización de la muestra; por ello, no se toma como componente de la misma.

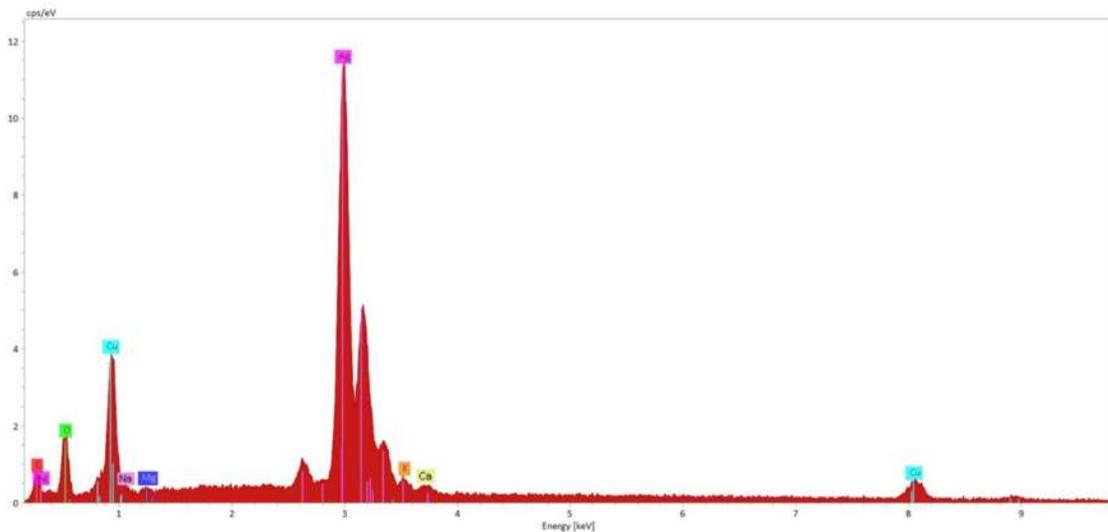


Figura 39. Microanálisis elemental de muestra N100.

g) La muestra N450, por otro lado, presentó una composición (Figura 40) de: sodio, plata, oxígeno, carbono, magnesio, calcio y potasio; se encuentran

remanentes de oxígeno y carbono existentes en la muestra, así como los minerales del mucílago de linaza.

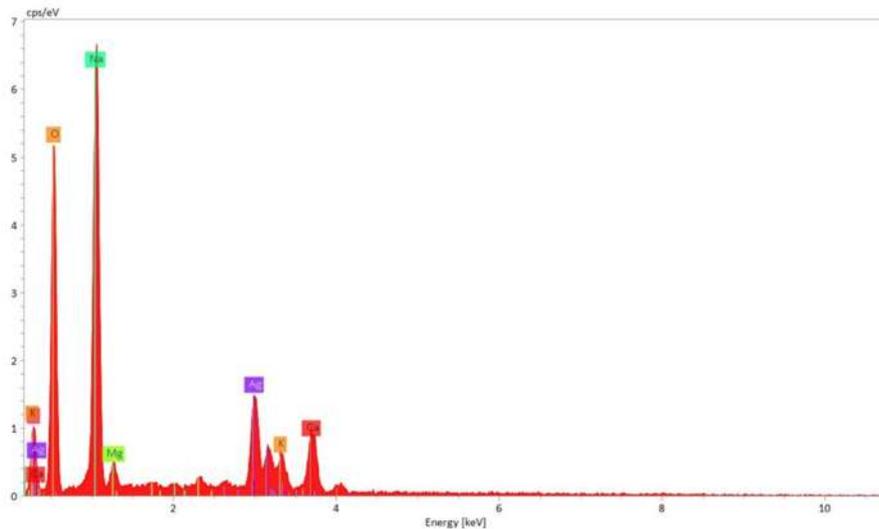


Figura 40. Microanálisis elemental de muestra N450.

h) Por último, en la muestra N500, su composición (Figura 41) fue de: oxígeno, carbono, magnesio, potasio, calcio, sodio y plata; indicando la permanencia de los minerales del mucílago. La presencia del oxígeno puede deberse al ambiente en el cual fue realizado el análisis; ya que, en los resultados por DRX no se muestran grupos que lo contengan.

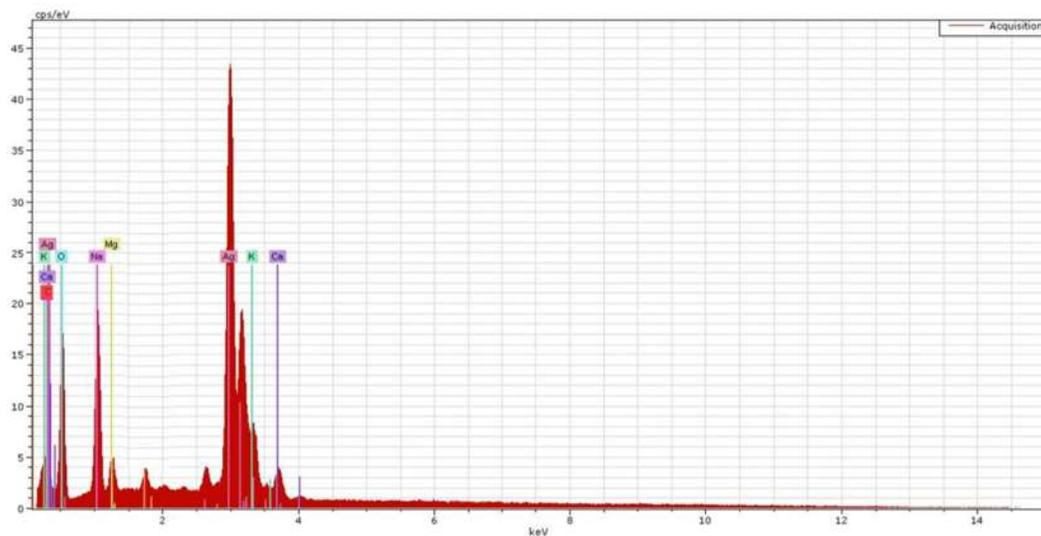


Figura 41. Microanálisis elemental de muestra N500.

### 13.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

En la figura 42, se observan los halos de inhibición promedio, obtenidos para los diferentes tratamientos que se evaluaron en *Escherichia coli* ATCC 25922. En la tabla 6, se presentan los valores de los halos de inhibición (mm), los porcentajes de inhibición respecto al antibiótico, de acuerdo a la ecuación presentada por Martínez (1996). Se puede observar que la muestra con mayor actividad antibacteriana sobre *E. coli* es N100 con un porcentaje de inhibición de 34.94%. El halo obtenido por la muestra N100 (9.67 mm), es muy cercano a  $9\pm 1.0$  mm, inhibición obtenida por Guzmán y col. (2012) al evaluar nanopartículas de plata de 10-20 nm, obtenidas con citrato de sodio; y menor al halo reportado por Singh y col. (2010) de  $15\pm 0.4$  mm, con 50 ppm de nanopartículas de plata de tamaños menores a 20 nm, sintetizadas con extracto de *Argemone mexicana*.

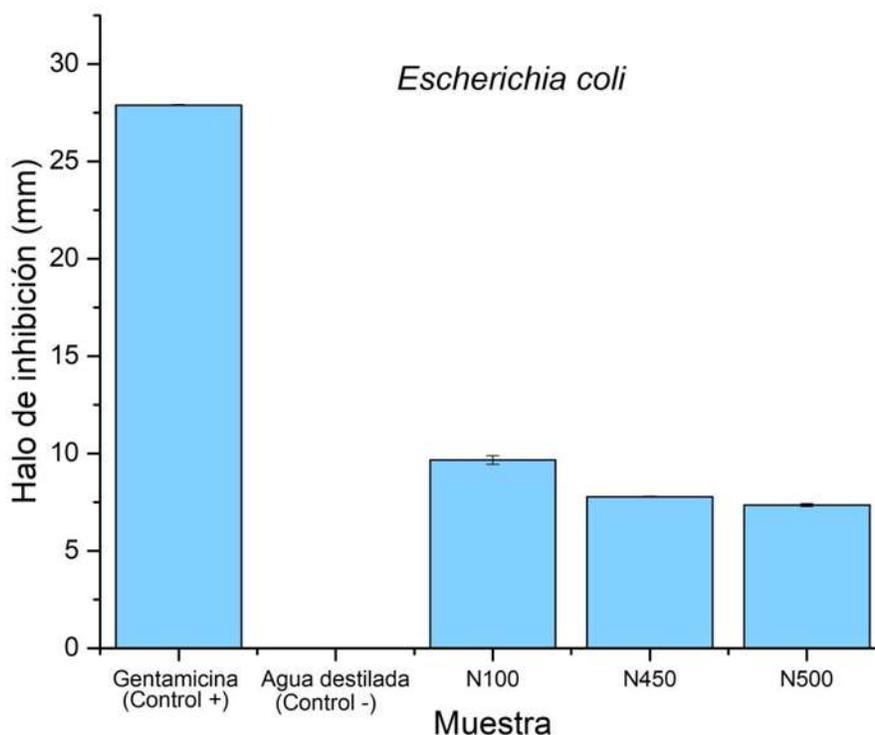


Figura 42. Gráfica de halos de inhibición promedio obtenidos por difusión en disco para *Escherichia coli*.

Muestra	Halos de inhibición (mm)	Procentaje de inhibición (%)
<b>N100</b>	9.67	34.94
<b>N450</b>	7.78	27.78
<b>N500</b>	7.34	26.19

Tabla 6. Halos de inhibición promedio y porcentajes de inhibición obtenidos por difusión en disco para *Escherichia coli*.

En la evaluación de la capacidad inhibitoria sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, por medio de la técnica de difusión en disco, se obtuvieron los resultados plasmados en la figura 43 y la tabla 7; de esta forma, podemos percibir que la muestra con mayor actividad inhibitoria fue N100, con un porcentaje de inhibición de 36.59%. Se obtuvo un halo de inhibición promedio de 11.22 mm, mayor a la inhibición obtenida por nanopartículas de plata obtenidas con citrato de sodio de  $9\pm 0.5$  mm (Guzmán y col, 2012); y al halo de inhibición de  $10\pm 0.5$  mm, con 50 ppm de nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de *Argemone mexicana* (Singh y col., 2010).

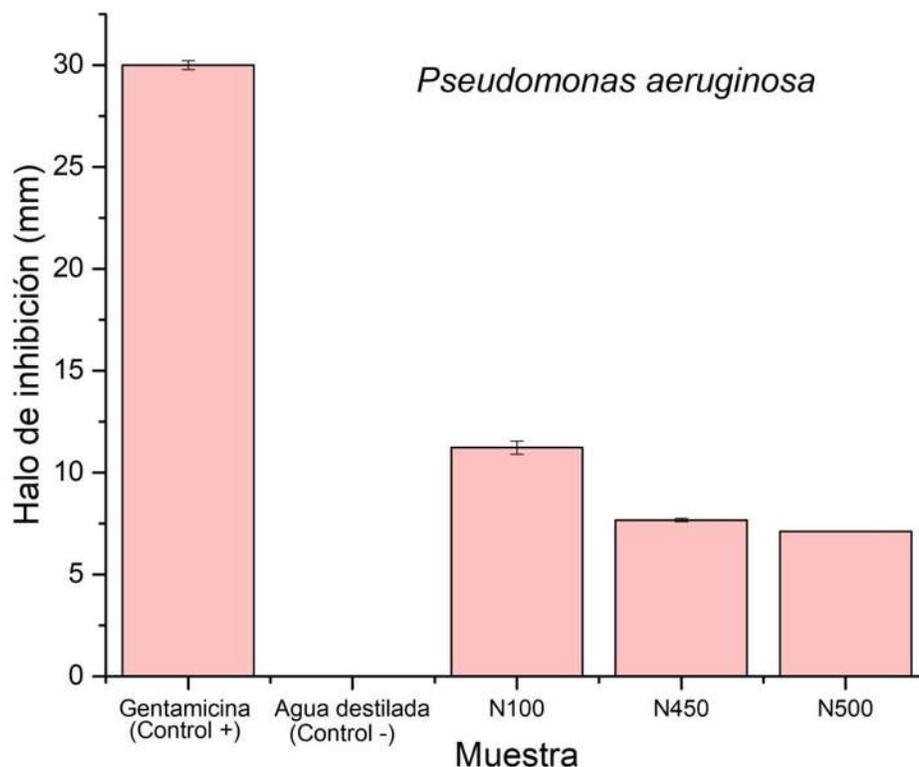


Figura 43. Gráfica de halos de inhibición promedio obtenidos por difusión en disco para *Pseudomonas aeruginosa*.

Muestra	Halos de inhibición (mm)	Porcentaje de inhibición (%)
<b>N100</b>	11.22	36.59
<b>N450</b>	7.67	25.84
<b>N500</b>	7.11	23.97

Tabla 7. Halos de inhibición promedio y porcentajes de inhibición obtenidos por difusión en disco para *Pseudomonas aeruginosa*.

Mientras que, para *Staphylococcus aureus*, los resultados (Figura 44 y tabla 8) arrojaron como porcentaje de inhibición superior el 41.25%, perteneciente a la muestra N100. El halo de inhibición promedio de dicha muestra fue de 11 mm, semejante a resultados reportados por Guzmán y col. (2012) con halo de  $12 \pm 0.4$  mm por nanopartículas sintetizadas con citrato de sodio; y el halo de 12.5 mm, reportado

por Govindaraju y col. (2010) al utilizar nanopartículas de plata de 14 nm, obtenidas con extracto de *Solanum torvum*.

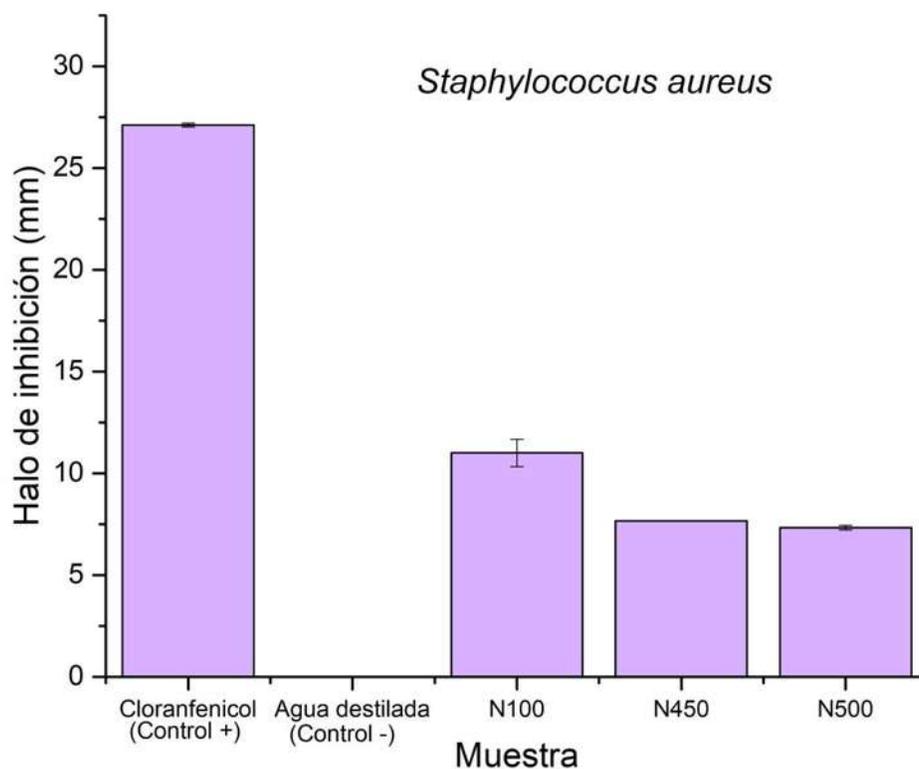


Figura 44. Gráfica de halos de inhibición promedio obtenidos por difusión en disco para *Staphylococcus aureus*.

Muestra	Halos de inhibición (mm)	Procentaje de inhibición (%)
<b>N100</b>	11	41.25
<b>N450</b>	7.67	28.05
<b>N500</b>	7.33	26.83

Tabla 8. Halos de inhibición promedio y porcentajes de inhibición obtenidos por difusión en disco para *Staphylococcus aureus*.

En la determinación de Concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la concentración mínima de nanopartículas necesaria para la inhibición del crecimiento de los microorganismos (Monge, 2009); se obtuvieron los resultados que se aprecian

en la figura 45 para *Escherichia coli*. Podemos notar que la muestra que mejor efecto antibacteriano tuvo fue N100 con una CMI de 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

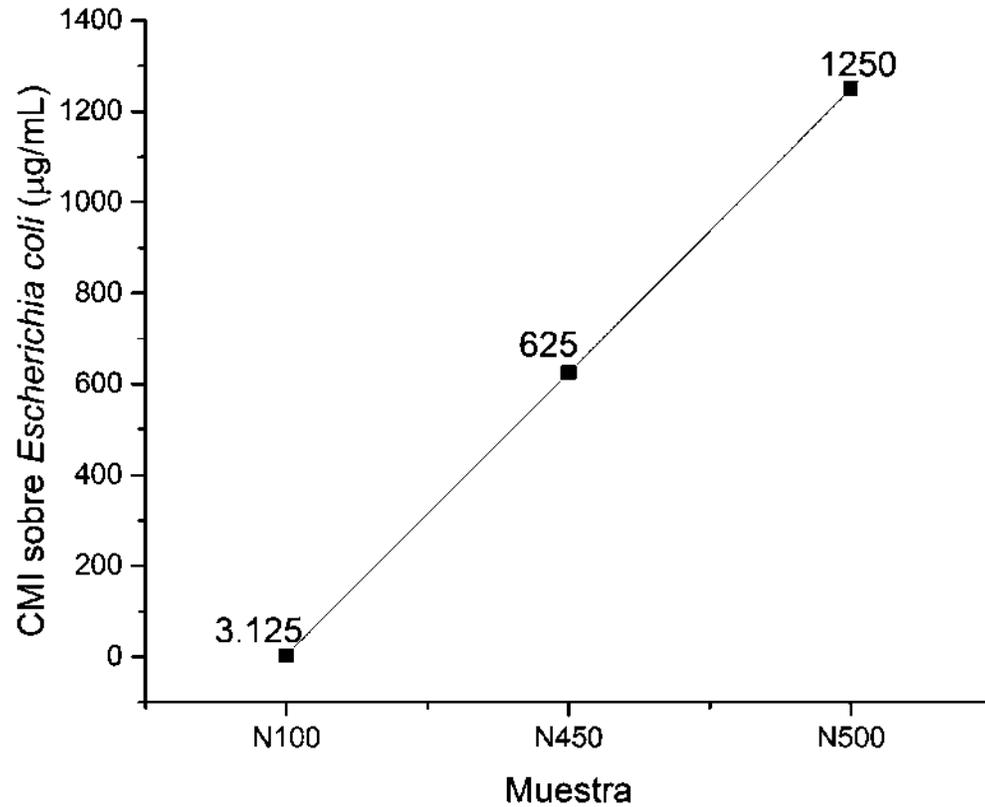


Figura 45. CMI sobre *Escherichia coli*.

En la evaluación para determinar la CMI sobre *Pseudomonas aeruginosa*, se obtuvieron los resultados presentes en la figura 46; con base en esto, se ve que la muestra con mayor efectividad inhibitoria es N100, nuevamente, con una CMI de 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

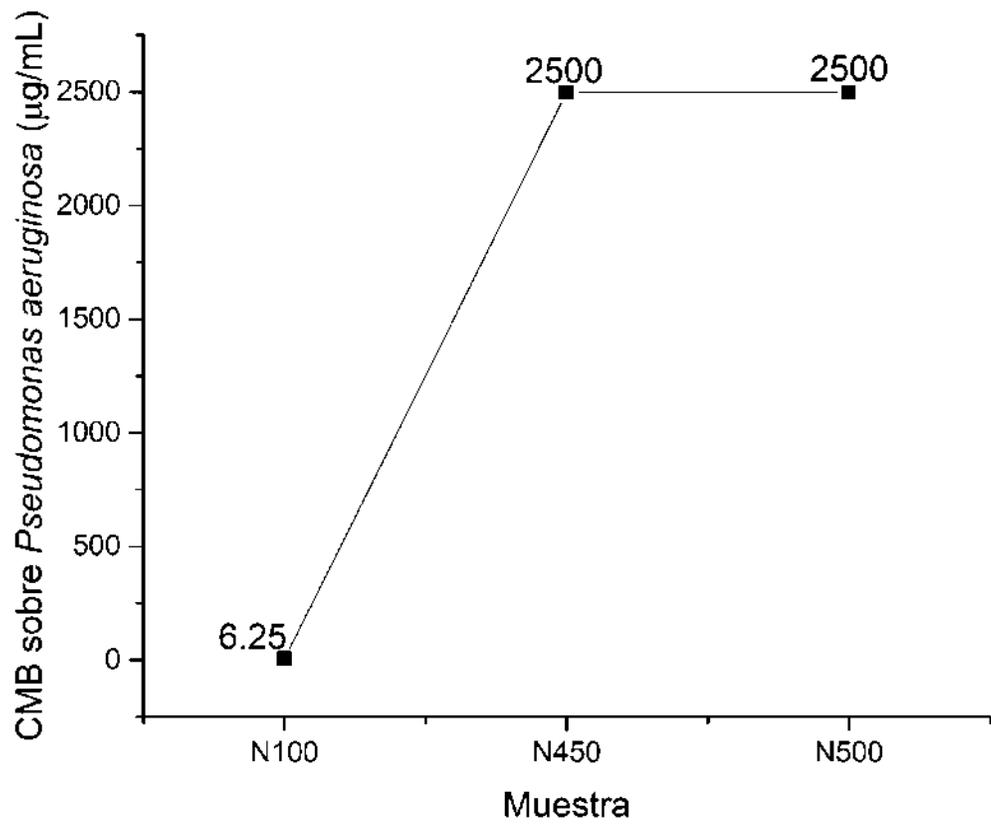


Figura 46. CMI sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Asimismo, en la valoración de la capacidad inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus* (Figura 47), se obtuvo como mejor resultado, el de la muestra N100 que tuvo una CMI de 12.5  $\mu\text{g/mL}$ .

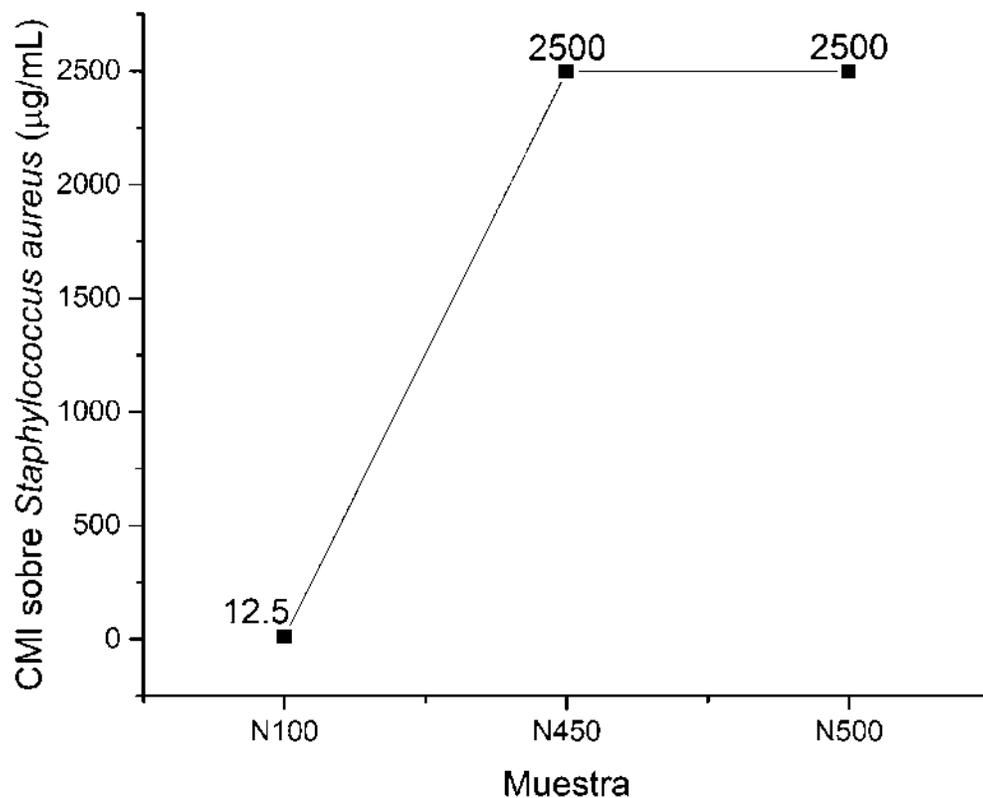


Figura 47. CMI sobre *Staphylococcus aureus*.

Al analizar los resultados obtenidos por las tres pruebas, se encontró que la muestra con más eficiencia fue N100. En la figura 48, se encuentra un gráfico de barras para analizar la capacidad inhibitoria de dicha muestra sobre los tres microorganismos ensayados; así, se deduce que la bacteria más sensible a las nanopartículas es *Escherichia coli*, seguida por *Pseudomonas aeruginosa* y, por último, *Staphylococcus aureus*. Se observa una CMI de 3.125  $\mu\text{g/mL}$  para *E. coli*, que coincide con la CMI de 3.38  $\mu\text{g/mL}$  en nanopartículas de plata de 25 nm obtenidas con maltosa (Sharma y col., 2009); y 12.5  $\mu\text{g/mL}$  para *S. aureus*, lo cual concuerda con los resultados de CMI (12.5  $\mu\text{g/mL}$ ) para nanopartículas de plata sintetizadas por el método organometálico, reportado por Monge (2009). Por otro lado, para *P. aeruginosa* se obtuvo una CMI de 6.25  $\mu\text{g/mL}$  muy cercano a una CMI de 6.75  $\mu\text{g/mL}$  reportada para nanopartículas de plata de 25 nm, obtenidas con maltosa (Sharma y col., 2009).

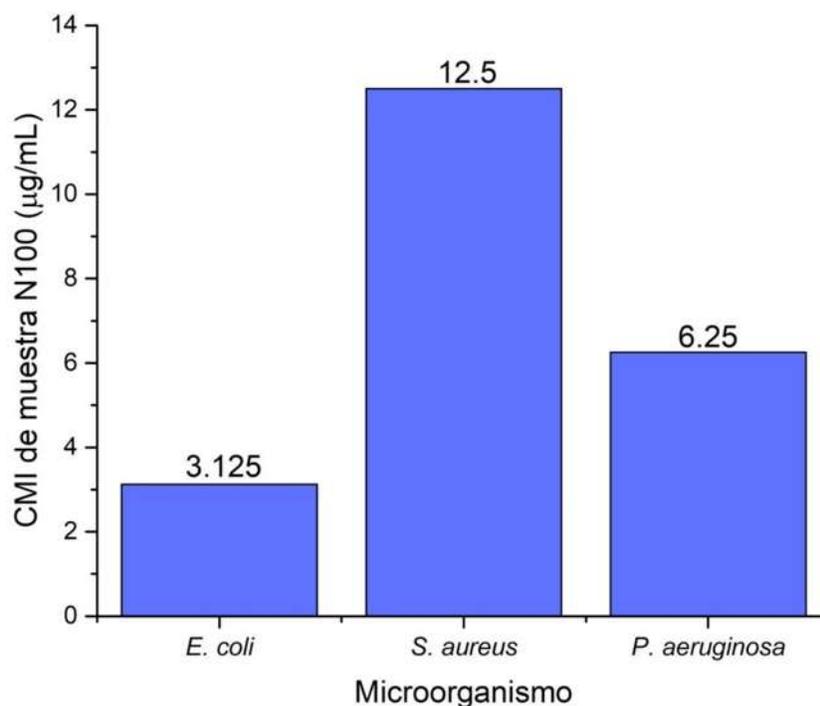


Figura 48. CMI de la muestra N100 sobre los tres microorganismos ensayados.

Por otro lado, en la determinación de Concentración mínima bactericida (CMB), que es la concentración mínima de nanopartículas necesaria para eliminar un 99.9% o más del inóculo bacteriano inicial a las 24 h de contacto entre las nanopartículas (Monge, 2009); se sembró en placa de agar nutritivo para observar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano. En la evaluación sobre *Escherichia coli* (Figura 49), se observó una mayor sensibilidad ante la muestra N100, cuya CMB fue de 6.25  $\mu\text{g/mL}$ .

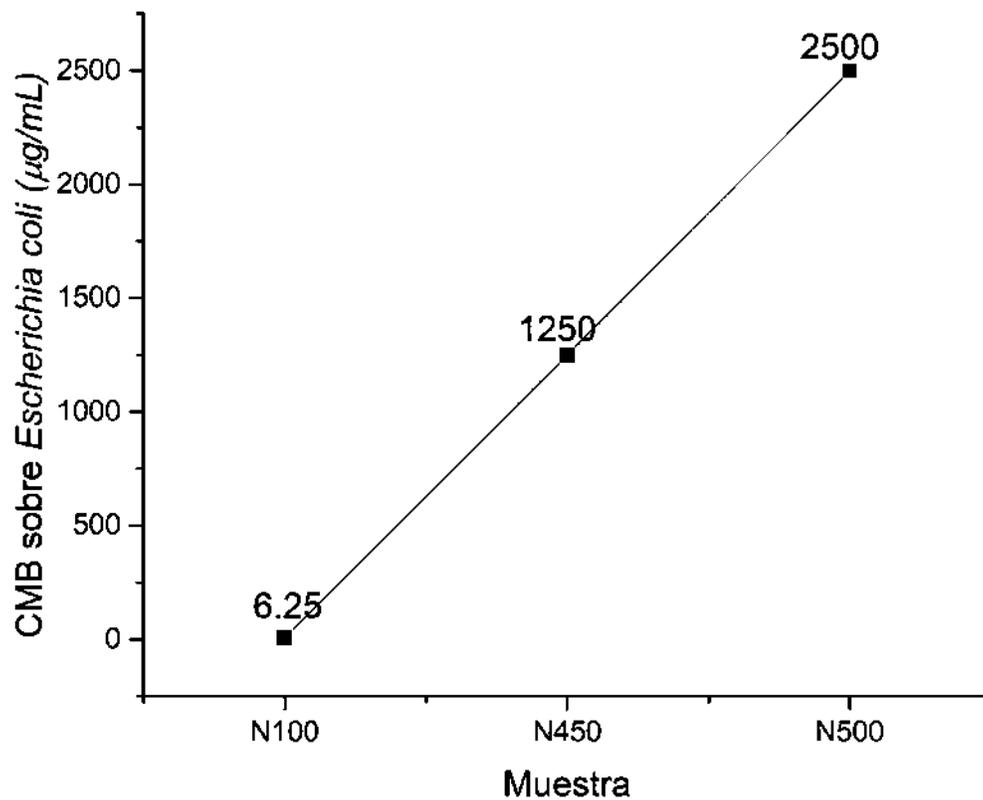


Figura 49. CMB sobre *Escherichia coli*.

De igual manera, la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* mostró una CMB menor en la muestra N100, respecto a las otras dos muestras (N450 y N500); la CMB fue de 12.5 µg/mL (Figura 50).

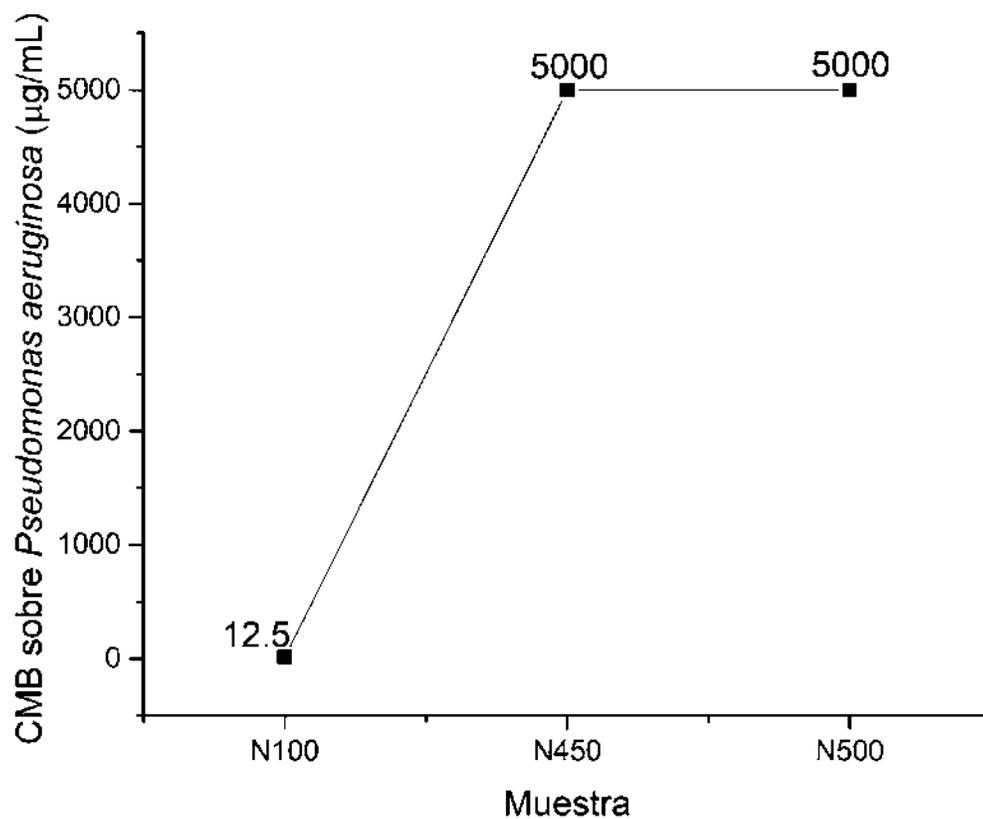


Figura 50. CMB sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Finalmente, la evaluación de CMB sobre *Staphylococcus aureus* (Figura 51), mostró una mejor actividad bactericida de la muestra N100, con CMB de 25 µg/mL.

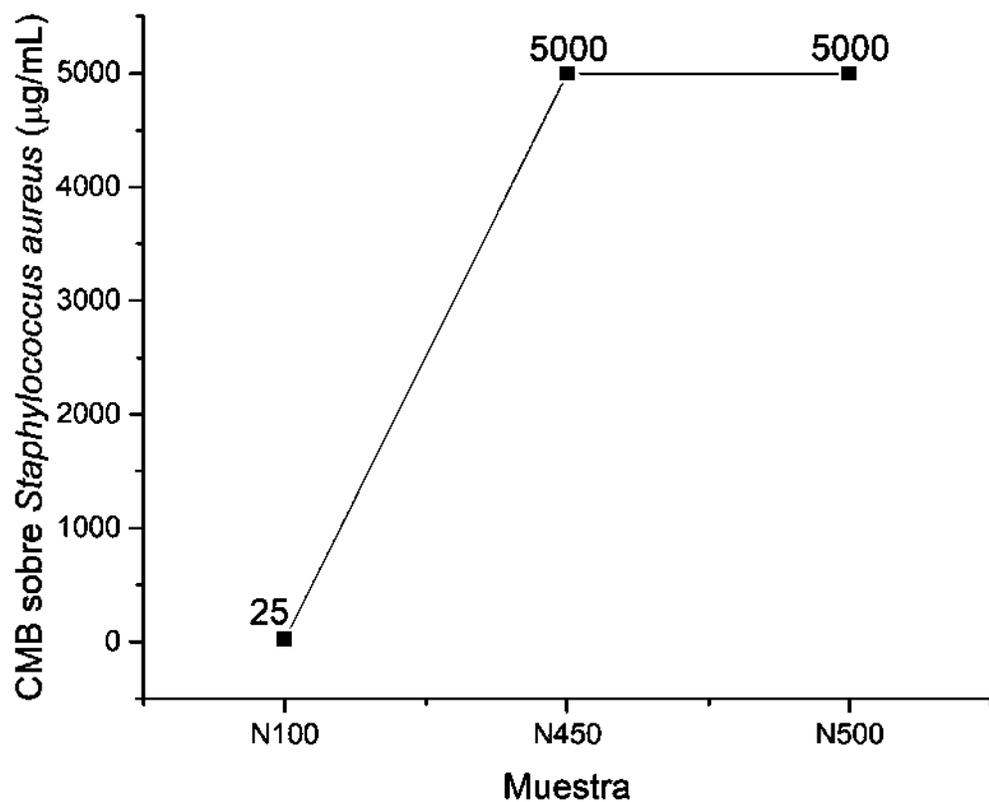


Figura 51. CMB sobre *Staphylococcus aureus*.

Del mismo modo que en el análisis de CMI, se organizaron las CMBs de la muestra N100 sobre los tres microorganismos ensayados en un gráfico de barras (Figura 52). La cepa con mayor sensibilidad fue *Escherichia coli*; en segundo lugar, se encuentra *Pseudomonas aeruginosa* y, finalmente, *Staphylococcus aureus*. Se observa en *E. coli* una CMB de 6.25  $\mu\text{g/mL}$ , la cual se aproxima a la CMB obtenida por Sharma y col. (2009), cuyo valor es 6.75  $\mu\text{g/mL}$ ; mientras que, para *S. aureus* fue de 25  $\mu\text{g/mL}$ , esto coincide con resultados de CMI (25  $\mu\text{g/mL}$ ) para nanopartículas de plata sintetizadas por el método organometálico en estos dos microorganismos, reportado por Monge (2009). Por otro lado, para *P. aeruginosa* se obtuvo una CMI de 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , cuyo valor se acerca al obtenido con nanopartículas de plata de 35 nm, sintetizadas con lactosa, el cual fue de 13.5  $\mu\text{g/mL}$  (Sharma y col., 2009).

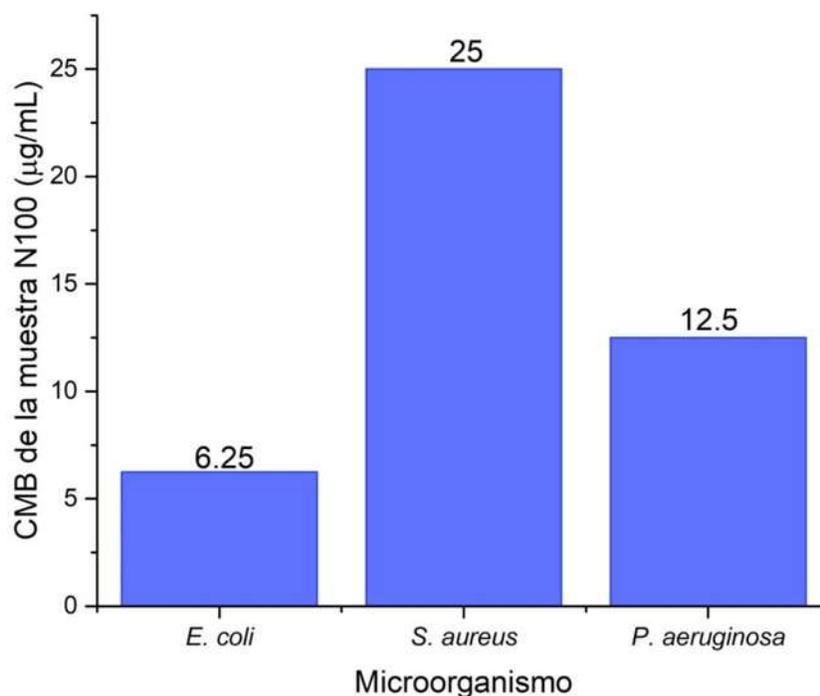


Figura 52. CMB de la muestra N100 sobre los tres microorganismos ensayados.

Los microorganismos ensayados tienen diferencias estructurales significativas en su pared celular. Por un lado, *E. coli* y *P. aeruginosa* son bacterias gram negativas, lo cual implica que su pared está formada por una cantidad menor de peptidoglicano que la pared de las bacterias gram positivas, como es el caso de *S. aureus*. El peptidoglicano está cargado negativamente, mientras que los iones de plata se encuentran cargados positivamente, lo cual provoca una atracción y retención de las nanopartículas (Ahmed y col., 2016). Esto explica la diferencia en la sensibilidad de los microorganismos previamente mencionados, ante las nanopartículas de plata.

## 14. CONCLUSIONES

Al utilizar mucílago liofilizado de linaza (*Linum usitatissimum L.*) como agente reductor, fue posible sintetizar nanopartículas de plata de orden nanométrico, con tamaños entre 10 y 80 nm. Esto se comprobó por medio de diferentes técnicas de caracterización, como espectroscopía UV-Vis, donde se detectó una resonancia del plasmón de alrededor de 399 nm y 420 nm, que indica la presencia de partículas dipolares y cuadrupolares.

A través de difracción de Rayos X, se detectó plata metálica y residuos de nitrato de plata y del mucílago en la muestra secada a 100 °C; mientras que, en las muestras calcinadas se detectó únicamente plata metálica.

Por otro lado, en espectroscopía de Infrarrojo, se lograron observar bandas características de grupos funcionales presentes en azúcares y compuestos fenólicos del mucílago; en la muestra secada a 100 °C, aparecieron bandas pertenecientes a la estructura del mucílago y bandas adicionales que indican la formación de enlaces C-N en diferentes orbitales, producto de la interacción entre el carbono y el nitrógeno; las muestras calcinadas a 450 °C y 500 °C, conservaron solo las bandas correspondientes a los enlaces C-N, lo que indica la eliminación de residuos de mucílago y se puede inferir que la plata no forma parte de la red.

En el análisis de tamaño de partícula utilizando un equipo Nanosizer se detectaron tamaños de partícula de orden nanométrico en la muestra secada a 100 °C; mientras que, para las muestras calcinadas el tamaño de partícula fue mayor a 100 nm, lo cual concuerda con las micrografías de las muestras utilizando microscopía electrónica de barrido.

Finalmente, se evaluó la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata obtenidas, cuyos resultados arrojaron una mayor sensibilidad de las cepas ante la muestra N100. Siendo *Escherichia coli*, la cepa más sensible; seguida de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

## 15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, (7)17–28.
- Ajitha, B., Ashok Kumar Reddy, Y., Sreedhara Reddy, P., Suneetha, Y., Hwan-Jin, J., Chi won Ahna. (2016). Instant biosynthesis of silver nanoparticles using *Lawsonia inermis* leaf extract: Innate catalytic, antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Molecular Liquids*, pp 474-481.
- Albella J.M., A.M. Cintas, T. Miranda, J.M. Serratos, (1996). Introducción a la Ciencia de Materiales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España.
- Al-Shalalfeh, M.M., Onawole, A.T., Saleh, T.A., Al-Saadi, A.A. (2017). Spherical silver nanoparticles as substrates in surface-enhanced Raman spectroscopy for enhanced characterization of ketoconazole. *Materials Science and Engineering*, (C76)356–364.
- Alvarado, R., Solera, F., Vega-Baudrit, J. (2014). Síntesis sonoquímica de nanopartículas de óxido de cinc y de plata estabilizadas con quitosano. Evaluación de su actividad antimicrobiana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(3)134-148.
- Arenas, J. I. (2015). Preparación y caracterización de microcápsulas de aceite de pescado fuente de ácidos grasos esenciales, usando como pared mucilago de linaza (*Linum usitatissimum*) por el método de gelificación iónica. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Ashok K. S., Ravi, S., Kathiravan, V., Velmurugan, S. (2015). Synthesis of silver nanoparticles using *A. indicum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc*, 134:34–9.

- Azam, A., Ahmed, F., Arshi, N., Chaman, M., Naqvi, A. (2009). One step synthesis and characterization of gold nanoparticles and their antibacterial activities against E. coli (ATCC 25922 strain). *Int. J. Theor. Appl. Sci.* 1.
- Babu, U. S., Wiesenfeld, P. W. (2003). Nutritional and hematological effects of flaxseed. In: Thompson, L. U.; Cunnane, S. C. (ed.). *Flaxseed in Human Nutrition*, 2<sup>nd</sup> ed., Champaign, Illinois: AOCS Press, pp. 150-173.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., Mietzner, T. A. (2011). *Microbiología médica*. (25<sup>a</sup> ed.). México, D. F.: McGraw-Hill.
- Cardoso, P. C. (2016). Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños*, 58(260)19-28.
- Carrillo, L.M., Zavaleta, H.A., Vilchis, A., Soto, R.M., Arenas, J., Trejo, L y Gómez, F. (2014). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Chenopodium ambrosioides*. *Journal of Nanomaterials*. pp 1-9.
- Cerchiaro, G., sant'Ana, A. C., Arruda, M. L., Da Costa, A. M. (2005). Investigations of different carbohydrate anomers in copper (II) complexes with D-glucose, D-fructose and D-galactose by Raman and EPR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. 340, pp 2352-2359.
- Chang, R. (2010). *Chemistry*. (10<sup>a</sup> ed.). New York: McGraw-Hill.
- Culity, B. D. (1956). *Elements of X-ray Diffraction*. Addison-Wesley Publishing Company.
- Daun, J. K., Barthet, V. J., Chornick, T. L., Duguid, S. (2003). Structure, composition and variety development of flaxseed. In L. Thompson, & S. Cunnane, *Flaxseed in Human Nutrition* (pp. pp. 1-40). Champaign, Illinois: 2<sup>nd</sup> ed. AOCS Press.

- Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala: Universidad de San Carlos. (2005). Coloides. Recuperado el 8 de Julio de 2019, de [http://medicina.usac.edu.gt/quimica/coloides/Coloides\\_1.htm](http://medicina.usac.edu.gt/quimica/coloides/Coloides_1.htm)
- Figueroa, F., Muñoz, O., Estévez, A. M. (2008). La linaza como fuente de compuestos bioactivos para la elaboración de alimentos. *Agro Sur*, 36(2)49-58.
- Govindaraju, K., Tamilselvan, S., Kiruthiga, V., Singaravelu, G. (2010). Biogenic silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. *Journal of Biopesticides* 3(1 Special Issue) 394 – 399.
- Guzman, M., Dille, J., Godet, S. (2012) Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gramnegative bacteria. *Nanomedicine*, (8)37-45..
- Hall, C., Tulbek, M., Xu, Y. (2006). Flaxseed. *Advances in Food and Nutrition Research*. (51) 1-97.
- Hlaing, M., Gebear-Eigzabher, B., Roa, A., Marcano, A., Radu, D., Lai, C-Y. (2016). Absorption and scattering cross-section extinction values of silver nanoparticles. *Optical Materials*, pp 439-444.
- Ipohorski, M., Bozzano, P. B. (2013). Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales. *CIENCIA E INVESTIGACIÓN*, 63(3)43-53.
- Jiménez-Vargas, M. (1979). Físicoquímica fisiológica: coloides. Ed. Interamericana (5ª edición). Obtenido de: <http://cidta.usal.es/residuales/libros/logo/pdf/coloides.pdf>
- Kumar, P.P.N., Pammi S.V.N., Kollu P., Satyanarayana K.V.V., Shameem U. (2014). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti-bacterial activity. *Ind Crops Prod*, (52)562–6.

- Leyva, G. G. (2013). Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en discapacidad*, 2(1)18-22.
- Mariselvam, R., Ranjitsingh, A.J.A., Usha, R.N.A., Kalirajan, K., Padmalatha, C., Selvakumar, M.P.. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles from the extract of the inflorescence of *Cocos nucifera* (Family: *Arecaceae*) for enhanced antibacterial activity. *Spectrochim Part A: Mol Biomol Spectrosc*, (129)537–41.
- Martínez, M. (1996). Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de *Áloe vera* (sábila). *Rev. Cubana Plant Med.* 1(3):18-20.
- Mohanty, A. S., Jena, B. S, (2017). Innate catalytic and free radical scavenging activities of silver nanoparticles synthesized using *Dillenia indica* bark extract. *Journal of Colloid and Interface Science*, (496)pp 513-521.
- Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de Química*, 105(1), 33–41.
- Morris, D. H., Vaisey-Genserb, M. (2003). Availability and labeling of flaxseed food, products and supplements. In: Thompson, L. U.; Cunnane, S. C. (ed.). *Flaxseed in Human Nutrition*, 2<sup>nd</sup> ed., Champaign, Illinois: AOCS Press, pp. 404-442.
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, R.S., Khan, M.I., Parishcha, R., Ajaykumar, P.V., Alam, M., Kumar, R., Sastry, M. (2001). Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. *Nano Letters*. 1(10)pp 515-519.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2013). *Microbiología médica*. (7<sup>a</sup> ed.). Barcelona: Elsevier.

- Nakkala JR, Mata R, Kumar Gupta A, Rani Sadras S. (2014). Biological activities of green silver nanoparticles synthesized with *Acorous calamus* rhizome extract. *Eur J Med Chem*, 85:784–94.
- Oomah, B. D. (2003). Processing of flaxseed fiber, oil, protein and lignan. In F. i. edition, Thompson, L. U.; Cunnane, S. C. (pp. pp. 363-386). Champaign, Illinois: AOCS Press.
- Perry, H. J. (1980). Manual del Ingeniero Químico. Ed. Hispanoamericana, pp 165, 305.
- Prasannaraj, G., Venkatachalam, P. (2017). Hepatoprotective effect of engineered silver nanoparticles coated bioactive compounds against diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis in experimental mice. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: (Biology167)*309–320.
- Qian, K. C., Wub, Y., Goff, H. (2012). Flaxseed gum from flaxseed hulls: Extraction, fractionation and characterization. *Food Hydrocolloids*, (28) 275-283.
- Ramírez, M. P. (2017). Uso de mucilago de nopal (*Opuntia ficus-indica*) para la síntesis de nanopartículas de plata. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Saber de ciencias. (S. F.) Sistemas dispersos. Recuperado el 8 de Julio de 2019, de <https://www.saberdeciencias.com/apuntes-de-quimica/133-quimica-sistemas-dispersos-soluciones-coloides>
- Salinas-Estevané, P., Sánchez-Cervantes, E. M. (2012). La química verde en la síntesis de nanoestructuras. *Ingenierías*. 54, pp 7-16.
- Sánchez, G. E., Castillo, H. S. L. y García, P. P. (2016). Actividad antimicrobiana. En Rivas, M. C., Oranday, C. M. A. y Verde, S. M. J. (Eds.) *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona España: Omnia Science. 77-100.
- Sandoval, R. P., Romo, K. F., Ortiz, G., Medina, L. E., Pérez, L.E. (2017). Síntesis de nanocompositos (Ag-Quitosano) y su inclusión en recubrimientos comestibles

a base de quitosano y mucílago de linaza. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2, pp 397-403.

Sharma, V. K., Yngard, R. A., Yekaterina Lin. (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Elsevier*, (145) 83–96.

Singh, A., Jain, D., Upadhyay, M. K., Khandelwal, N., Verma, H. N. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles using *Argemone mexicana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(2)483-489.

Struthers, K.; Westran, R. (2005). Bacteriología clínica. Ed. Masson S. A. p.192.

Suárez, C. J., Espinoza, G. H., Alonso, N. G., Rivero, A. I., Ponce P. Y., Flores, L. L. (2017). A green synthesis of copper nanoparticles using native cyclodextrins as stabilizing agents. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21,341–348.

Taroco, R., Seija, V., y Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica, (CIM)*, 663-672.

Tippayawat, P., Phromviyo, N., Boueroy, P., Chompoosor, A. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. *PeerJ* (4)2589.

Universidad de Alcalá. (1993). Mezclas de sustancias. Disoluciones. Recuperado el 8 de Julio de 2019, de [http://www3.uah.es/edejesus/resumenes/QG/Tema\\_9.pdf](http://www3.uah.es/edejesus/resumenes/QG/Tema_9.pdf)

Velázquez-González, C. S. (2017). Síntesis y caracterización de películas delgadas de TiO<sub>2</sub> dopado con w obtenidas por spin-coater. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., Melek, K. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular spectroscopy*. (185) pp 317-335.

Wiesenborn, D. P., Tostenson, K., Kangas, N. (2003). Continuous abrasive method for mechanically fractionating flaxseed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80: 295-300.

Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C., Woods, G. L. (2008). *Diagnóstico microbiológico, Texto y atlas en color*. (6<sup>a</sup> ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Wooten, F. (1972). *Optical properties of solids*. Academic press: New York.