



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología

Determinación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas producidas por síntesis verde con extracto de *Argemone mexicana*

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el Título de
LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA

Presenta:


Diana Guadalupe Téllez de Jesús

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Director



Firma

Dr. Ángel Ramón Hernández Martínez
Secretario



Firma

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo
Vocal

Esquivel Naranjo Edgardo U.

Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime
Suplente



Firma

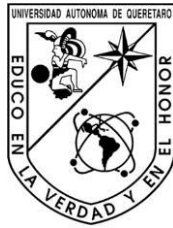
Centro Universitario
Querétaro, Qro.

20 de Mayo 2019

2019

Determinación de la actividad antimicrobiana de nanopartículas
producidas por síntesis verde con extracto de *Argemone mexicana*

Diana Guadalupe Tellez de Jesús



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Determinación de la actividad antimicrobiana de
nanopartículas producidas por síntesis verde con
extracto de *Argemone mexicana*

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el
grado de

LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA

PRESENTA

Diana Guadalupe Tellez de Jesús

Dirigido por:

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

C.U. Querétaro, Qro. 20 de Mayo 2019

RESUMEN

Desde hace ya varios años la resistencia microbiana ha ido en aumento debido al uso indiscriminado de agentes antimicrobianos y como consecuencia de ello los microorganismos han desarrollado mecanismos para evadir el efecto que los antimicrobianos, como los antifúngicos y antibióticos. Es por ello que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que permitan el control adecuado de los microorganismos patógenos, no solamente de humanos sino también de aquellos que causan enfermedades en plantas. La biosíntesis de nanopartículas metálicas es un método que ha tenido gran auge debido a sus numerosas aplicaciones, entre ellas su potencial antimicrobiano. Además, de tener efectos microbicidas es un método amigable con el ambiente y por la facilidad de obtención representa una alternativa para el control de patógenos, ya que para la obtención de nanopartículas hace uso de recursos, que no requieren un gasto económico, como aquellas plantas que no son de interés comercial. Por lo que el objetivo de este trabajo fue la obtención y caracterización de nanopartículas, de plata y oro, sintetizadas con el extracto de *Argemone mexicana*, una planta que es considerada una maleza, la cual es de amplia distribución y crece en ambientes pobres de nutrientes. Se determinó la actividad antimicrobiana de las nanopartículas obtenidas en diferentes microorganismos como: bacterias sensibles y multirresistentes a antibióticos, hongos fitopatógenos y en *C. albicans*, levadura patógena de humanos. Los resultados indican que las nanopartículas obtenidas con el extracto de *A. mexicana*, así como el extracto mismo, tienen un amplio espectro de inhibición en el crecimiento de microorganismos por lo que pueden ser una nueva alternativa para el control de patógenos, no solamente de humanos también de plantas.

Palabras clave: nanopartículas, síntesis verde, *A. mexicana*

Dedicatorias

A mis padres por enseñarme que la perseverancia y paciencia lo consiguen todo, que no hay nada que no pueda hacer. En general a mi familia por todo el amor y apoyo que me dan siempre.

En memoria de mi hermana Fernanda.

Agradecimientos

Al Dr. Antonio por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por enseñarme la disciplina, paciencia e insistencia en el camino científico.

Al Dr. Ángel por mostrarme otra perspectiva que tiene la microbiología en conjunto con otras áreas de la ciencia.

A mis amigos: Karen, Sofí, Mini, Brenda, Romi, Alex, Erick, Carmen, Majo, Tania. Gracias por estar. A mis compañeros y QUERIDOS AMIGOS del laboratorio: Alma, Eve, Alan, Omar, Gustavo por hacer la estancia más agradable.

Este trabajo se realizó con apoyo parcial del proyecto FNB201822, del Cuerpo Académico. Biotecnología y Sanidad Vegetal. Creación de un cepario-herbario y código de barras para hongos de importancia biotecnológica.

De igual manera se realizó con apoyo parcial del proyecto: Efecto antagónico de bacterias presentes en rizosfera de fresa de manejo orgánico contra hongos fitopatógenos que dañan cultivos de interés agrícola. FNB201819/FOFI-UAQ 2018.

INDICE

	Página
1.INTRODUCCIÓN	10
2.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Síntesis verde	10-11
2.2 Propiedades antimicrobianas de plantas	12
2.2.1 <i>Argemone mexicana</i>	12
2.3 Propiedades antimicrobianas nanopartículas de plata y oro	13-14
2.4 Microorganismos patógenos en humanos	15
2.4.1 <i>Escherichia coli</i>	15
2.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.4.4 <i>Candida albicans</i>	16
2.5 Hongos patógenos de plantas	16-17
2.6 Resistencia microbiana	17
2.6.1 Bacterias resistentes a antibióticos	17-18
2.7 Justificación	19
3.HIPÓTESIS	20
4.OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos	21
5.MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Muestreo y obtención de extracto	22
5.2 Capacidad antioxidante	22
5.2.1 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de <i>A. mexicana</i> mediante ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)	22-23
5.3 Determinación de compuestos fenólicos	23

5.3.1 Determinación de fenoles totales -----	23
5.3.2 Determinación de flavonoides y taninos -----	23
5.4 Síntesis verde de nanopartículas de plata y oro-----	23
5.4.1 Síntesis verde de nanopartículas de plata y oro -----	23-24
5.4.2 Síntesis química de nanopartículas de plata y oro -----	24
5.4.3 Espectro UV-Vis de nanopartículas limpias de plata y oro -----	24
5.5 Microscopía electrónica de barrido de alta resolución de nanopartículas de plata y oro sintetizadas con extracto de <i>A. mexicana</i> -----	24-25
5.6 Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata y oro -----	25
5.6.1 Actividad antifúngica de las nanopartículas -----	25
5.6.2 Actividad antibacteriana de nanopartículas- -----	25
5.6.3 Actividad antimicrobiana de nanopartículas en la levadura <i>Candida albicans</i> -----	25
5.7 Efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata y oro, sintetizadas con extracto de <i>A. mexicana</i> -----	26
5.7.1 Actividad contra <i>C. albicans</i> -----	26
5.7.2. Efecto antifúngico -----	27-28
5.8. Análisis termogravimétrico (TGA) de la síntesis verde de nanopartículas de plata y del extracto de <i>A. mexicana</i> -----	28
6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	29
6.1 Colecta y obtención del extracto -----	29
6.2 Capacidad antioxidante -----	30
6.2.1 Determinación de la Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de <i>A. mexicana</i> mediante ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) -----	30-31
6.3 Determinación de compuestos fenólicos -----	31
6.3.1 Determinación de fenoles totales -----	32
6.3.2 Determinación de flavonoides y taninos-----	32-33

6.4 Síntesis verde de nanopartículas de plata y oro -----	34
6.4.1 Síntesis verde de nanopartículas de plata -----	34-35
6.4.2 Síntesis verde de nanopartículas de oro -----	35
6.4.3 Espectro UV-Vis de nanopartículas limpias de plata y oro -----	36-37
6.5 Microscopía electrónica de barrido de alta resolución de nanopartículas de plata y oro sintetizadas con extracto de <i>A. mexicana</i> -----	37-39
6.6 Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata y oro -----	40
6.6.1 Efecto antibacteriano de nanopartículas de plata y oro en <i>S. aureus</i> -----	40-41
6.6.2 Efecto antibacteriano de nanopartículas de plata y oro en <i>P. aeruginosa</i> -----	41-43
6.6.3 Efecto antibacteriano de nanopartículas de plata y oro en <i>E. coli</i> -----	43-45
6.6.4 Efecto antibacteriano de nanopartículas de plata y oro en bacterias resistentes a antibióticos -----	45-49
6.7 Efecto antifúngico de nanopartículas de plata y oro, sintetizadas con extracto de <i>A. mexicana</i> -----	49
6.7.1 Actividad contra <i>C. albicans</i> -----	49-50
6.7.2. Efecto antifúngico -----	51-55
6.8. Análisis termogravimétrico (TGA) de la síntesis verde de nanopartículas de plata y del extracto de <i>A. mexicana</i> -----	55-58
6.9. Discusión general -----	58-59
7.CONCLUSIONES -----	60
8. PERSPECTIVAS -----	61
9.REFERENCIAS -----	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama del mecanismo antibacteriano de nanopartículas de plata-----	14
Figura 2 Diagrama del ensayo en hongos fitopatógenos-----	26
Figura 3 Diagrama del ensayo de difusión en disco para las pruebas en bacterias y en <i>C. albicans</i> -----	27
Figura 4 <i>Argemone mexicana</i> -----	29
Figura 5: Espectro UV-Vis del extracto de <i>A. mexicana</i> -----	30
Figura 6 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto isopropanólico de <i>A. mexicana</i> -----	31
Figura 7 Contenido de fenoles totales del extracto de <i>A. mexicana</i> -----	32
Figura 8 Determinación de compuestos fenólicos del extracto isopropanólico de <i>A. mexicana</i> -----	33
Figura 9 Espectro UV-Vis de la síntesis verde de nanopartículas de plata-----	34
Figura 10 Espectro UV-Vis de la síntesis verde de nanopartículas de oro-----	35
Figura 11 Espectro UV-Vis de las nanopartículas de plata limpias-----	36
Figura 12 Espectro UV-Vis de las nanopartículas de oro limpias-----	37
Figura 13 Microscopia electrónica de barrido de alta resolución de nanopartículas de plata-----	38
Figura 14 Microscopia electrónica de barrido de alta resolución de nanopartículas de oro-----	39
Figura 15 Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata y oro en <i>S. aureus</i> -----	41
Figura 16 Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata y oro en <i>P. aeruginosa</i> -----	42
Figura 17 Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata y oro en <i>E. coli</i> -----	43-44
Figura 18 Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata y oro en bacterias resistentes a antibióticos-----	46-47
Figura 19 Actividad antifúngica de nanopartículas en la levadura <i>Candida albicans</i> -----	50
Figura 20 Actividad antifúngica de nanopartículas de plata y oro en hongos fitopatógenos-----	52
Figura 21 Análisis termogavimétrico del extracto de <i>A. mexicana</i> -----	56
Figura 22 Análisis termogavimétrico de nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de <i>A. mexicana</i> -----	57

1 . -Introducción

Actualmente las plantas son ampliamente utilizadas en el proceso de síntesis de nanopartículas debido a que constituyen un recurso de fácil acceso y casi ilimitado (Elia, 2014; Bhattacharjee, 2010). *Argemone mexicana* L. es una planta considerada maleza, se distribuye en la mayoría del territorio nacional, tiene un alto contenido de alcaloides como la sanguinarina, protopina y barberina, estos compuestos predominan principalmente en las hojas, aunque solamente son algunos de los componentes que se han caracterizado (Bhattacharjee, 2010). También en algunas regiones es considerada una planta medicinal, debido a que se utiliza para el tratamiento de infecciones en la piel o gastrointestinales e incluso se ha reportado que tiene propiedades anticancerígenas (Arokiyaraj, 2013; Brahmachari, 2013).

Recientemente la síntesis verde de nanopartículas se ha presentado con numerosas posibilidades de aplicaciones biomédicas. Además, una de las ventajas de utilizar este método de síntesis es que no tiene un costo elevado, en comparación con la síntesis química. La biosíntesis de nanopartículas reduce costos y tiempo de producción, ya que la reacción se lleva a cabo en menos de 60 minutos, además de que es un método amigable con el medio ambiente, con potencial de ser aplicado en el control de microorganismos patógenos de humanos y plantas. Aunado a ello, el uso de plantas acoplado a la obtención de nanopartículas representa un método económico y representa un recurso casi ilimitado para la biosíntesis (Elia, 2014; Senthil, 2017).

La síntesis de nanopartículas de plata actualmente es las que más aplicaciones biomédicas y microbiológicas tiene, esto debido a sus propiedades antimicrobianas (Ganaie, 2015; Jain, 2017). Es decir, la plata es conocida por ser un agente antimicrobiano ya que se sabe que inhibe la expresión de proteínas o produce daños en la membrana lo cual provoca una alteración osmótica y los microorganismos como las bacterias mueren. En hongos se ha descrito que las nanopartículas de plata inducen un daño físico irreversible en la pared celular e inhiben el crecimiento. Sin embargo, el proceso por el cual sucede esto no se conoce realmente a pesar de que se tiene evidencia de que las nanopartículas de plata y oro inducen a la muerte de bacterias y otros microorganismos (Sujitha, 2013, Patil, 2017).

2.- Revisión bibliográfica

2.1 Síntesis verde

La síntesis verde hace referencia al uso de compuestos biológicos en la formación de materiales como las nanopartículas (Senthil B. D., 2017). Este método resulta ser menos invasivo con el medio ambiente en comparación de los métodos de síntesis de nanopartículas tradicionales los cuales utilizan solventes u otros agentes químicos que en su mayoría además de ser costosos tienen un mayor impacto en el ambiente (Kumar, 2014; Siddiqui M. N., 2018). Otra de las ventajas de esta técnica es que requiere menos tiempo que otras metodologías convencionales, dado que utiliza como agentes reductores biomoléculas como lo son los alcaloides, fenoles, polisacáridos, vitaminas, enzimas, microorganismos y extractos de plantas para la síntesis de nanopartículas (Ahamed, 2011; Senthil, 2017).

Los métodos de síntesis de nanopartículas convencionales hacen uso de productos químicos que pueden resultar altamente tóxicos y pueden producir efectos secundarios en la aplicación biomédica, por ejemplo: la acumulación y formación de agregados de nanopartículas metálicas. Por lo que los métodos que hacen uso de materiales biológicos, como la síntesis verde, proporcionan propiedades distintas dado que no se ha reportado su toxicidad en condiciones experimentales aplicadas a animales o al ambiente, de igual manera brinda una alternativa económica debido a que el proceso de síntesis requiere materiales costeables y amigables con el ambiente. Además, el proceso de síntesis es muy sencillo ya que solamente se mezclan las sales metálicas con el material biológico y se produce la bioreducción de la sal y en menos de 60 minutos se obtienen nanopartículas, lo cual reduce costos y tiempo de producción (Iravani, 2011; Jain, 2017; Ahamed, 2011).

Las plantas proporcionan una fuente de material biológico abundante para el proceso de síntesis verde. Sin embargo, hay que tener en cuenta que deben ser de fácil acceso y que no representen plantas de interés económico o comercial. Los compuestos que éstas tienen como; fenoles, flavonoides, antioxidantes, alcaloides y otros metabolitos secundarios le confieren propiedades distintas a cada planta por lo cual es necesario la búsqueda de materiales con alto contenido de estos componentes para la aplicación en el proceso de obtención de nanopartículas, ya que los compuestos de la planta misma son los responsables de la reducción, crecimiento y estabilización de las nanopartículas (Hussain, 2016; Kharissova, 2013).

Las nanopartículas actualmente se han utilizado principalmente en modelos animales y sus aplicaciones van encaminadas al área biomédica. Sin embargo, el uso de las nanopartículas metálicas mediante síntesis verde, contra hongos que infectan plantas es poco conocido a pesar de que en algunos trabajos se ha visto que las nanopartículas de plata tienen un efecto en la inhibición del crecimiento de hongos como lo son: *Bipolaris sorokinniana*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum*

gloesporioides, así como en bacterias tales como *Xanthomonas axonopodia* y *Pseudomonas syringae*, causantes de enfermedades en plantas (Min, 2009; Lee, 2013; Kumar, 2014).

2.2 Propiedades antimicrobianas de plantas

Actualmente la resistencia antimicrobiana ha ido en aumento, problemática que tiene un impacto tanto en el sector de salud como en el agrícola ya que provoca pérdidas económicas y problemas de salud importantes. Las plantas resultan ser buenos candidatos para la obtención de nuevos compuestos antimicrobianos, ya que se han usado a lo largo de varios años en la herbolaria tradicional para el tratamiento de infecciones en la piel, gastrointestinales o dolores musculares entre otros. Su actividad antimicrobiana se debe a la presencia de componentes propios de éstas como son los flavonoides, alcaloides, terpenos, saponinas y otros metabolitos asociados con estas características. Es por ello que las plantas al aportar una gran cantidad de compuestos, pueden ser utilizadas como alternativa para hacer frente a la problemática que se tiene debido al incremento en la resistencia antimicrobiana, por lo cual resulta necesario la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos (Rios, 2005; Kharissova, 2013; Mostafa, 2018).

2.2.1 *Argemone mexicana*

Argemone mexicana es una planta de amplia distribución que se usa de manera tradicional para el tratamiento de infecciones en la piel, inclusive en algunas partes del mundo se considera como un antídoto para venenos de animales ponzoñosos. En México es conocida comúnmente como “chicalote” y debido a que puede crecer en suelos pobres de nutrientes es de amplia distribución, de hecho, es considerada una maleza (Brahmachari, 2013; More, 2016; Hussein, 2017).

Se ha reportado que el extracto de esta planta es efectivo para la inhibición del crecimiento de bacterias, nematodos, hongos y en algunas partes del mundo es utilizada para el tratamiento de la malaria. Estas propiedades antimicrobianas se deben a que posee metabolitos secundarios como la dehidrocorildamina y oxibarberina de los cuales se ha observado que inhiben la esporulación en hongos (Singh, 2009). También se han encontrado alcaloides como la barberina y protopina, los cuales se han asociado con posibles propiedades antimicrobianas (Bhattacharjee, 2010; Brahmachari, 2013; Hussein, 2017).

El extracto de esta planta es efectivo contra algunos hongos (causantes de enfermedades en plantas), bacterias y contra algunos nematodos como *Meloidogyne incognita* causante de la podredumbre de la raíz en cultivos de importancia económica (Kumari, 2013; More, 2016) e incluso contra microorganismos que causan enfermedades en humanos, por ejemplo en bacterias resistentes a antibióticos como lo son algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras clínicas (Siddiqui, 2002; Bhattacharjee, 2010; Sahu, 2012).

2.3 Propiedades antimicrobianas nanopartículas de plata y oro

La plata es conocida desde hace ya varios años por sus propiedades antimicrobianas, es por ello que las nanopartículas de plata (AgNPs) en conjunto con el proceso de síntesis verde, esto es en combinación con materiales biológicos como las plantas que presentan propiedades antimicrobianas, proporcionan una alternativa para el control de los microorganismos causantes de enfermedades ya sea en humanos o en plantas de interés comercial (Rajeshkumar, 2019; Hussain, 2016).

La síntesis química y verde de nanopartículas de plata actualmente es la que más aplicaciones biomédicas y microbiológicas tiene, esto debido a sus propiedades antimicrobianas (Ganaie, 2015; Jain, 2017). Es decir, las biomoléculas son conocidas por su actividad antimicrobiana ya que se sabe inhiben la actividad de proteínas o producen daños en la membrana o pared celular, lo cual provoca una alteración osmótica y los microorganismos como las bacterias mueren. En hongos se ha descrito que las nanopartículas de plata provocan daño en la pared celular, de manera que provocan la deformación de ésta e inhiben el crecimiento (Jo, 2009). Sin embargo, el mecanismo por el cual sucede esto aún no es del todo conocido. Las nanopartículas de oro también han tenido gran auge debido a su biocompatibilidad y efecto no citotóxico en las aplicaciones biomédicas (Sujitha, 2013; Jain, 2017).

El tratamiento con nanopartículas aplicado a microorganismos produce una modificación de los lípidos que conforman la membrana provocando su desestabilización, volviéndola más fluida, de manera que incrementa la permeabilidad y permite el paso libremente de las nanopartículas, aunque también se ha propuesto que aquellas de menor tamaño pueden atravesar de manera libre la membrana. Este fenómeno se ha propuesto como el principal mecanismo de daño en bacterias, seguido por el daño físico a la pared celular, ya que las nanopartículas de plata al tener una carga positiva, interactúan con la carga negativa de la pared celular en bacterias desestabilizando las cadenas de peptidoglicano e induciendo a la formación de monómeros de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. Por lo que la pared celular pierde rigidez y consecuentemente se induce a la formación de especies reactivas de oxígeno. También se ha propuesto que las nanopartículas de plata pueden interactuar con los grupos amino de los componentes celulares como las proteínas, o con los grupos fosfato del ADN, figura 1. Todos estos mecanismos actúan de manera simultánea conduciendo a la pérdida de la integridad celular y posteriormente a la muerte (Kharissova, 2013; Patil, 2017; Jain, 2017; Tripathi, 2017).

A pesar de ello, se desconoce el mecanismo de acción antimicrobiano por el cual las nanopartículas funcionan, ya que no se puede generalizar el efecto en todos los microorganismos, debido a que cada uno de ellos presenta diferente sensibilidad dada por la conformación de sus componentes

celulares como la membrana o la pared celular, aunado a ello existen microorganismos con estructuras de resistencia, como las esporas o bien estructuras de protección, por ejemplo, la presencia de cápsula. Además de la capacidad de formar biopelículas, esta particularidad les confiere una conformación distinta de manera que la eficiencia de las nanopartículas se puede ver afectada (Maillard, 2018; Rajeshkumar, 2019).

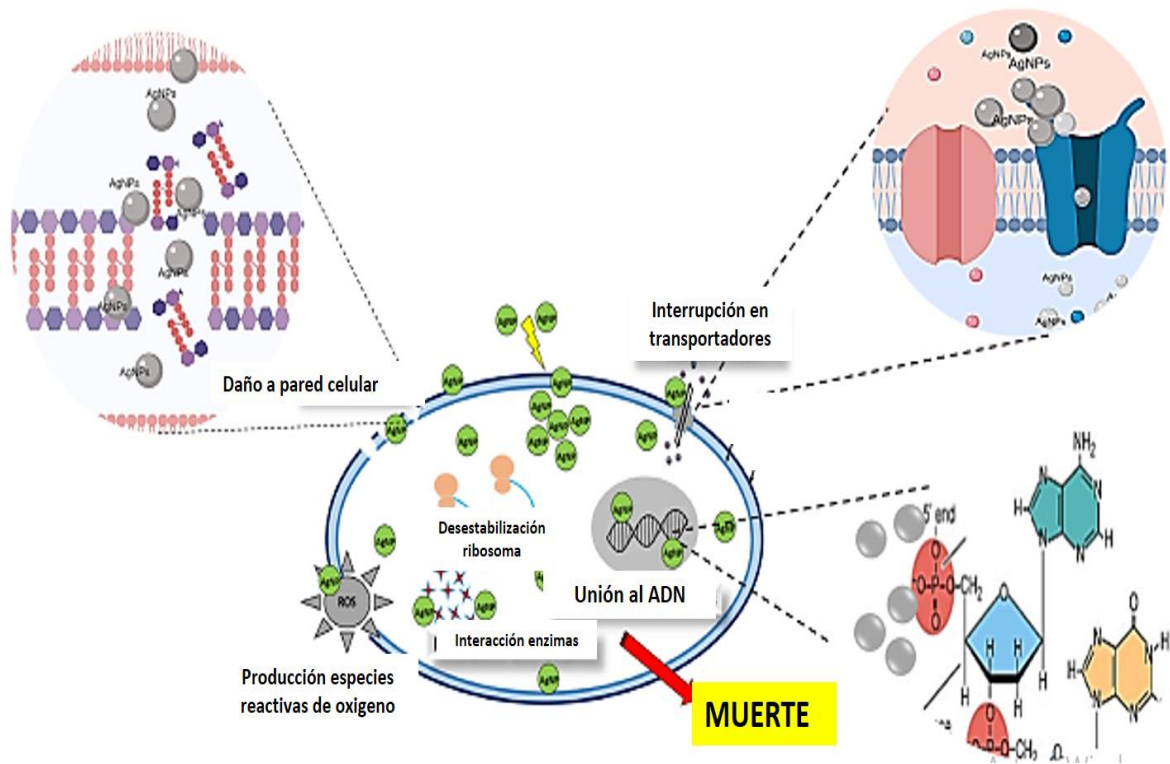


Figura 1. Diagrama del mecanismo antibacteriano de nanopartículas de plata. Tomado y modificado de (Patil, 2017)

Las propiedades antimicrobianas de nanopartículas de oro se atribuyen al tamaño y forma que éstas tienen, así como a la manera en que son sintetizadas. A pesar de ello es poco entendido el proceso por el cual tienen estas características, se tiene la hipótesis de que existen nanopartículas de oro capaces de unirse a los grupos funcionales de enzimas como la NADH deshidrogenasa, esta unión interrumpe la cadena respiratoria e induce a la producción de especies reactivas de oxígeno promoviendo la muerte celular. Sin embargo, no se conoce realmente el proceso por el cual tienen propiedades antimicrobianas, no se sabe si las nanopartículas atraviesan por difusión simple la membrana o si es por endocitosis, o si provocan un daño directo en la pared celular y cómo es que se presenta esto en distintos microorganismos, por ejemplo, en hongos y en bacterias debido a que su estructura y conformación es distinta para cada caso. (Jo, 2009; Elia, 2014).

2.4 Microorganismos patógenos en humanos

2.4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo, pertenece a la familia de las enterobacterias y se encuentra de manera normal en la microbiota gastrointestinal ya que coloniza el intestino al momento del nacimiento. Sin embargo, hay cepas que son patógenas y provocan infecciones del tracto intestinal, siendo esta la causa más común de diarrea infantil (Li W., 2010). Por ejemplo, cepas de *E. coli* enteroagregativa que como su nombre lo indica tienen la habilidad de formar agregados bacterianos alrededor de las células y como consecuencia de ello provocan enfermedades como la diarrea persistente la cual puede llegar a tener complicaciones en el tratamiento de la misma debido a la resistencia a los antibióticos, o las cepas de *E. coli* enterotoxigénica cuya característica es la producción de toxinas resistentes y tolerantes al calor de manera que su control es complicado (Patz-Vargas, 2015).

2.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo, que por lo general se caracteriza por ser un patógeno oportunista y es una de las bacterias que predominan en las infecciones nosocomiales. Hay cepas de *Pseudomonas* que llegan a ser multirresistentes a antibióticos debido a que pueden adquirir genes, ya sea del ambiente o de otras bacterias, los cuales le confieren la habilidad de evadir el efecto nocivo de los fármacos. Actualmente el tratamiento para estas infecciones consta de la combinación de antibióticos dado que uno solo no logra erradicar la infección debido a que ha generado resistencia a éstos (Salomoni, 2017; de Bentzmann, 2011).

2.4.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, al igual que *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista, pero a diferencia de *Pseudomonas*, *S. aureus* presenta forma de coco y tiene la capacidad de invadir la mayoría de los tejidos provocando lesiones en la piel, infecciones del tracto urinario, respiratorio, bacteremia hasta el punto de provocar sepsis, razón por la cual los pacientes, especialmente los recién nacidos e inmunocomprometidos, son hospitalizados y tratados con una combinación de antibióticos para intentar revertir la infección debido a que es más frecuente la presencia de bacterias resistentes a los fármacos (Tong, 2015; Li W. R., 2011).

El éxito de colonización e infección se debe en parte a los múltiples factores de virulencia que puede llegar a expresar, por ejemplo: proteínas asociadas adhesión e invasión a las células del huésped, evasión de la respuesta inmune, es por ello que es uno de los patógenos asociados con más frecuencia a infecciones nosocomiales por la variedad de respuestas que presenta (Tong, 2015).

2.4.4 *Candida albicans*

Candida albicans, patógeno oportunista de humanos que de manera normal se encuentra como comensal sin causar daño alguno a su hospedero. Sin embargo, puede provocar infecciones localizadas o sistémicas, es un hongo dimórfico, ya que puede presentar forma de levadura o de hifa debido a que se desarrolla de manera distinta dependiendo de las condiciones del medio en el que crece. Es la transición morfológica la que facilita la invasión a las células dado que en la forma de hifa expresa diferentes antígenos lo cual le confiere la capacidad de invasión intracelular e intercelular provocando un daño en su hospedero, así como la producción de diferentes enzimas proteolíticas que se consideran factores de virulencia. Además, al ser capaz de formar biopelículas puede resistir de manera eficaz el daño producido por antifúngicos (Höfs, 2016; Wibawa, 2016). Estas características le confieren cierta versatilidad ya que puede estar presente en diferentes sitios anatómicos y posee la habilidad de ser patógeno si las condiciones del medio se lo permiten, de ahí que es el hongo que mayor incidencia tiene en infecciones nosocomiales y los fármacos utilizados para su tratamiento resultan ineficaces debido a la generación de resistencia a éstos (Höfs, 2016; Dadar, 2018).

2.5 Hongos patógenos de plantas

Los hongos son los organismos causantes de las mayores pérdidas económicas en la agricultura debido a su amplio rango de hospederos ya que no solamente infectan plantas de interés comercial, ya que pueden estar presentes de manera normal en el suelo o formando parte de la microbiota de la planta y cuando las condiciones ambientales son favorables inducen una infección. Las infecciones producidas por hongos están determinadas por las condiciones ambientales y por la planta misma ya que sí ésta se encuentra con heridas superficiales, por ejemplo, es una vía de acceso a varios microorganismos, como los hongos, que pueden causar enfermedades y éstas se diseminan fácilmente a las plantas adyacentes de manera que su control muchas veces se dificulta debido a la generación de cepas resistentes (Dean, 2012).

Rhizoctonia solani es un hongo patógeno de plantas, principalmente en la papa, su distribución es mundial y la enfermedad que causa se caracteriza por la pudrición en la raíz de los cultivos lo cual provoca pérdidas económicas importantes a pequeños y grandes productores, ya que su propagación suele ser muy fácil debido a que al entrar en contacto con el suelo se dispersa a otras plantas sanas mediante el agua o la tierra contaminada (Kanetis, 2016).

Otros de los hongos de importancia económica son; *Fusarium oxysporum* que recientemente ha sido identificado como patógeno emergente de humanos, pero en plantas este hongo infecta principalmente los tallos (Husaini, 2018). En cultivos de tomate provoca el marchitamiento de la

hortaliza, pero esto no significa que no tenga otros hospederos, también puede infectar a otros cultivos de interés comercial al igual que otros hongos como es el caso de: *Colletotrichum gloeosporioides*, patógeno de plantas de interés comercial como el aguacate en donde provoca antracnosis. *Alternaria alternata* que de igual manera es un patógeno oportunista que produce manchas en las hojas y decoloración en distintas partes de la planta. *Sclerotium rolfsii* el cual tiene la habilidad de infectar cualquier parte de la planta y es de amplia distribución, además de que puede infectar a plantas ornamentales como las orquídeas. Sin embargo, los signos de enfermedades producidas por hongos en plantas son similares ya que se caracterizan por producir marchitamiento debido al daño causado al sistema vascular, clorosis, antracnosis o necrosis razón por la cual se dificulta su control y manejo correcto (Doehlemann G, 2017; Dean, 2012).

2.6 Resistencia microbiana

La resistencia microbiana se refiere a la capacidad que tienen los microorganismos para evadir los efectos de los antimicrobianos, que son los fármacos que se utilizan de manera habitual para tratar las infecciones que generan los microorganismos, y como consecuencia de ello los tratamientos para las infecciones que provocan se vuelven ineficaces. La generación de microorganismos resistentes representa un reto para el sector salud y agrícola, debido a que se pueden observar casos en los cuales resulta ineficiente la aplicación de fármacos para controlar al microorganismo. Los antimicrobianos se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción, están los que inhiben la síntesis de la pared celular, como los β -lactámicos que interfieren con las enzimas responsables de la síntesis de peptidoglicano, también se encuentran los que inhiben la síntesis de proteínas como los macrólidos, aminoglucósidos y tetraciclinas que se unen a la subunidad 30s del ribosoma y están aquellos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos como las fluoroquinolonas (Blair, 2015). Sin embargo, el uso excesivo de fungicidas, antibióticos y otros productos químicos para el control de los microorganismos patógenos ha resultado en la generación de resistencia por parte de éstos (Tenover, 2006, Blair, 2015).

Entre los mecanismos de resistencia bacteriana se encuentran aquellas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), éstas se caracterizan por estar presentes en bacilos Gram negativos, principalmente en enterobacterias y cuya aparición se debe al uso indiscriminado de antibióticos como los β -lactámicos, que son el fármaco que comúnmente se utiliza para el tratamiento de infecciones bacterianas, los cuales se unen a las proteínas encargadas de la síntesis de la pared celular. Las BLEE son enzimas que confieren resistencia a un gran número de antibióticos debido a que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico de los antibióticos volviéndolos ineficientes (Ramón, 2003; García-Tello, 2014; Shaikh, 2015).

Entre las bacterias BLEE productoras se encuentran *E. coli*, la cual se detectó primeramente en infecciones nosocomiales. Sin embargo, hoy en día se ha convertido en la bacteria más comúnmente aislada en distintas áreas de hospitales, entre estas bacterias también se encuentra *K. pneumoniae* que de manera normal se encuentra como saprofito en humanos y forma parte de la microbiota intestinal. Sin embargo, existen cepas como *K. pneumoniae* BLEE que al igual que *E. coli* BLEE son multirresistentes a distintos fármacos y son las principales causantes de bacteremias por la dificultad en su control (García-Hernández, 2011; Shaikh, 2015).

Otras de las bacterias de interés médico debido a su capacidad de evasión a los antibióticos es *P. aeruginosa* IMP/MEM (R), resistente a imipenem y meropenem que son antibióticos de amplio espectro que recientemente se introdujeron para ser utilizados en el tratamiento de infecciones nosocomiales provocadas por patógenos multirresistentes (Ochoa, 2013; Buehrle, 2017).

Los antibióticos carbapenémicos tienen la capacidad de alterar la síntesis de la pared celular, debido a su elevada afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), ya que al unirse a los residuos de serina de las PBP impiden el ensamblaje correcto del peptidoglicano. Sin embargo, la resistencia a los carbapenémicos como el meropenem e imipenem principalmente se debe por la acción de carbapenemasas que hidrolizan los antibióticos de manera que evitan que éstos se unan a las PBP de las bacterias. Otro de los mecanismos de resistencia a estos fármacos es la sobreexpresión de bombas de flujo, ya que en bacterias multirresistentes dichas bombas no son muy específicas por lo que pueden transportar una amplia gama de sustratos sin importar su estructura molecular, de manera que la bacteria expulsa del citoplasma compuestos tóxicos como los antibióticos, o bien induce a la formación de biopelículas que les confieren una estructura de protección y resistencia contra el ambiente (Monge, 2013; Blair, 2015).

Las bacterias, por su tiempo de generación, son más susceptibles a desarrollar resistencia mediante la adquisición de genes por diferentes mecanismos como: la transducción, en donde los bacteriófagos actúan como vectores transfiriendo el material genético de una bacteria a otra, por transformación que hace referencia a la captación e incorporación de material genético exógeno, por conjugación en donde participan estructuras que permiten el intercambio de material genético de una célula a otra, o ya sea por presión de selección, por ejemplo, por el indiscriminado uso de antibióticos (Shaikh, 2015; Tenover, 2006).

2.7 Justificación

Actualmente muchos patógenos de plantas e incluso de humanos, presentan resistencia a los antimicrobianos utilizados tradicionalmente, ya sean pesticidas, fungicidas, bactericidas o cualquier otro producto químico utilizado para el control de las enfermedades debido a su manejo irresponsable e indiscriminado por varias décadas (Price, 2015).

Por lo que se ha vuelto una necesidad encontrar alternativas que permitan controlar la población o al microorganismo en sí. Para ello es importante la búsqueda de nuevos compuestos o tecnologías que sean amigables con el medio ambiente. Debido a esto el uso de extractos de plantas ha cobrado gran interés. Aquellas que producen una gran cantidad de metabolitos secundarios han recibido atención, aunado a ello es importante considerar la abundancia y fácil acceso de los materiales a investigar. Es así como *Argemone mexicana* se ofrece como una excelente alternativa, debido a que es considerada una maleza y por la variedad de moléculas que ésta produce. Por lo que resulta interesante acoplar los metabolitos producidos por esta planta en la síntesis de nanopartículas metálicas, lo cual podría resultar en un efecto sinérgico contra microorganismos patógenos de plantas y humanos, favoreciendo así a encontrar nuevos mecanismos de control para patógenos, además de que este proceso de síntesis es amigable con el medio ambiente.

3.- Hipótesis

Las nanopartículas de oro y plata sintetizadas con extracto de *Argemone mexicana* inhiben el crecimiento *In vitro* de algunos hongos fitopatógenos, algunas bacterias de interés médico y de la levadura *Candida albicans*.

4.- Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto antimicrobiano de nanopartículas de oro y plata sintetizadas con extracto de *A. mexicana*

4.2 Objetivos específicos

Caracterizar el extracto de *A. mexicana* mediante espectroscopia UV-Vis.

Determinar las propiedades antioxidantes del extracto de *A. mexicana*.

Sintetizar nanopartículas de plata y oro recubiertas con extracto de *A. mexicana*.

Caracterizar por microscopía electrónica de barrido las nanopartículas sintetizadas con extracto de *A. mexicana*

Determinar el efecto antimicrobiano, en condiciones in vitro, de las nanopartículas producidas vía síntesis verde.

5.- Materiales y métodos

5.1 Muestreo

La planta *A. mexicana* se colectó en el estado de Querétaro, en el municipio de Querétaro, en las coordenadas: 20.6481033, -100.3321360. La colecta se realizó siguiendo la descripción de (Hussein, 2017). La muestra fue trasladada al laboratorio de biomateriales aplicados del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro.

5.2 Preparación del extracto y curva de calibración

Argemone mexicana se secó a temperatura ambiente. Se recuperaron las hojas secas y se lavaron con etanol al 70%, se volvieron a secar a temperatura ambiente y fueron trituradas con un molino de alimentos, marca Krups®, hasta la obtención de polvo fino. Se pesaron 5 gramos del polvo y se colocaron en un sobre de papel filtro, de 2µm de poro, para la extracción vía Soxhlet durante 24 h. Para ello se utilizaron 150 mL de isopropanol grado reactivo.

Transcurrido el tiempo, el extracto se colocó en un Rotavapor BUCHI® R-100, a 105mV y a 40°C, para eliminar el solvente. Se obtuvo un volumen final de 50 mL, de los cuales 25mL se pusieron a secar a temperatura ambiente en una caja de Petri de vidrio y 25 ml se guardaron en refrigeración para realizar la síntesis verde.

De los 25 mL que se pusieron a secar, se obtuvieron 164.2 mg de peso seco, de los cuales 44.1mg fueron utilizados para realizar una solución saturada en 10mL de isopropanol para preparar la curva de calibración del extracto; para ello se realizaron soluciones que van de 50ppm a 200ppm, como se muestra a continuación, y se tomaron mediciones de absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis VwR1600® en el intervalo de longitud de onda de 200 a 700nm. Los datos obtenidos se graficaron utilizando el programa GraphPad Prism 7.

Tabla 1. Diagrama de la metodología usada para realizar las mediciones del extracto de *A. mexicana* mediante espectroscopia UV-Vis.

PPM	mL de extracto de <i>A. mexicana</i>	
50	0.113ml	Aforar cada solución a 10
60	0.136ml	
70	0.158ml	
80	0.181ml	
90	0.204ml	

100	0.226ml	mL con Isopropanol
125	0.272ml	
150	0.340ml	
175	0.396ml	
200	0.453ml	

5.3 Capacidad antioxidante

5.3.1 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de *A. mexicana* mediante ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)

La determinación de flavonoides en el extracto de *A. mexicana* se llevó a cabo en el Laboratorio de Metabolitos y Nanocompositos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto. Para determinar la capacidad antioxidante del extracto, se pesaron 1.5 mg de 2-2 Difenil-1-picrilhidrazilo (sigma®) y se disolvió en 20 ml de metanol y se agitó por ultrasonido durante 30 minutos.

Para realizar el ensayo se colocaron 20µL de extracto de *A. mexicana*, sin diluir, en una microplaca y después se añadieron 200µL de la solución de DPPH, la reacción se mantuvo en reposo, en condiciones de oscuridad por 60 minutos. Posteriormente se realizó la medición de la absorbancia mediante espectrofotometría UV-Vis en un espectrofotómetro (Thermo Multiskan GO®) en un rango de longitud de onda de 520nm. Se utilizó una curva estándar de Trolox con mediciones en intervalos de 10 minutos hasta llegar a los 90 minutos. Los resultados se reportaron como mg equivalentes Trolox por gramo de muestra (mg EQ trolox /g de muestra).

5.4 Determinación de compuestos fenólicos

5.4.1 Fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se colocaron 5mL de reactivo Folin-Cicalteu al 10%, disuelto en agua, en un matraz de 50 mL, con 4mL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 7% y 1mL del extracto de *A. mexicana*; se mantuvo en oscuridad y agitación durante 60 minutos, posteriormente se midió su absorbancia mediante espectrofotometría UV-Vis en un rango de longitud de onda de 600 a 800nm.

Se realizó una curva estándar a partir de una solución de ácido gálico 50µg/mL, se realizaron diferentes diluciones, en agua destilada estéril, a concentraciones de 50µg/mL, 40µg/mL, 30µg/mL, 20µg/mL y 10µg/mL. Todas las soluciones fueron llevadas a un volumen de 1mL. Posteriormente en un matraz de 50mL se añadió cada solución y se le agregaron 5ml de reactivo Folin-Cicalteu al 10%

y 4mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7%, se mantuvo en agitación constante durante 60 minutos y posteriormente se midió la absorbancia en un rango de longitud de onda de 600 a 800nm. La cuantificación de fenoles totales en el extracto de *A. mexicana* se realizó interpolando los resultados con la curva estándar de ácido gálico y los resultados se reportaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg Eq AG/g de muestra)

5.4.2 Determinación de flavonoides y taninos

La determinación de flavonoides en el extracto de *A. mexicana* se llevó a cabo en el Laboratorio de Metabolitos y Nanocompositos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto, para ello se colocó 1mL de extracto de *A. mexicana* en 5mL de metanol y se sonicó durante 30 minutos. Posteriormente se tomaron 50 μL de esa solución y se colocaron en una microplaca, se añadieron 180 μL de agua destilada y 20 μL de 2-aminoeetildifenilborato al 1%. Para la muestra blanco se colocaron 50 μL de extracto y se añadieron 200 μL de metanol, las reacciones se mantuvieron en oscuridad durante 5 minutos y se colocó la microplaca en un espectrofotómetro (Thermo Multiskan GO®) para medir la absorbancia a 404nm. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se reportaron como mg Eq de rutina /g de muestra.

La determinación de taninos en el extracto de *A. mexicana* se llevó a cabo igualmente en el laboratorio de metabolitos y nanocompositos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto. Para realizar el ensayo se colocó 1mL de extracto de *A. mexicana* en 1mL de metanol, se colocó en agitación durante 30 minutos y posteriormente se tomaron 50 μL de esa solución y se colocaron en una microplaca, después se añadieron 200 μL de una solución estándar de HCl:Vainillina (volumen 1:1). Para la muestra blanco se colocaron 50 μL del extracto con 200 μL de HCl al 4%. El ensayo se realizó por triplicado y la absorbancia de las muestras se midió en la longitud de onda de 492nm en el espectrofotómetro (Thermo Multiskan GO®). Se utilizó una curva estándar de Catequina y los resultados obtenidos se reportaron como mg Eq de Catequina/ g de muestra.

5.5 Síntesis verde de nanopartículas

Para la síntesis verde de nanopartículas se prepararon 100mL de nitrato de plata (AgNO_3 1mM) y 100mL de cloruro de oro (AuCl_3 1mM), ambas soluciones se almacenaron en contenedores color ámbar, para su posterior uso.

5.5.1 Síntesis verde de nanopartículas de plata y oro

Esta síntesis se realizó a tres relaciones de volumen, 1:1, 1:2, 2:1 (sal: extracto), en un volumen final de 6 mL. Para ello se colocaron 3 mL de la solución de nitrato de plata (AgNO_3 1mM) en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, en una bureta se colocaron 3mL del extracto de *A. mexicana* y por goteo intermitente se agregó el extracto sobre la solución de AgNO_3 , la reacción se mantuvo 15 minutos

en agitación constante. Todas las síntesis se realizaron a diferentes temperaturas 25°C, 40°C, 60°C y 80°C. La formación de nanopartículas se monitoreo mediante espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 200 a 700nm.

5.5.2 Síntesis química de nanopartículas de plata y oro

Para la síntesis química de nanopartículas de oro se siguió el protocolo Turkevich modificado, el cual se utilizó un sistema de reflujo con un matraz de tres bocas en el cual se colocaron 20mL de cloruro de oro (AuCl_3 1mM); la solución se mantuvo en agitación y se calentó en aceite a 110°C. Se monitoreo la temperatura del AuCl_3 y una vez alcanzados los 90°C se añadieron 5mL de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 1mM). La reacción se mantuvo en agitación durante 5 minutos y una vez que se observó el cambio de color de amarillo a color violeta (indicador de la formación de nanopartículas), se retiró del aceite y la solución se guardó en un frasco ámbar para su uso posterior.

La síntesis química de nanopartículas de plata se realizó siguiendo la metodología estandarizada en el laboratorio de Biomateriales Aplicados del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro. Para ello se utilizó un sistema de reflujo con un matraz de tres bocas. Se añadieron 50mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (7mM) al matraz y se calentó a 90°C, en agitación constante. Posteriormente con una pipeta de vidrio se tomó 1mL de la solución de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ y se monitoreo el pH; una vez que la solución alcanzó los 90°C y pH de 8 se añadieron 0.5ml de AgNO_3 (0.1M), la reacción se mantuvo en agitación durante 5 minutos y se observó un ligero cambio de color, de café a gris.

5.6 Caracterización de las nanopartículas por microscopía electrónica de barrido de alta resolución

Se seleccionaron las nanopartículas de plata (AgNPs) y oro (AuNPs), obtenidas vía síntesis verde a 25°C y 80°C; las cuales se lavaron con agua destilada e isopropanol. Para ello se centrifugaron a 10,000rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y al precipitado se añadió nuevamente agua destilada o isopropanol, después se sonicó durante 8 minutos. Este proceso se realizó seis veces consecutivas, de las cuales en las dos primeras se utilizó isopropanol para eliminar el exceso de extracto (no incorporado) y los lavados siguientes se realizaron con agua destilada. La limpieza de las nanopartículas se verificó mediante espectrofotometría UV-Vis, dentro del intervalo de 200 a 700 nm.

Las muestras de nanopartículas limpias, 25°C AgNPs, 80°C AgNPs, 25°C AuNPs y 80°C AgNPs, se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución, para ello fue utilizado el equipo Hitachi® SU8230. Las muestras se sonicaron durante 8 minutos a 50Hz, posteriormente con ayuda de un capilar se colocó una gota de cada muestra sobre el porta-muestras y se dejó secar 24h antes del análisis. La microscopía fue realizada por la M. en I.Q. Alicia del Real López,

responsable del Laboratorio de Microscopía del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro.

5.7 Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata y oro

5.7.1 Actividad antifúngica de las nanopartículas

Para los ensayos in vitro se utilizó el medio PDA (Agar Papa Dextrosa), el cual se esterilizó a 121°C 15 minutos. Las cepas de hongos utilizadas fueron: *A. alternata*, *F. oxysporum*, *S. rolfsii*, *R. solani*, donadas por el Dr. Ulises Esquivel Naranjo, del Laboratorio de Microbiología Molecular (LAMIMO) de la Facultad de Ciencias Naturales, Campus Aeropuerto, de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Para conservar las cepas de hongos, éstos se crecieron en PDA con papel celofán, después de siete días el papel celofán fue retirado con unas pinzas y colocado en una caja de Petri para ser secado a 28°C durante 48h, todo esto se realizó en condiciones de esterilidad. Una vez que pasaron 48h, el papel celofán fue retirado y se cortó en trozos pequeños y éstos fueron colocados en tubos Eppendorf para conservar las cepas en ultracongelación.

De igual manera, en PDA sin celofán se crecieron los hongos, cuando éstos presentaron crecimiento, se cortaron trozos pequeños con ayuda de un bisturí y se colocaron en tubos cónicos con glicerol al 100% para su almacenamiento a 4°C.

Para determinar la actividad antifúngica de las nanopartículas, primero se inoculó el hongo sobre una caja de Petri con medio PDA y al mismo tiempo se colocaron los discos de papel filtro con 100µL de cada solución de nanopartículas y con el extracto de *A. mexicana*, como control positivo se utilizó fungicida comercial, Benomilo 50, en concentraciones de 5µL (100µg/µL), 10µL y 20µL. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 y 7 días.

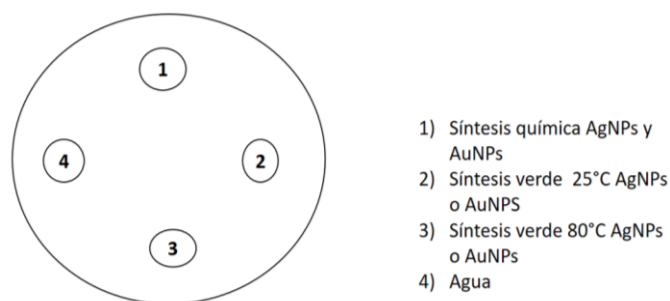


Figura 2. Diagrama del ensayo en hongos fitopatógenos

5.7.2 Actividad antibacteriana de nanopartículas.

Para determinar la actividad antibacteriana de las nanopartículas de oro y plata se utilizó la técnica Kirby Bauer (Hudzicki, 2009), las bacterias se sembraron en el medio de cultivo Mueller Hinton (MCD LAB®).

Las bacterias utilizadas fueron *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* BLEE (+), *E. coli* ETP (R), *E. coli* BLEE (+) y *P. aeruginosa* IMP/MEM (R) cepas pertenecientes al cepario de bacterias del Laboratorio de Microbiología Molecular (LAMIMO), de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto. Las bacterias se crecieron en agar nutritivo durante 24h y posteriormente se inoculó caldo nutritivo con cada una de las bacterias y se incubó de 18 a 24h a 37°C. Posteriormente se ajustó a 1.00 la DO₆₀₀ en el espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis®), se colocaron 200µL de cada cultivo en las placas de Mueller Hinton y con ayuda de un hisopo estéril se sembró por toda la placa e inmediatamente con ayuda de unas pinzas se colocaron 4 discos de papel filtro estéril sobre la placa. Posteriormente se colocaron 60µL de cada solución de nanopartículas, así como de extracto de *A. mexicana* como se muestra a continuación.

Como control positivo se utilizaron los siguientes antibióticos: Ampicilina (10µg/µL) en concentraciones de 5µL, 10µL y 15µL y Gentamicina (10µg/µL) en concentraciones de 5µL, 10µL y 15µL. Las placas se incubaron a 37°C, 24h después se midió el diámetro del halo de inhibición con un calibrador vernier, los ensayos se realizaron por triplicado y se realizó una prueba de Anova.

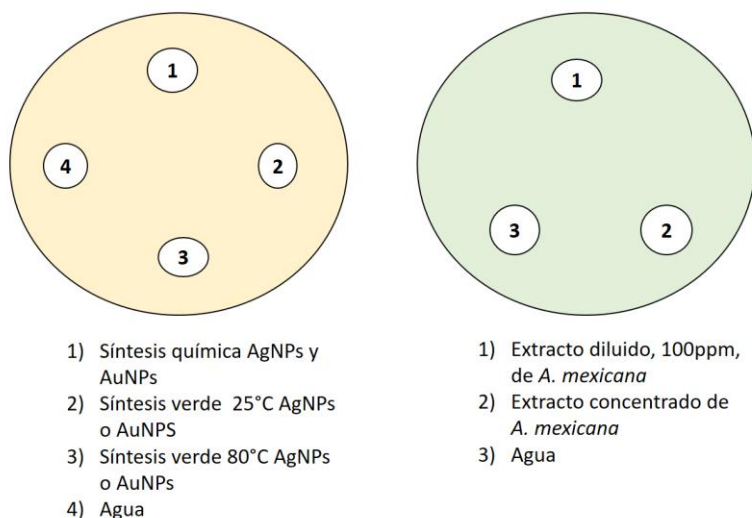


Figura 3. Diagrama del ensayo de difusión en disco para las pruebas en bacterias y en *C. albicans*

5.7.3 Actividad antimicrobiana de nanopartículas en la levadura *Candida albicans*

Para esta levadura se utilizó medio de cultivo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% dextrosa). Se incubó 24h a 28°C y una vez transcurrido ese tiempo se tomaron de 4 a 5 colonias, se colocaron en un tubo cónico (de 50mL) con 5mL de medio YPD y se incubaron 18h a 28°C a 150 rpm de agitación. Posteriormente se midió la DO_{600} en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis®) y se ajustó a 1.00 de DO, se colocaron 200µL del cultivo en la placa y con ayuda de un hisopo se extendió por toda la placa, inmediatamente se colocaron los discos, de papel filtro estéril, y sobre cada uno de ellos se colocaron 60µL de cada solución de nanopartículas y de igual manera se determinó el efecto del extracto de *A. mexicana* como se muestra en el diagrama anterior.

Como control positivo se utilizó Higromicina B (0.2µg/µL) en concentraciones de 5µL, 10µL y 15µL. Las placas se incubaron a 28°C, después de 24 h se midió el halo de inhibición con ayuda de un vernier. El ensayo se realizó por triplicado y se realizó una prueba de ANOVA.

5.8 Análisis termogravimétrico de nanopartículas sintetizadas vía síntesis verde y de extracto de *A. mexicana*

Para realizar el análisis termogravimétrico se utilizaron 26mg de peso seco de cada solución de nanopartículas de plata, sintetizadas a 25°C y a 80°C, así como del extracto de *A. mexicana*. Para ello se realizó la síntesis verde correspondiente a un volumen de 50ml y posteriormente se dejó secar en un horno de cocina a 30°C durante 24hrs.

6.- Resultados y discusión

6.1 Colecta y obtención del extracto

La planta *A. mexicana* se recolectó en una zona poco perturbada del estado de Querétaro, Figura 4, en el mes de febrero del 2018. Esta planta por lo general florece durante todo el año y por ser considerada una maleza, su obtención no es un problema por lo cual es un buen recurso para la síntesis de nanopartículas (Hussein, 2017). Con esta colecta se realizaron todos los ensayos previos para la síntesis de nanopartículas, así como la biosíntesis de estas, con la finalidad de evitar variación en la concentración de los metabolitos presentes en la planta cuando fue colectada.



Figura 4: *Argemone mexicana*. (Diana Téllez)

A partir del extracto de *A. mexicana* en isopropanol se realizó una curva de calibración a distintas concentraciones en partes por millón (ppm), haciendo uso de la espectroscopía Uv-visible. Los datos de la espectroscopia ultravioleta-visible (Uv-vis) revelan tres bandas de absorción bien definidas a cualquier concentración dentro del rango de 30 a 200ppm; la primera de ellas apareció alrededor de los 220nm, la segunda aproximadamente a los 411 nm y la tercera cerca de los 666 nm (figura 5). Con base en las bandas de absorción reveladas en el espectro Uv-vis del extracto de *A. mexicana* en isopropanol, es posible suponer que los metabolitos presentes en este extracto sean: clorofila a y b, que por lo general presentan su máxima absorbancia Uv-vis en el rango de 400 a 500 nm y decae en 600 nm, esto se debe a que las clorofilas son los principales pigmentos fotosintéticos (Karp, 2009). Adicionalmente, otros compuestos de *A. mexicana* se han reportado como: la jatrorrhizina, columbamina, dehidrocorildamina y oxibarberina, los cuales presentan absorbancia Uv-vis en longitudes de onda entre los 220 a 230 nm; de los cuales los dos últimos tienen propiedades antimicrobianas dado que ya se han caracterizado y purificado de manera que se comprobó su

efectividad contra el crecimiento de microorganismos como las bacterias y algunos hongos (Singh 2009, 2010).

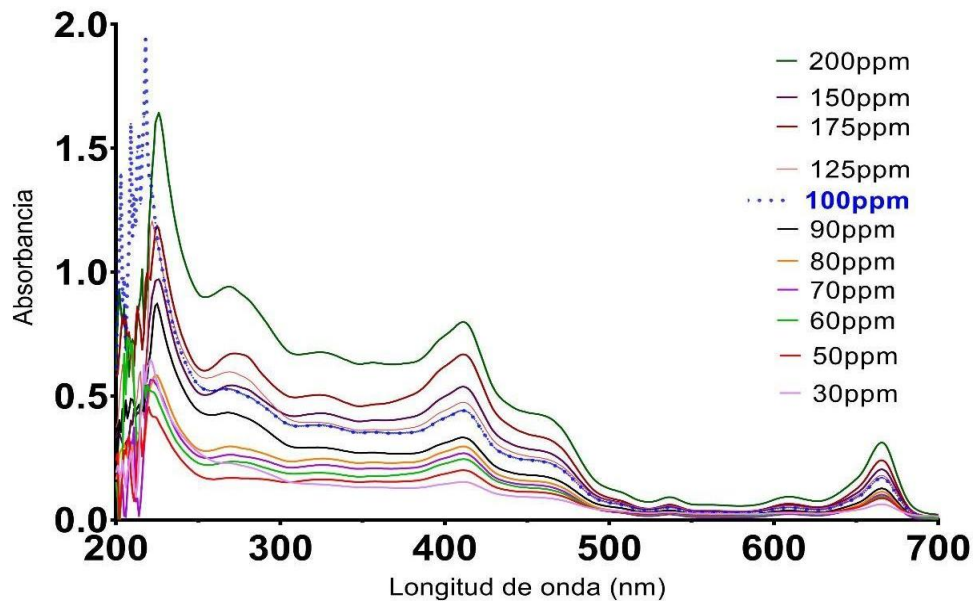


Figura 5: Espectro UV-Vis del extracto de *A. mexicana*. Se realizaron mediciones de soluciones preparadas de 30ppm a 200ppm del extracto preparado con isopropanol, en el rango de longitud de onda de 200 a 700nm.

En un estudio de mayor profundidad, es necesario realizar una caracterización con más detalle del extracto de manera que se tenga una descripción más adecuada respecto a otros componentes que probablemente puedan tener un efecto antimicrobiano, por ejemplo, determinar la presencia de saponinas, purificación e identificación de otros compuestos por técnicas analíticas como; cromatografía líquida de alta eficacia o resonancia magnética nuclear, esto con la finalidad de identificar su posible aplicación dado que *A. mexicana* es utilizada en la herbolaria tradicional como una planta con propiedades medicinales ya que es usada para el tratamiento de infecciones en la piel, del tracto intestinal y en algunos lugares se usa para el tratamiento de la malaria (Bhattacharjee, 2010; Kumari, 2013).

6.2 Capacidad antioxidante

6.2.1 Determinación de la capacidad antioxidante mediante ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Por lo anterior, se realizó la determinación de la actividad antioxidante por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) del extracto isopropanólico; para ello se utilizó la curva de

calibración del Laboratorio de Metabolitos y Nanocompositos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto, con una $R^2= 0,977$ para DPPH.

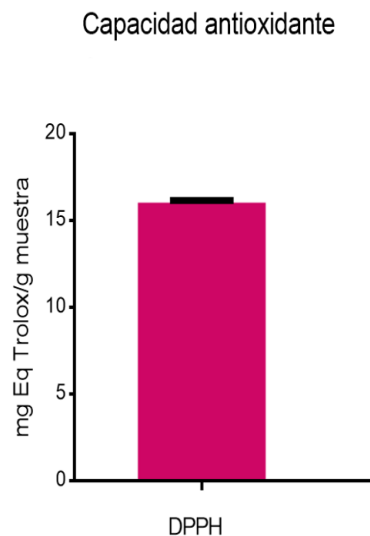


Figura 6. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto isopropanólico de *A. mexicana*. La capacidad antioxidante se determinó por el ensayo DPPH los resultados se expresan como: mg Eq Trolox/g muestra. El ensayo se realizó por triplicado y se indica la desviación estándar.

El ensayo para la determinación de la capacidad antioxidante mediante DPPH indicó una equivalencia de 16.06 mg Eq Trolox/g muestra; el trolox (6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) es una molécula conocida por su capacidad antioxidante razón por la cual es utilizada como compuesto de referencia, de ahí que los resultados se expresen en equivalentes trolox. Los valores de DPPH encontrados en el extracto de *A. mexicana* se encuentran por debajo de la media del estudio realizado por Tovar (Tovar, 2013), donde se evaluó la capacidad antioxidante de distintos extractos de plantas. Sin embargo, los solventes utilizados fueron distintos al isopropanol, razón por la cual los valores difieren dado que los metabolitos extraídos varían en función del solvente y de su polaridad.

6.3 Determinación de compuestos fenólicos

De igual manera se llevó a cabo la determinación de compuestos fenólicos tales como: taninos, flavonoides. Para ello se utilizó la curva de calibración del Laboratorio de Metabolitos y Nanocompositos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto, cuya R^2 es de 0,999 para Taninos, 0,989 para Flavonoides, figura 8.

6.3.1 Determinación de fenoles totales

Adicionalmente, utilizando el ensayo de Folin-Cicalteu se determinó la cantidad de fenoles totales en el extracto de *A. mexicana*, para lo cual se realizó la curva de calibración con ácido gálico con una R^2 de 0,9734 (figura 7), los resultados se muestran a continuación.

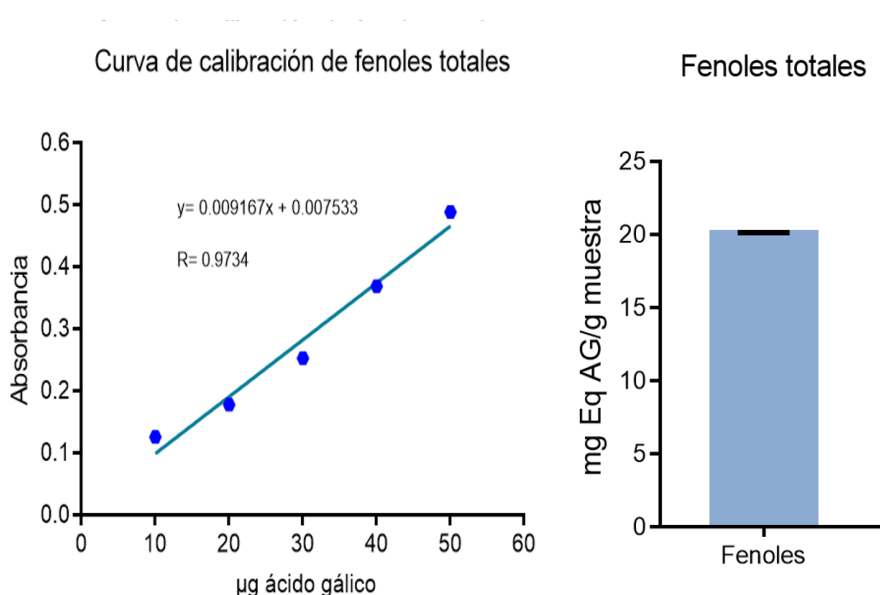


Figura 7: Contenido de fenoles totales del extracto de *A. mexicana*. Curva de calibración (izquierda), contenido de fenoles totales(derecha) los resultados se expresan como: mg Eq ácido gálico/g muestra, e indican la media de tres repeticiones y su desviación estándar.

La determinación de fenoles totales dio como resultado 20.11mg Eq de AG/g muestra, cantidad que está por arriba del promedio del estudio que realizó Tovar (Tovar, 2013) en el cual se analizaron 30 muestras de extractos de plantas diferentes cuyos resultados indican valores de entre 6 y 8 µg Eq AG/mg muestra por lo cual el extracto isopropanólico de *A. mexicana* tiene un contenido mayor respecto a la cantidad de fenoles mostradas en el estudio referido. Se ha reportado que dichos componentes fenólicos presentan actividad antimicrobiana, lo cual puede explicar el uso de la planta en tratamientos contra infecciones en la herbolaria mexicana tradicional. Como ya se mencionó, el contenido de fenoles totales se puede ver afectado por el solvente con el cual es obtenido el extracto (Estevinho, 2008; Brahmachari, 2013), por lo que nuestros resultados toman relevancia al indicar que para la obtención de mayor cantidad de fenoles totales a partir de esta planta es adecuado utilizar isopropanol debido a que se detectó una gran cantidad de estos compuestos.

6.3.2 Determinación de flavonoides y taninos

Anteriormente, se había reportado la presencia de taninos, flavonoides y azúcares reductores en *A. mexicana* en el estudio realizado por Sahu (Sahu, 2012). Sin embargo, los ensayos realizados solamente mostraban ausencia o presencia de estos compuestos y no se tenía una cuantificación

de los mismos, es decir, solo se realizó un estudio cualitativo. Los análisis realizados para este trabajo indican que el extracto de *A. mexicana* presenta 234 mg Eq Catequina/g muestra de taninos, y 388.3 mg Eq Rutina/g muestra de flavonoides, figura 8. De manera interesante, estos valores son mayores a lo reportado para taninos y flavonoides en el extracto acuoso de flor de Jacaranda y a otros extractos de plantas como: *Passiflora rubra*, que en la herbolaria tradicional se utiliza como relajante; *Peperomia acuminata*, que es una planta ornamental y se conoce que algunos aceites esenciales de ésta tienen propiedades antimicrobianas, reportados por Tovar (Tovar, 2013). Debido a que estos compuestos fenólicos pueden tener propiedades antibacterianas es necesario una caracterización más detallada del extracto de *A. mexicana*, como ya se mencionó mediante una separación por cromatografía de gases- espectrometría de masas (GC-MS) y HPLC de manera que permita realizar una posible aplicación biomédica de los componentes activos.

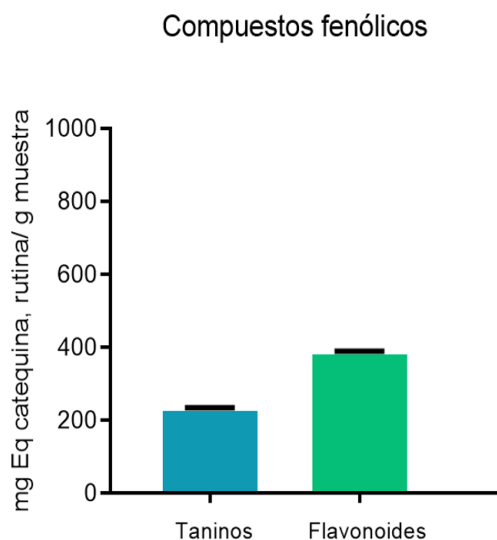


Figura 8. Determinación de compuestos fenólicos del extracto isopropanólico de *A. mexicana*. Los resultados se expresan para taninos: mg Eq catequina /g muestra; flavonoides: mg Eq Rutina/g muestra. La determinación se realizó por triplicado y se indica la desviación estándar.

Además, los compuestos como los taninos y los flavonoides presentan propiedades antifúngicas como lo reporta Espinosa (Espinosa Ruiz, 2012), quién observó que el uso de taninos presenta un efecto inhibitorio mayor en el crecimiento de hongos, como *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, en comparación con los flavonoides cuyo efecto se ve disminuido. Sin embargo, se concluyó que si se emplean en conjunto presentan un efecto sinérgico, de manera que la inhibición en el crecimiento de hongos es más efectiva (Espinosa Ruiz, 2012).

Derivado de los resultados obtenidos en este trabajo, se propone que es necesario realizar en trabajos posteriores una comparación del proceso de extracción, utilizando para ello distintos

solventes para identificar si existe una diferencia significativa en la cuantificación de fenoles totales y otros componentes como los taninos y flavonoides en el extracto de *A. mexicana*.

6.4 Síntesis verde de nanopartículas de plata y oro

A partir del extracto isopropanólico de *A. mexicana* se realizó la síntesis (biosíntesis) de nanopartículas de plata y oro por reducción química, para ello se mezcló la solución de nitrato de plata y cloruro de oro con extracto de *A. mexicana* a una concentración de 100 ppm, dicha concentración fue el estándar que se tomó para realizar todos los experimentos, y se monitoreo la formación de nanopartículas mediante espectroscopia UV-Vis como se muestra a continuación (figuras 9 y 10).

6.4.1 Síntesis verde de nanopartículas de plata

La biosíntesis de nanopartículas puede ser medida de manera cualitativa por cambio de color, de manera que en la biosíntesis de nanopartículas de plata el cambio de color fue de verde a color marrón (Alsammarraie, 2018). Sin embargo, con la finalidad de hacer el análisis cuantitativo se monitoreo por espectroscopia UV-Vis la intensidad del plasmón superficial de las nanopartículas de plata, el cual muestra una banda de absorción cerca de los 420 nm; lo cual indica la formación de éstas. Los resultados sugieren que las nanopartículas sintetizadas presentaban tamaños de partícula menores a los 50 nm, ya que por lo general el rango en que normalmente se encuentran las nanopartículas de plata sintetizadas por esta vía es entre 430 y 450 nm (Logeswari, 2013; Alsammarraie, 2018).

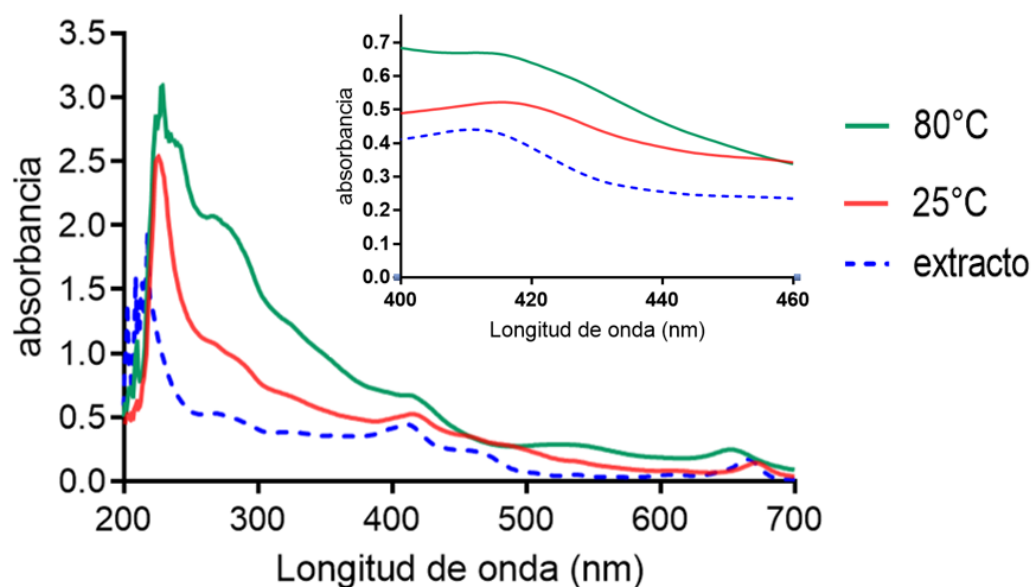


Figura 9: Espectro UV-Vis de la síntesis verde de nanopartículas de plata. Nanopartículas de plata sintetizadas a temperatura de 25°C (rojo), 80°C(verde). Se muestra el extracto *A. mexicana* a 100 ppm (línea punteada).

Además, es posible observar que la absorbancia aumenta conforme incrementa la temperatura, de acuerdo a lo reportado en la literatura, ya que a temperaturas mayores a 25°C la velocidad de reacción tiende a ser mayor, razón por la cual se observan estos cambios en la absorbancia de las muestras, indicando diferencias en la absorbancia para aquellas síntesis que se realicen a temperatura ambiente en comparación con una síntesis que se realicen a temperaturas mayores (Khalil, 2014).

6.4.2 Síntesis verde de nanopartículas de oro

De la misma manera se monitoreo la biosíntesis de nanopartículas de oro, así mismo se graficaron los valores de absorbancia del extracto de *A. mexicana* para tener un dato que indicara sí hubo formación de nanopartículas. A pesar de que los valores de absorbancia de la biosíntesis se encuentran por arriba de lo obtenido para el extracto, lo cual indica la formación de nanopartículas, a simple vista no es posible ver un pico de absorbancia entre 520 y 560nm, figura 10, rango en el cual, según la literatura, se encuentra el plasmón de las nanopartículas de oro. A pesar de ello, de manera cualitativa el cambio de color, de color verde a rosa o violeta, indica la formación de nanopartículas (Sujitha, 2013; Elia, 2014).

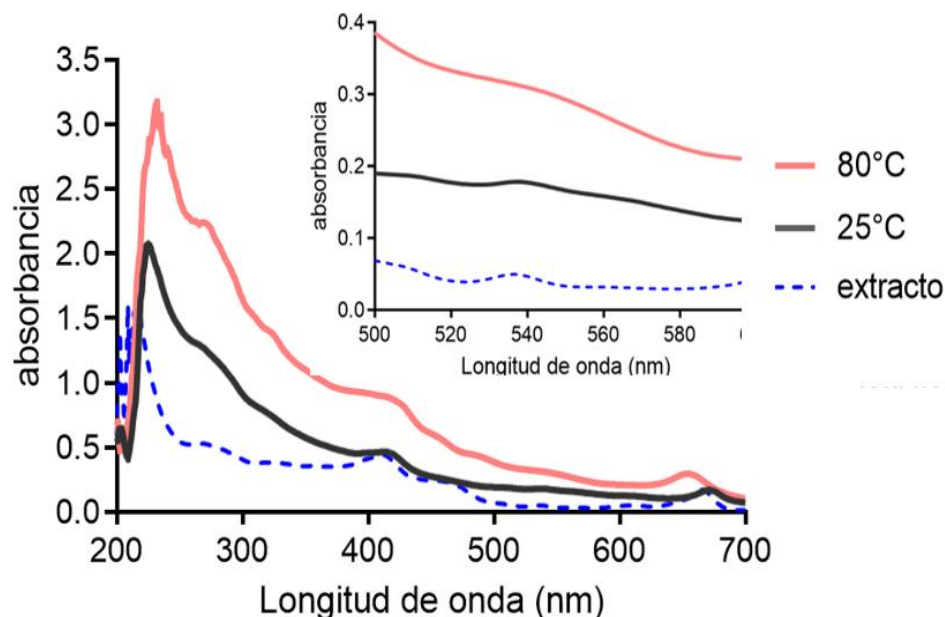


Figura 10. Espectro UV-Vis de la síntesis verde de nanopartículas de oro. Nanopartículas de oro sintetizadas a temperatura de 25°C (negro), 80°C (rosa). Se muestra el extracto *A. mexicana* a 100 ppm (línea punteada).

Sin embargo, cabe mencionar que la temperatura si tiene un punto importante en la formación y síntesis de nanopartículas, ya que, según lo reportado en la literatura, a temperaturas mayores a 50°C se pueden formar nanopartículas de tamaño menor además de que es posible observar con mejor claridad el pico de absorbancia, ya que como se mencionó anteriormente a temperaturas

mayores la absorbancia incrementa (Jiang, 2011; Khalil ., 2012). Es por ello, que se lavaron ambas muestras (las nanopartículas de oro y plata), para observar y lograr identificar un plasmón de absorbancia y verificar la formación de nanopartículas.

6.4.3 Análisis de nanopartículas limpias de plata y oro por espectroscopia UV-Vis.

Para comprobar que la biosíntesis de nanopartículas se llevó a cabo correctamente se buscó eliminar la mayor cantidad de extracto no incorporado durante la reacción, para ello se lavaron las muestras con isopropanol y agua destilada, la limpieza fue monitoreada mediante espectroscopia UV-Vis (figuras 11 y 12).

Las gráficas de la figura 11 indican una disminución clara en la absorbancia de las muestras, esto indica que el proceso de lavado se realizó de manera adecuada, de igual manera conforme se hacían los lavados se observó una disminución en el color de la muestra. Sin embargo, en el espectro UV-Vis de las muestras sintetizadas a 25°C y 80°C con extracto de *A. mexicana* ya limpias no observamos picos de absorbancia, lo cual sugiere que no existen nanopartículas o bien son de tamaño muy pequeño y por ello no es posible su detección precisa por este método.

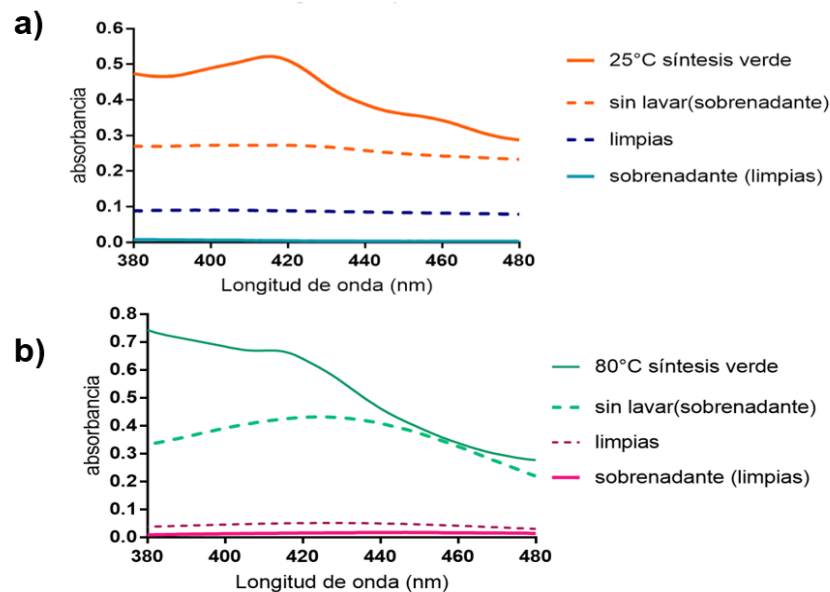


Figura 11: Espectro UV-Vis de las nanopartículas de plata limpias. AgNPs 25°C(a) y AgNPs 80°C(b) por síntesis verde

De la misma manera se limpiaron las nanopartículas de oro, utilizando solvente y agua destilada. Sin embargo, el pico de absorbancia solamente se observa en las nanopartículas limpias de oro a 25°C, figura 12, lo cual indica que efectivamente si hay formación de nanopartículas, caso contrario a la síntesis de 80°C, figura 12b, en la cual no se obtuvo un pico de absorbancia que haga referencia a la formación de nanopartículas. Debido a estos resultados obtenidos las muestras ya limpias de nanopartículas, tanto las de oro como las de plata, se sometieron a un análisis de microscopía

electrónica de barrido de alta resolución para confirmar la presencia y características de las nanopartículas, puesto que ésta es un método más preciso.

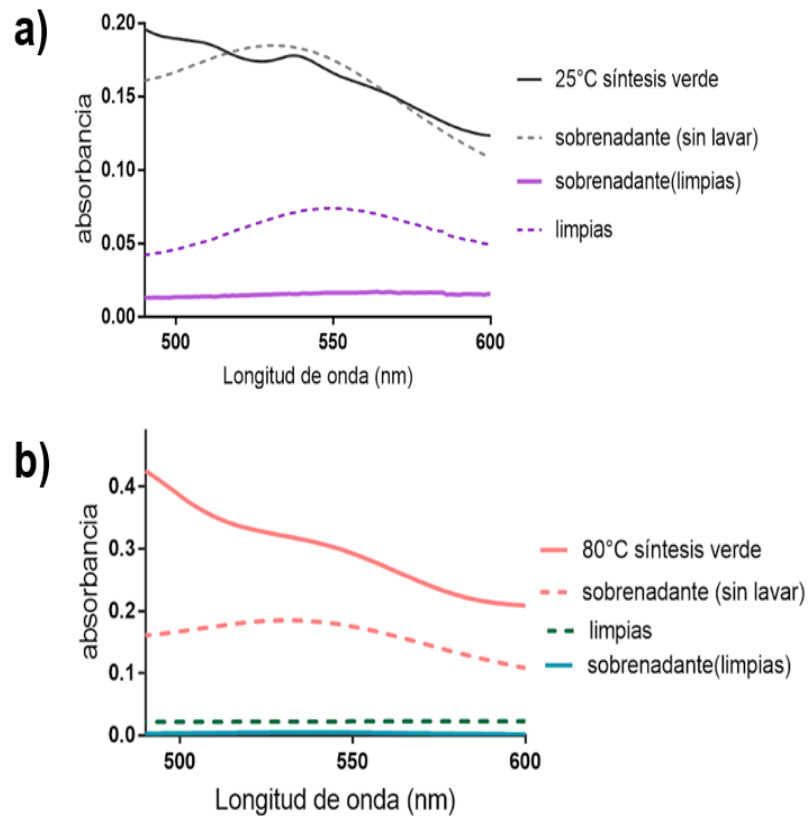


Figura 12. Espectro UV-Vis de las nanopartículas de oro limpias. AuNPs 25°C (a) y AuNPs 80°C (b) por síntesis verde

6.5 Microscopía electrónica de barrido de alta resolución de nanopartículas de plata y oro sintetizadas con extracto de *A. mexicana*

Con la finalidad de confirmar la formación y a la vez caracterizar las nanopartículas de plata y oro sintetizadas a temperatura controlada de 25°C y 80°C, se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido de alta resolución, las micrografías indican la presencia de nanopartículas, las cuales se describen a continuación (figuras 13 y 14).

El análisis de microscopía electrónica de barrido de alta resolución confirma la presencia de nanopartículas de plata y oro mediante síntesis verde. En ambos casos, tanto a 25°C como a 80°C, se detectó la presencia de materia orgánica que recubre a las nanopartículas, de igual manera se pueden observar diferencias entre las temperaturas de síntesis, dado que a 25°C existen nanopartículas aglomeradas recubiertas por una capa de extracto de *A. mexicana*, esto a pesar de que se limpiaron previamente con la finalidad de eliminar el exceso de extracto. Sin embargo, no fue

posible eliminarlo del todo, dado que en las micrografías (figura 13) se observa la presencia de materia orgánica sugiriendo que se trata de una unión física fuerte entre los componentes del extracto y las nanopartículas debido a la presencia de una matriz de extracto (Sujitha, 2013).

En las micrografías correspondientes a la síntesis verde realizada a 80°C, se observó que existe una mayor dispersión de las nanopartículas de plata. A pesar de ello, ambas muestras indican la presencia de formas semiesféricas contenidas dentro de una matriz de extracto perteneciente a *A. mexicana*.

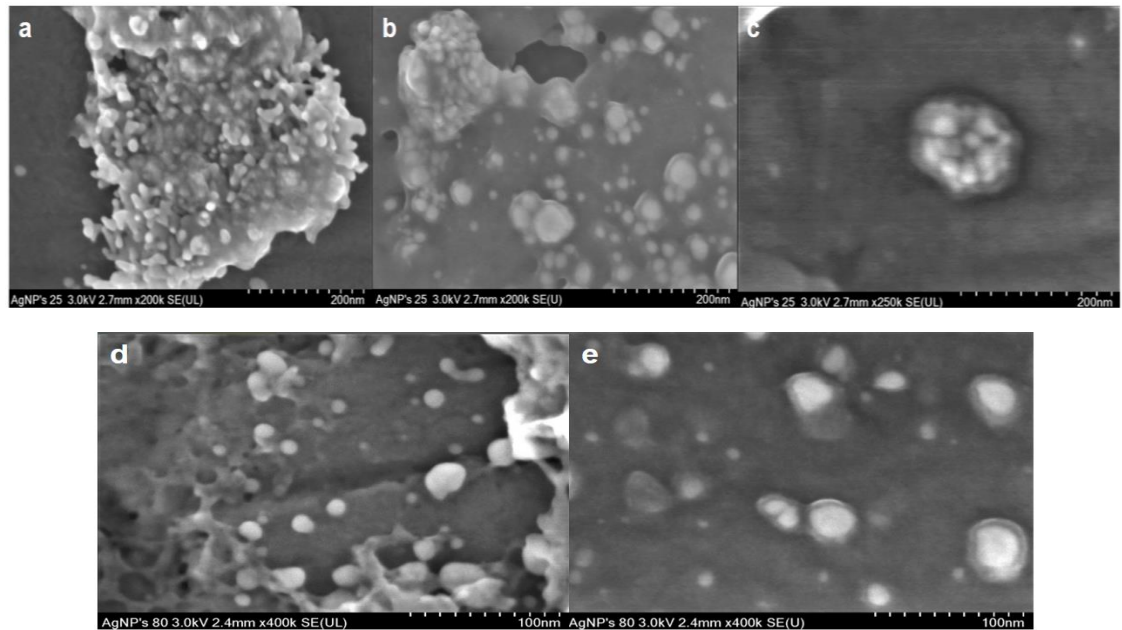


Figura 13: Microscopia electrónica de barrido de alta resolución de nanopartículas de plata. Síntesis verde de nanopartículas a 25°C (a,b,c) y 80°C (d,e) sintetizadas con extracto de *A. mexicana*.

Respecto a las micrografías de nanopartículas de oro se siguió el mismo procedimiento. Sin embargo, es más notorio el efecto de la temperatura en la dispersión y aglomeración de las nanopartículas, como se aprecia en las micrografías de la figura 14, las nanopartículas sintetizadas a 80°C se muestran más aglomeradas. Sin embargo, siguen manteniendo la cubierta de materia orgánica.

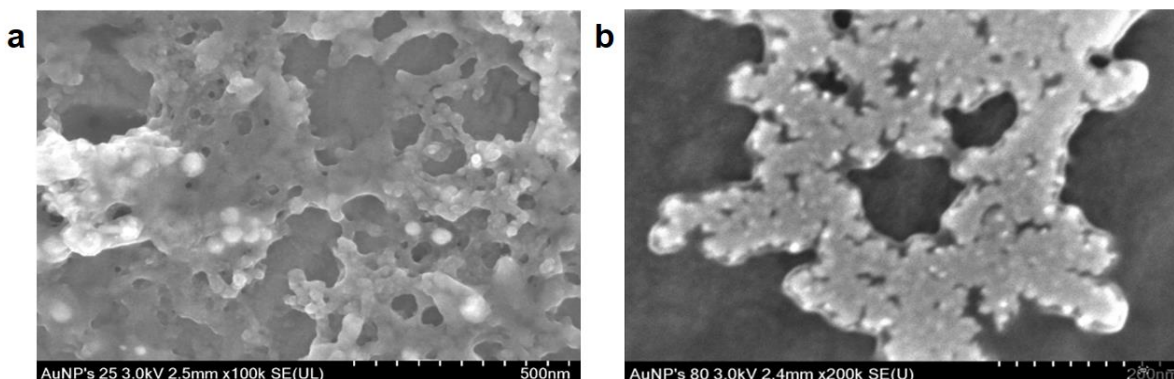


Figura 14: Microscopía electrónica de barrido de alta resolución de nanopartículas de oro. Síntesis verde de nanopartículas de oro a 25°C(a) y 80°C(b) sintetizadas con extracto de *A. mexicana*.

Previamente, se reportó el uso del extracto etanólico de *A. mexicana* en conjunto con la síntesis de nanopartículas de hierro, en este caso, se observó que las partículas producidas se encuentran más dispersas y son tamaño uniforme entre los 10 y 30nm. Sin embargo, modificaron el método de obtención de éstas ya que primero sintetizaron de manera química las nanopartículas y posteriormente las mezclaron con el extracto, en volúmenes iguales, por lo que la dispersión o aglomeración de las mismas se puede ver afectada por el proceso de síntesis, así como la unión de las moléculas del extracto a las partículas (Arokiyaraj, 2013). Mientras que nuestras nanopartículas de plata producidas con el extracto de la misma planta, se encuentran entre el rango de 10-50nm, aunque es importante señalar que en la biosíntesis a 80°C no fue posible tener una medida aproximada dado que las nanopartículas se encuentran muy aglomeradas, esto a pesar de que antes de proceder al análisis de microscopía se lavaron las muestras varias veces consecutivas con la finalidad de eliminar el exceso de extracto de manera similar a lo que se hizo con las nanopartículas de plata, por lo cual lo anterior es una aproximación.

Un aspecto que es importante de estudiar es cómo en función de la preparación del extracto de la planta, las nanopartículas producidas pueden cambiar. Puesto que no está documentado cuáles son los componentes del extracto responsables de la unión a la nanopartícula o si es que en realidad se unen o solamente es una cubierta tipo surfactante o en dado caso si todos los compuestos se mantienen o se pierden algunos en el proceso de síntesis a distintas temperaturas y cómo es que afectan a la forma que las nanopartículas pueden llegar a tener ya que se ha reportado que si se hacen variaciones en la cantidad de extracto utilizado para la síntesis cambia la forma de la nanopartícula, ya que también puede determinar la agregación o no de éstas, aunque en realidad no solamente queda la nanopartícula de manera individual, más bien son agregados de nanopartículas rodeados por una matriz de extracto de manera que pueden coexistir unas que se encuentren dispersas y cúmulos de éstas dentro de la misma solución (Sujitha, 2013; Khalil, 2014).

6.6 Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata y oro sintetizadas con extracto de *A. mexicana*

El uso excesivo de fármacos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias, ha provocado un aumento en la resistencia por parte de éstas a los antibióticos. Por lo que es necesario el uso de nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones. Una de las opciones que actualmente existe y que se ha estado abordando, es el uso de la llamada química verde la cual utiliza material biológico para sintetizar materiales como las nanopartículas las cuales no tienen un efecto tóxico en el ambiente y en humanos, por lo cual tienen potencial para aplicaciones biomédicas (MubarakAli, 2011; Das, 2017).

Para determinar el efecto antibacteriano de la síntesis verde de nanopartículas de plata y oro se realizaron ensayos de difusión de disco, para ello se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, respectivamente (figuras 15, 16 y 17), debido a que son bacterias pertenecientes a la clasificación Gram positivas y negativas. Pudiendo así analizar el resultado de las partículas en función de la diferencia en la composición de la pared celular. Aunado a ello, en el caso de *P. aeruginosa* se le asocia a infecciones nosocomiales con más frecuencia, además presenta mayor probabilidad de generar resistencia a los antibióticos ya que se ha reportado que México tiene el mayor consumo de éstos de toda Latinoamérica por lo cual se favorece la resistencia a desinfectantes o antibióticos, de manera que dificulta el control de estos microorganismos y el tratamiento de las infecciones que provocan (Arias-Flores, 2016). Considerando este hecho, también se realizaron ensayos en bacterias resistentes a antibióticos como: *P.aeruginosa* IMP/MEM (R), *K. pneumoniae* BLEE (+), *E.coli* ETP (R), *E.coli* BLEE(+), cuyos resultados se muestran en la figura 18.

6.6.1 Efecto antibacteriano de nanopartículas de plata y oro en *S. aureus*

Los resultados de los ensayos realizados en *S. aureus*, muestran que la síntesis química de nanopartículas de plata no tiene ningún efecto en la inhibición del crecimiento de esta bacteria, lo mismo sucedió con la síntesis química y verde de nanopartículas de oro con las cuales no presentan ningún tipo de inhibición en el crecimiento de esta bacteria (figura 15). Sin embargo, el extracto de *A. mexicana* por sí solo, y más importante aún al ser utilizado en la síntesis verde de nanopartículas de plata a 25°C y 80°C, presentaron inhibición de manera significativa, puesto que se obtuvo un promedio de halos de inhibición de 20mm, 14mm y 13mm respectivamente, siendo mayor la inhibición obtenida por el extracto, figura 15. A pesar de que no hay diferencia significativa entre el tratamiento con extracto y antibiótico, usado como control positivo, sí existe una diferencia entre el extracto respecto a la síntesis verde de nanopartículas de plata por lo que probablemente la biosíntesis de nanopartículas tenga un efecto sinérgico.

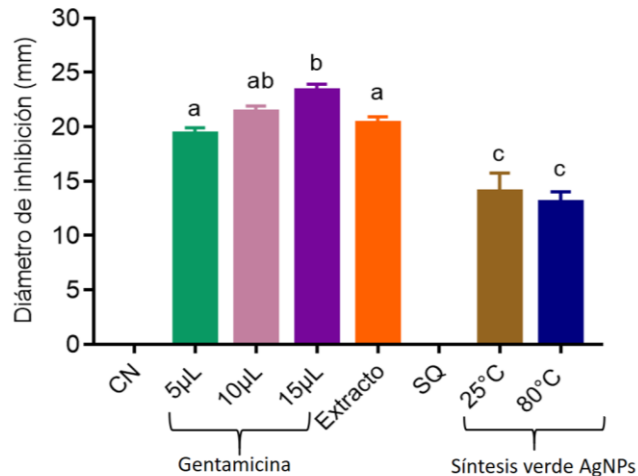
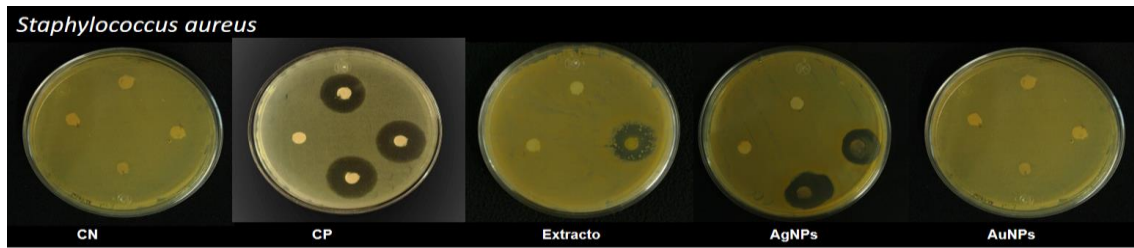


Figura 15: Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata y oro en *S. aureus*. De izquierda a derecha: Control negativo agua (CN), control positivo (CP) Gentamicina (10µg/µL), extracto de *A. mexicana* (60µL), síntesis química (SQ), síntesis verde de nanopartículas de plata(60µL) 25°C y 80°C, y síntesis verde de nanopartículas de oro AuNPs(60µL) 25°C y 80°C.

Los resultados en los ensayos en *S. aureus* indican que las nanopartículas de plata, sintetizadas de manera química, no tienen un efecto en el crecimiento de esta bacteria, a pesar de que existe la hipótesis que indica que las nanopartículas de plata pueden inhibir la respiración celular y desestabilizar la pared celular (Li W., 2011) y por lo tanto matar a la célula. De la misma manera, las nanopartículas de oro no mostraron efecto alguno. Si bien, el oro puede llegar a tener ciertas propiedades bactericidas se debe en parte al tamaño de nanopartícula y a la forma que ésta tiene, ya que, a tamaños muy pequeños, del orden de 10 nm o menos, presentan propiedades antibacterianas, además de que hay otros factores que pueden influenciar el tamaño, por ejemplo, el pH (Khalil, 2012; Mubarakali, 2011). Por lo que tal vez las nanopartículas de oro sintetizadas y utilizadas en nuestros ensayos no posean ni la forma ni el tamaño adecuado como para provocar un efecto inhibitorio en bacterias.

6.6.2 Efecto antibacteriano de nanopartículas de plata y oro en *P. aeruginosa*

Los resultados en *P. aeruginosa* mostraron que el extracto es más efectivo por sí solo con una media de inhibición de 22mm, anteriormente ya se ha reportado la actividad antimicrobiana del extracto de *A. mexicana* en cepas de *Pseudomonas* resistentes a antibióticos (Sahu, 2012). Sin embargo, en

conjunto con nanopartículas puede estar funcionando de otra manera, motivo por el cual se observan valores de inhibición por debajo de los obtenidos con el extracto, figura 16, ya que se pueden estar perdiendo componentes importantes de la planta durante el proceso de síntesis o bien se altera el medio provocando que funcionen de manera distinta, ya que hay que tener en cuenta que las nanopartículas están cubiertas por una matriz de extracto como se aprecia en las micrografías electrónicas por lo cual el primer contacto con la bacteria es por parte del extracto mismo. A pesar de esto, se conoce que la actividad de nanopartículas de plata sintetizadas de manera química está dada por el contacto superficial con las células por lo que en conjunto con extractos de plantas tienen propiedades distintas que le proporcionan una eficiencia mayor (Salomoni, 2017). Además, es importante considerar, que la cantidad de extracto que se está utilizando puede llegar a ser mayor que el extracto mismo que está presente en las nanopartículas.

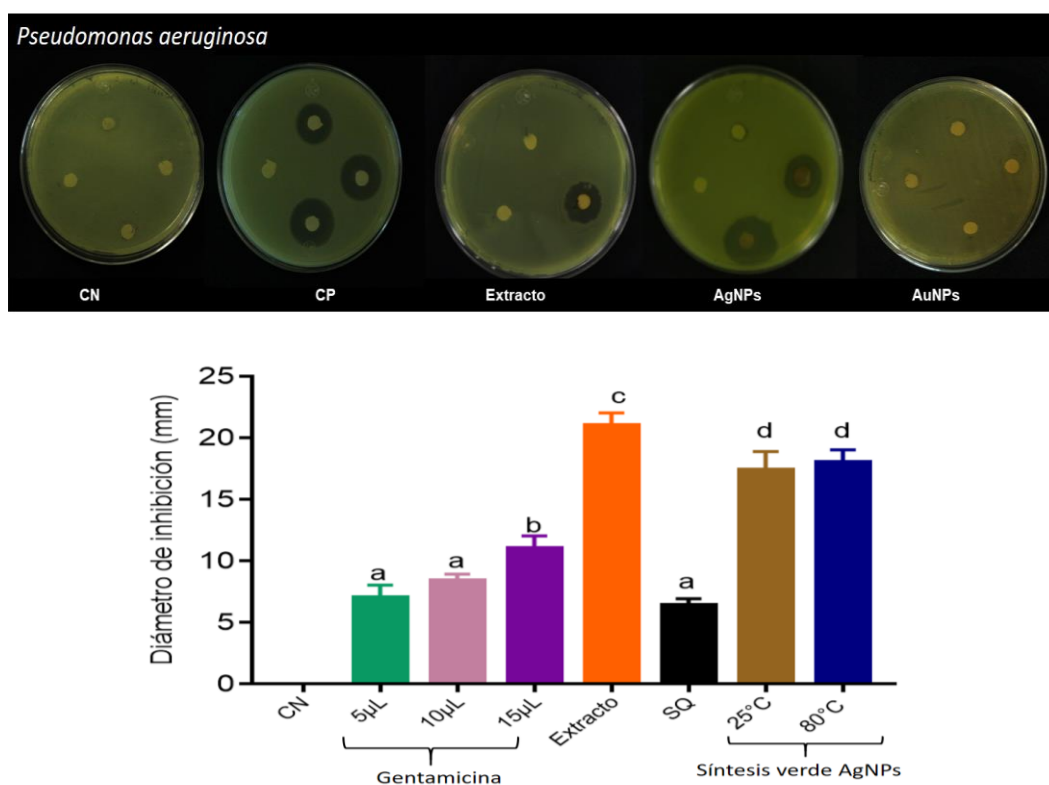


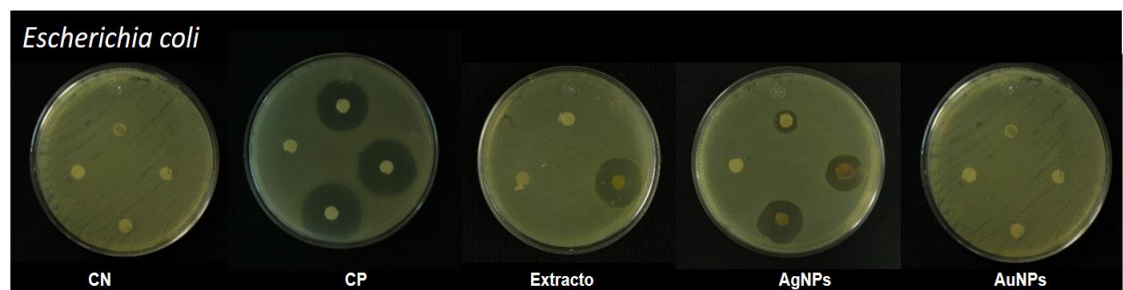
Figura 16: Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata y oro en *P. aeruginosa*. De izquierda a derecha: Control negativo (CN), control positivo (CP) Gentamicina (10µg/µL), extracto de *A. mexicana* (60µL), síntesis química (SQ) 60µL, síntesis verde de nanopartículas de plata (60µL) 25°C y 80°C, y síntesis verde de nanopartículas de oro 60µL) 25°C y 80°C.

Al comparar los resultados de la síntesis verde de nanopartículas de plata con respecto al tratamiento con antibiótico, si hay una diferencia significativa entre estos dos tratamientos de manera que la síntesis verde funciona relativamente mejor que la Gentamicina la cual es un antibiótico de amplio espectro, el cual actúa inhibiendo la síntesis de proteínas (Hahn, 1969). Anteriormente se

había utilizado *A. mexicana* para la síntesis de nanopartículas, pero éstas eran nanopartículas de hierro las cuales mostraron actividad antibacteriana contra *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* y *E. coli* (Arokiyaraj, 2013) y su eficiencia fue similar a los resultados aquí descritos, aunado a ello debemos considerar que el extracto fue preparado con otro solvente, por lo cual la composición de éste puede ser distinta.

6.6.3 Efecto antibacteriano de nanopartículas de plata y oro en *E. coli*

Finalmente, en el ensayo para analizar las propiedades antibacterianas de las nanopartículas utilizamos a *E. coli*. Los resultados indican una diferencia significativa entre los tratamientos de síntesis verde y síntesis química (figura 17). Sin embargo, el halo de inhibición respecto a la síntesis química tiene una media de inhibición de 11mm respecto a la media de 16mm obtenido con la síntesis verde a 25°C y 80°C cuya media de ésta es de 20mm. Mientras que el tratamiento con extracto de *A. mexicana* se comporta de manera similar al tratamiento con antibiótico, que se utilizó como control positivo, que muestra un mejor efecto que la síntesis de nanopartículas, a pesar de ello se sabe que *E. coli* al igual que otras bacterias puede mostrar resistencia al tratamiento con fármacos debido a que modifican la estructura del antibiótico volviéndolo inactivo. Si bien, los resultados muestran valores de inhibición, por parte de la síntesis verde de nanopartículas obtenidas a 25°C y 80°C, por debajo del tratamiento con antibiótico, es importante señalar que hasta la fecha no se ha reportado que exista resistencia por parte de bacterias a la plata en forma de nanopartícula por lo cual pueden tener potencial de ser utilizadas en un futuro para el tratamiento de infecciones bacterianas (Alsammarraie, 2018).



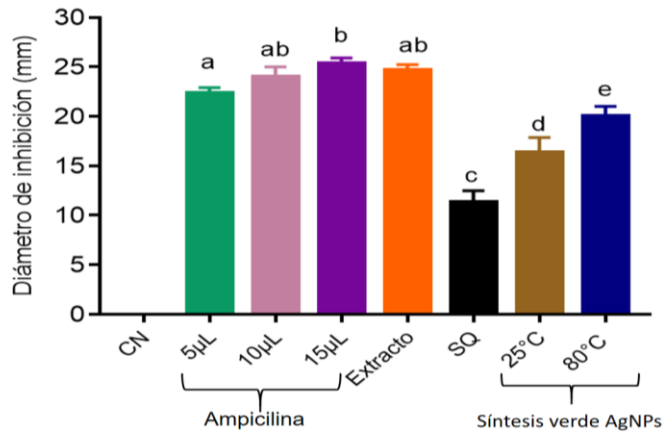


Figura 17: Actividad antibacteriana de nanopartículas de plata y oro en *E. coli*. De izquierda a derecha: Control negativo agua (CN), control positivo (CP) Ampicilina (10µg/µL) 5µL, 10µL y 15µL, extracto de *A. mexicana* (60µL), síntesis química (SQ) y síntesis verde de nanopartículas de plata(60µL) 25°C y 80°C.

Aunque los resultados muestran que las nanopartículas sintetizadas con extracto de *A. mexicana* son eficientes para controlar el crecimiento de bacterias, se han realizado estudios del posible mecanismo de acción para lograr tal efecto. Por ejemplo, se sugiere que el daño a las células bacterianas se debe a la unión de las nanopartículas de plata al peptidoglicano provocando su desestabilización, lo cual ocasiona la formación de pequeñas cadenas de péptidos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico que por sí solos son inestables en el ambiente celular induciendo la lisis celular de manera que las nanopartículas se unen a la membrana celular desestabilizándola (Mirzajani, 2011; Li W. , 2011; Maillard, 2018), es importante señalar que este proceso no solamente ocurre una sola vez, al contrario, ocurre múltiples veces en una misma célula, por el cual ésta no puede inducir una respuesta al daño o bien si es que ocurre no tiene la eficiencia suficiente como para revertirlo. De ahí que en la literatura la eficiencia de nanopartículas de plata en bacterias Gram positivas es más notoria, a pesar de que la pared celular de peptidoglicano es más gruesa, ya que se ha observado la deformación de las células y ruptura en la pared celular al exponer a cepas bacterianas a tratamientos con distintas concentraciones de nanopartículas de plata por lo cual se sugiere que esto es la principal fuente de daño ya que una vez desestabilizada la pared, quedará expuesta la membrana facilitando el contacto con las nanopartículas que permitirán o facilitarán la pérdida del contenido citosólico (Mirzajani, 2011; Li, 2010; Kumar, 2018; Alsammarraie, 2018).

Sin embargo, *P. aeruginosa* y *E. coli* son bacterias Gram negativas y observamos un efecto contrario respecto a la síntesis de nanopartículas, sintetizadas de manera química. En *S. aureus*, Gram positiva, donde según la literatura las nanopartículas tienen mejor actividad antimicrobiana dado que son bacterias cuya pared celular está más expuesta y se tiene la hipótesis de que las nanopartículas de plata se pueden estar uniendo con más afinidad al peptidoglicano (Alsammarraie, 2018; Mirzajani,

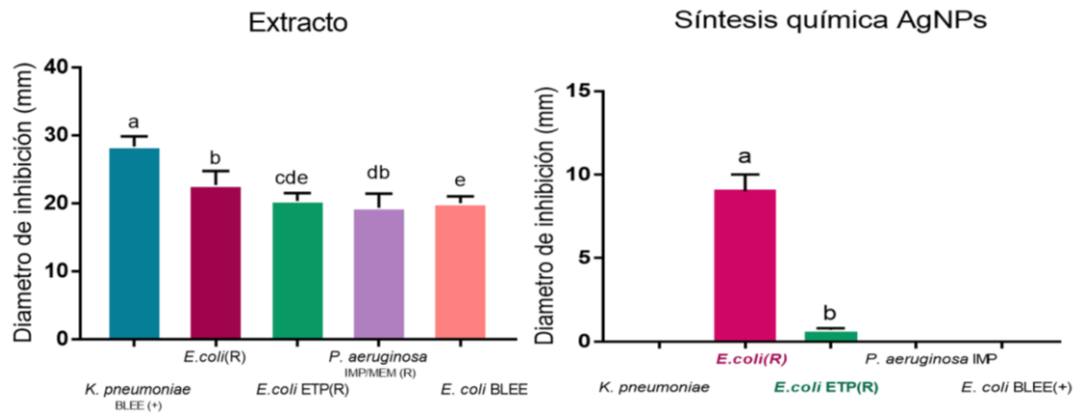
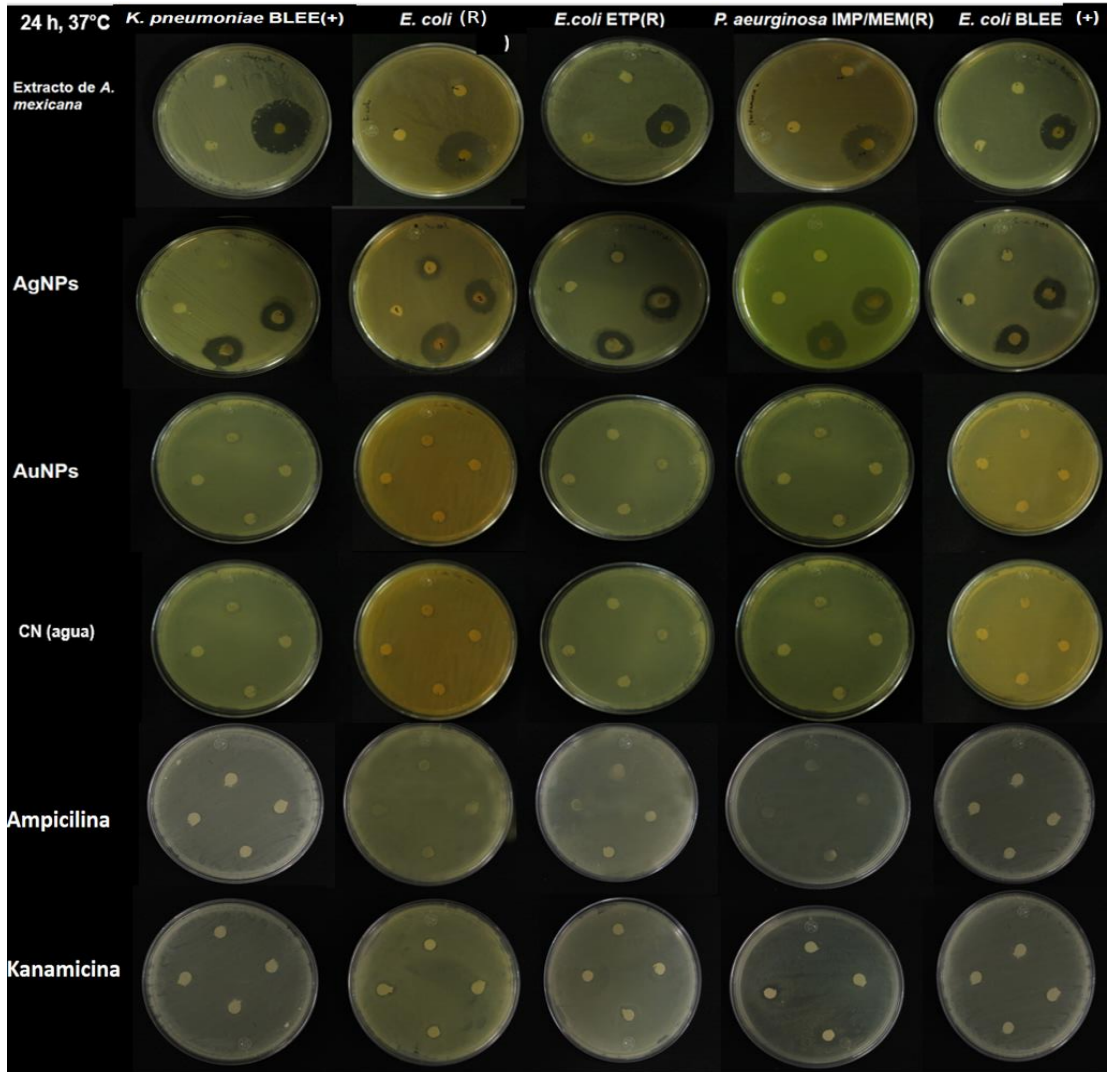
2011; MubarakAli, 2011). A pesar de ello se especula que la plata en forma de nanopartícula es capaz de inhibir la replicación de ADN, y desestabilizar las membranas celulares en bacterias y en conjunto con otros mecanismos aún no descritos es probable que actúen de manera sinérgica promoviendo la muerte de las células (Pal, 2007; Maillard, 2018).

6.6.4 Efecto antibacteriano de nanopartículas de plata y oro en bacterias resistentes a antibióticos

Debido a los resultados obtenidos en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, realizamos el mismo ensayo en bacterias resistentes a antibióticos esto con la finalidad de probar el efecto de las nanopartículas e identificar si tienen potencial de una aplicación futura para el control de microorganismos resistentes a fármacos que hoy en día representan un problema de salud (Das, 2017).

Los resultados indican que el extracto de *A. mexicana* es efectivo para la inhibición del crecimiento de bacterias resistentes a antibióticos, figura 18, y es un dato interesante debido a que cada una de ellas está asociada a infecciones que resultan ser difíciles de tratar debido a que *K. pneumoniae* BLEE (+) y *E. coli* BLEE (+) son bacterias resistentes a los fármacos β -lactámicos de espectro extendido lo cual significa que los antibióticos usados en el tratamiento de infecciones causadas por éstas bacterias resultan ser ineficientes lo cual representa un problema de salud grave ya que las infecciones se pueden adquirir en hospitales y fuera de ellos. Aunado a ello la administración de fármacos como las penicilinas, celafolsporinas y los carbapenémicos pueden provocar la presencia de convulsiones, en el caso de los carbapenémicos al ser administrado en conjunto de otros medicamentos. Además de la aparición de alergenicidad cruzada por la combinación de penicilinas en conjunto con fármacos como el imipenem, doropenem y los derivados de las cefalosporinas. De manera el uso frecuente de fármacos puede llevar a desarrollar necrólisis epidérmica tóxica la cual se caracteriza por la aparición de necrosis y desprendimiento de la epidermis derivada de las reacciones adversas hacia los fármacos o bien, se puede desarrollar el síndrome de Stevens-Johnson, que se caracteriza por la presencia de erupciones cutáneas de color rojo las cuales se expanden hasta la formación de ampollas. Por lo cual la administración de fármacos y sus efectos secundarios, así como la acumulación de éstos, de manera que el tratamiento resulta ser poco efectivo para controlar a los microorganismos (Monge, 2013; Buehrle, 2017).

A pesar de que las nanopartículas de oro fueron sintetizadas con extracto de *A. mexicana* no hubo ningún efecto positivo, por lo cual nuestras condiciones experimentales para sintetizar estas partículas no son las adecuadas para los ensayos debido a que se ha reportado un efecto positivo en la inhibición del crecimiento en bacterias que no son resistentes.



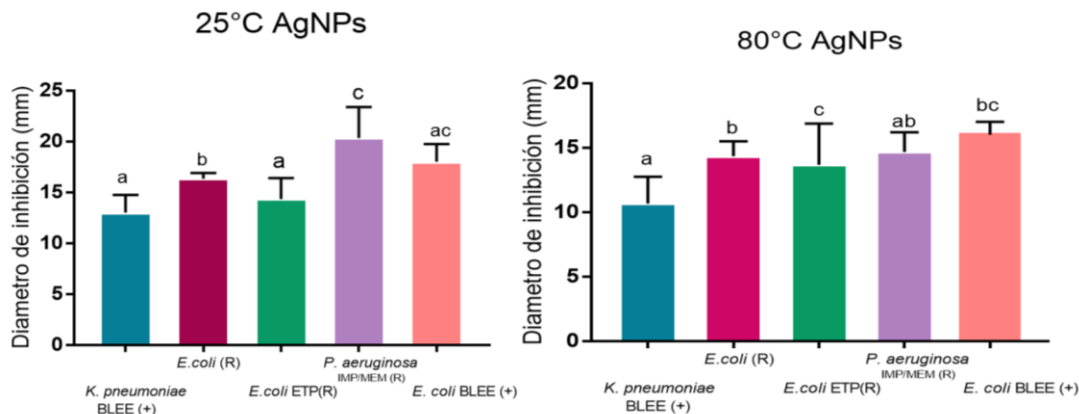


Figura 18. Actividad antibacteriana de nanopartículas de oro y plata en bacterias resistentes a antibióticos. Extracto de *A. mexicana* (60 μ L), síntesis química y síntesis verde de nanopartículas de plata (AgNPs) y oro (AuNPs) a 25°C y 80°C (60 μ L), como control negativo (CN) se utilizó agua y como control positivo se utilizó Ampicilina (10 μ g/ μ L) y Kanamicina (50 μ g/ μ L).

De igual manera la síntesis química de nanopartículas solamente presentó un efecto en la inhibición del crecimiento en *E. coli* (R) y *E. coli* ETP (R) con una media de inhibición de 9 mm y 0.7 mm respectivamente, teniendo un efecto nulo para las otras bacterias. A pesar de estos datos, su media de inhibición se encuentra, por mucho, debajo de los valores de inhibición que presenta la síntesis verde de nanopartículas en la cual el efecto es más notorio. La síntesis verde a 25°C de nanopartículas de plata mostró valores de inhibición mayores para *P. aeruginosa* IMP/MEM (R) con una media de inhibición de 20.3 mm, seguido de *E. coli* BLEE (+) con una media de inhibición de 18 mm, en donde *K. pneumoniae* BLEE (+) presentó los valores de inhibición más bajos con una media de 13 mm en la inhibición del crecimiento. Mientras que para la síntesis verde a 80°C se encontraron valores distintos en donde la media de inhibición fue mayor para *E. coli* BLEE (+), 16 mm, seguido de *P. aeruginosa* IMP/MEM (R) con una media de 14.6 mm y *E. coli* (R) cuya media de inhibición es de 14.3 mm y de igual manera *K. pneumoniae* BLEE (+) presentó una media de inhibición de 10.6 mm, siendo este valor el más bajo para el tratamiento de nanopartículas a 80°C.

Sin embargo, existen diferencias en la eficiencia debido a que se observa que el efecto antimicrobiano es mayor en la síntesis verde de nanopartículas de plata a 25°C en comparación con la síntesis verde a 80°C. Además, si se comparan estos resultados respecto a la eficiencia del extracto resultan ser valores de inhibición distintos debido a que en el caso del tratamiento con extracto el valor de inhibición fue menor para *P. aeruginosa* IMP/MEM (R) con una media de inhibición de 19.3 mm, mientras que para *K. pneumoniae* BLEE(+) presenta valores de inhibición mayores con una media de 28.3 mm pero esto se puede atribuir a que el extracto se encuentra más concentrado a como se utilizó para realizar la biosíntesis de nanopartículas, por lo cual no son las mismas concentraciones y en la síntesis verde se pierden componentes propios del mismo y el

complejo nanopartícula-extracto puede estar funcionando de diferente manera debido a esto o a las variaciones en la temperatura dado que se observan diferencias en los tres tratamientos.

Previamente se reportó el efecto antibacteriano del extracto de *A. mexicana* para cepas de *Pseudomonas* resistentes a antibióticos obtenidas de muestras clínicas. Sin embargo, no se utilizó isopropanol para su extracción ya que los solventes utilizados fueron: metanol, acetona y etanol (Sahu, 2012). En este estudio los valores de inhibición mayores fueron para el extracto obtenido con metanol, cuyos valores se encuentran entre los 15 mm y 17 mm, seguidos del extracto en acetona y etanol con una eficiencia menor en la inhibición. Aunado a ello de las 15 cepas de *Pseudomonas* utilizadas ninguna de ellas era resistente a imipenem y a meropenem (Sahu, 2012). Por lo cual el extracto de *A. mexicana*, obtenido con isopropanol resulta ser más efectivo para bacterias multirresistentes a antibióticos, o al menos en el caso de *P. aeruginosa* IMP/MEM (R) que presentó un valor de inhibición de 19.3 mm lo cual es mayor al obtenido en el estudio que realizó Sahu (Sahu, 2012) y esto es interesante debido a que el meropenem e imipenem son antibióticos derivados de los carbapenémicos, que resultan ser antibióticos de amplio espectro para el control de bacterias multirresistentes (Monge, 2013; Estepa, 2017). Sin duda, sería interesante probar el efecto que tiene el extracto obtenido con otros solventes, diferentes al isopropanol, en otras bacterias resistentes como las β -lactamasas de espectro extendido debido a que en nuestros resultados el extracto de *A. mexicana* obtenido con isopropanol resulta ser efectivo para éstas.

Actualmente, se requieren nuevas alternativas para el control de estos microorganismos. Por lo que la biosíntesis de nanopartículas utilizando plantas podrían ser una opción para el control de bacterias resistentes debido a que anteriormente ya se había reportado el uso de nanopartículas de plata sintetizadas con hojas de *O. gratissimum*, para la inhibición del crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* resistentes a antibióticos, en este estudio se observó que las nanopartículas de plata sintetizadas con estas plantas inducen a la generación de especies reactivas de oxígeno, que dañan a la membrana celular y como consecuencia las bacterias mueren (Das, 2017). Además, nuestros resultados muestran un espectro mayor de inhibición en los tratamientos aplicados, ya que se observó un efecto positivo en la inhibición del crecimiento en bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido como *K. pneumoniae* BLEE (+) y *E. coli* BLEE (+), las cuales son las principales causantes de bacteremias y se caracterizan por tener un arsenal de enzimas encargadas de inhibir los mecanismos de acción de los antibióticos (Ghafourian, 2014).

Es importante recalcar que los datos, respecto al funcionamiento que tienen las nanopartículas, son con base en aquellas que son obtenidas por síntesis química, y los resultados obtenidos en este trabajo difieren dado que no solamente son las nanopartículas por sí solas, sino que además están recubiertas con extracto de *A. mexicana*, ya que se ha observado que esta planta tiene propiedades antibacterianas e incluso en bacterias resistentes a antibióticos (Kumari, 2013; Sahu, 2012), como

se mostró en nuestros resultados en los ensayos con las cepas resistentes. Lo anterior les confiere diferentes propiedades a las nanopartículas sintetizadas y aún representa un reto demostrar el mecanismo por el cual funcionan en conjunto o de qué manera están unidos los componentes de la planta con la nanopartícula. Y cómo el complejo nanopartícula-extracto interactúa no solamente con el peptidoglicano si no con otros componentes en bacterias, por ejemplo: los lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas y cómo logran atravesar el espacio periplásmico, si es por endocitosis o si atraviesan libremente, para proceder a desestabilizar la membrana interna. Ya que como se mencionó anteriormente las nanopartículas aquí sintetizadas están recubiertas por una matriz de extracto por lo cual el primer contacto con las células bacterianas está a cargo del extracto mismo (Das, 2017).

6.7 Efecto antifúngico de nanopartículas de plata y oro, sintetizadas con extracto de *A. mexicana*

6.7.1 Actividad contra *C. albicans*

Para determinar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas sintetizadas con extracto de *A. mexicana* en *C. albicans* se realizó el mismo ensayo de difusión en placa, figura 19. Los resultados muestran que el tratamiento con Higromicina B funciona de manera limitada, debido a que su halo de inhibición a dosis crecientes se encuentra entre los 5mm y 10mm, si se compara con el extracto de *A. mexicana* concentrado que muestra un halo de inhibición de 20mm, aunque es importante señalar que el extracto diluido a 100ppm no tiene un efecto inhibitorio por sí mismo (figura 19). No obstante, en las nanopartículas, se puede observar un efecto positivo en el tratamiento con biosíntesis de nanopartículas a 25°C y 80°C, cuya media del halo de inhibición fue de 14mm y 18mm respectivamente, presentando una diferencia significativa entre estos tres tratamientos. Aunado a ello si se hace la comparación con el tratamiento de la síntesis química de nanopartículas que tiene un efecto nulo, contrario a lo reportado, en el que las nanopartículas sintetizadas de manera tradicional inhiben el crecimiento de esta levadura (Kim,2008; Panáček,2009). A pesar de ello, este dato no significa que todas las nanopartículas sintetizadas de manera química deban tener el mismo efecto, dado que hay variantes en la metodología, lo que sí es importante resaltar es que la biosíntesis de nanopartículas a diferencia de la síntesis química no tiene un efecto tóxico en humanos o en el ambiente (Senthil, 2017).

Aunque en la biosíntesis de nanopartículas de oro se utilizó el mismo extracto de *A. mexicana*, no se observó ningún efecto en la inhibición del crecimiento de la levadura. Sin embargo, el efecto nulo en *C. albicans* se puede atribuir a que se ha reportado que el oro en forma de nanopartícula no tiene la capacidad de inducir procesos que lleven a la producción de especies reactivas de oxígeno al

menos de que sean de tamaño muy pequeño, del orden de 10 nm o menos, ya que la actividad antimicrobiana de nanopartículas de oro depende del tamaño y forma (Elia, 2014).

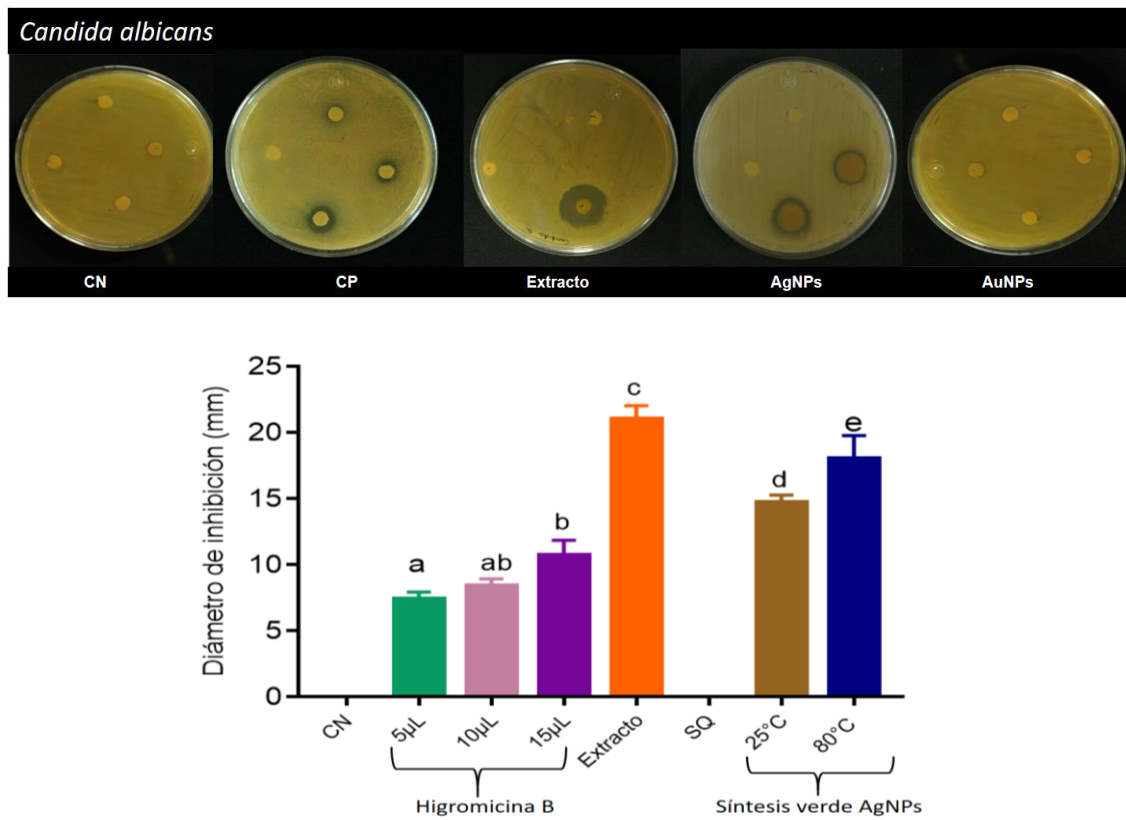


Figura 19. Actividad antifúngica de nanopartículas en la levadura *Candida albicans*. De izquierda a derecha: Control negativo (CN), control positivo (CP) Higromicina B (50µg/µL), extracto de *A. mexicana* (60µL), síntesis química (SQ) y síntesis verde de nanopartículas de plata 25°C y 80°C (60µL), síntesis química y verde de nanopartículas de oro 25°C y 80°C(60µL).

Como se ha mencionado, el extracto de *A. mexicana* es usado popularmente para el tratamiento de infecciones en la piel y gastrointestinales; así mismo se ha reportado su actividad antibacteriana (Brahmachari, 2013). Sin embargo, no se había reportado su uso antimicrobiano en levaduras patógenas como *C. albicans*. Cabe mencionar que ésta levadura actualmente es uno de los principales patógenos causantes de infecciones nosocomiales las cuales pueden ser de origen localizado o llegar a ser sistémicas (Panáček, 2009; Höfs, 2018) y el uso de fármacos para su tratamiento, ya sea el uso de uno solo o en combinación, llega a generar interacciones entre éstos resultando en un tratamiento ineficaz o bien propicia la generación de resistencia a antifúngicos, además de los efectos secundarios que estos pueden llegar a producir (Kim, 2008). El uso de nanopartículas recubiertas con extractos de plantas representa un método novedoso contra este tipo de infecciones que actualmente se caracterizan por generar resistencia. Sin embargo, su aplicación requiere de experimentación que avale su seguridad en humanos, utilizando protocolos aprobados

por la FDA, así como su uso controlado de manera que se evite lo que ocurre hoy en día con el uso indiscriminado de fármacos.

6.7.2 Efecto antifúngico

Los hongos son los responsables de la mayor parte de las pérdidas económicas y su control se ha convertido en un reto debido a que han adoptado estrategias para hacer frente a los fungicidas volviéndose resistentes por el uso excesivo y en ocasiones debido al manejo irresponsable de estos productos (Dean, 2012). Es por ello que se requiere el uso de otras alternativas que permitan mantener el control de las enfermedades producidas por éstos. Por lo cual se realizaron ensayos para probar el efecto que tiene la síntesis verde de nanopartículas sobre el crecimiento de diferentes hongos patógenos de plantas (figura 20).

Nuestros datos revelaron que las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de *A. mexicana* inhibieron el crecimiento en *A. alternata*, *R. solani*, *C. gloesporioides*, y *F. oxysporum*, dicha actividad es variable dependiendo de qué hongo se trate, de manera que no se tiene una inhibición homogénea que permita tener una medición cuantitativa (figura 20). Por ejemplo, en *F. oxysporum* se observó que, si hay inhibición, pero más bien retarda el crecimiento, dado que no se aprecia de manera directa una inhibición de crecimiento como se observa en *R. solani*, esto a pesar de que el tiempo de incubación fue de 7 días para ambos hongos (figura 20a, 20d), de manera que se podría tratar de un efecto fungistático por parte de las nanopartículas.

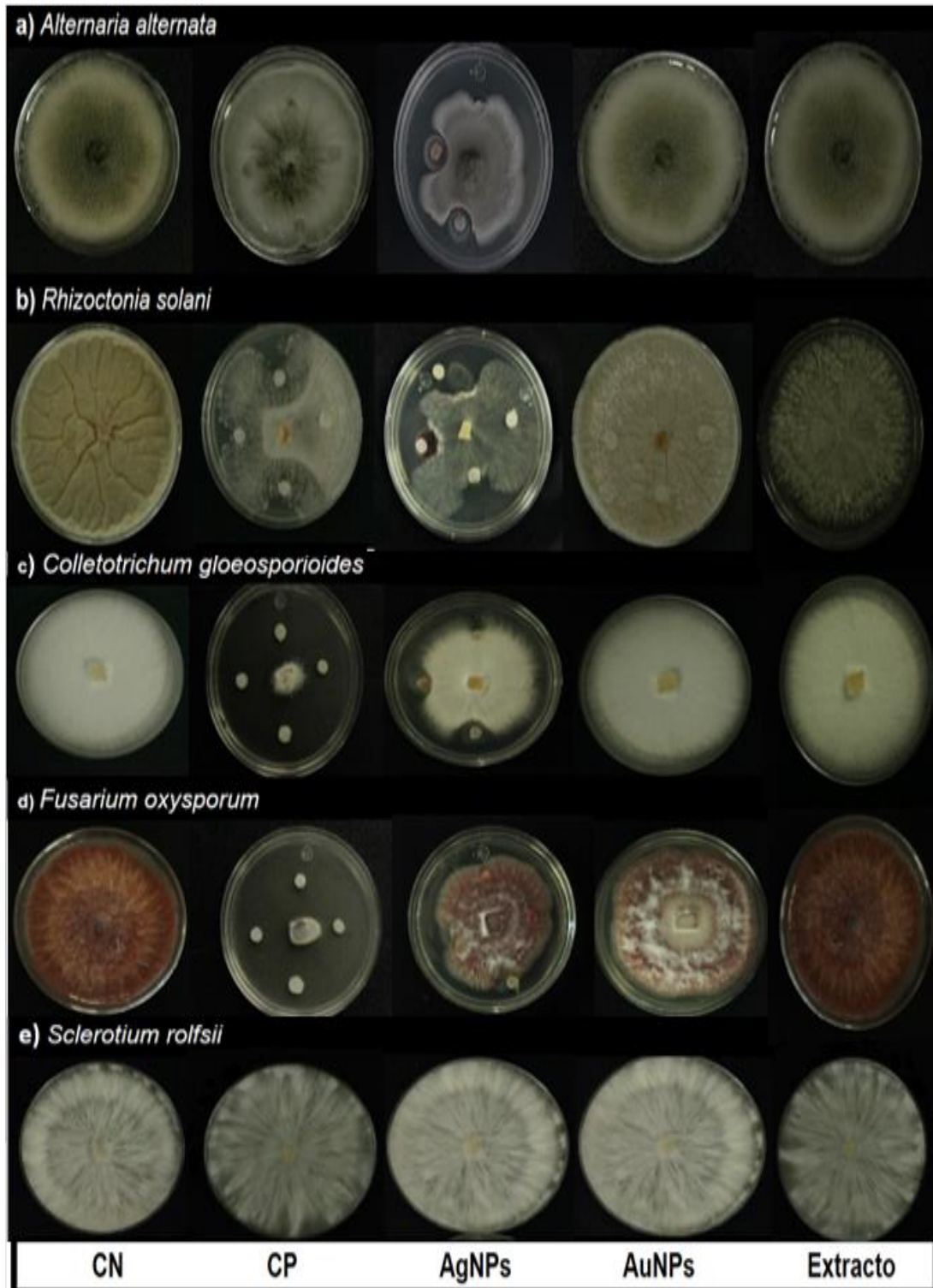


Figura 20. Actividad antifúngica de nanopartículas de plata y oro en hongos fitopatógenos. Se sembró un disco de 5 mm de micelio del hongo indicado, se incubó a temperatura de 28°C. De izquierda a derecha: control negativo agua (CN), control positivo (CP) fungicida comercial Benomilo 50(100µg/µL), tratamiento con nanopartículas de plata síntesis química y síntesis verde 100µL (AgNPs), tratamiento de nanopartículas de oro síntesis química y verde 100µL (AuNPs) y extracto de *A. mexicana* 100µL. Las placas se fotografiaron a los 2 días para *S. rolfsii* y *R. solani*, a los 7 días para *A. alternata*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*. El experimento se realizó por triplicado.

Nuestros resultados indican que las nanopartículas de oro sintetizadas de manera química y por síntesis verde no tuvieron un efecto alguno en la inhibición del crecimiento de estos hongos. Sin embargo, con las partículas de plata sí se observó un resultado positivo excepto en el caso de *S. rolsfii*, el cual creció sin ninguna restricción en el tratamiento tanto de nanopartículas sintetizadas vía química y de la biosíntesis, figura 20e, puesto que las placas fueron fotografiadas una vez que el hongo cubrió por completo toda la superficie de la caja en la condición control (sin adición). Un aspecto importante de considerar es que dependiendo del estadio del hongo la respuesta podría ser diferente. Es decir, ¿cuál pudiera ser el efecto de estas partículas en la germinación de esporas del hongo? dicho análisis es interesante de ser realizado. Además, se utilizó el fungicida comercial, Benomilo 50, como control positivo el cual tiene un mecanismo de acción por contacto directo con la pared celular de los hongos y es de amplio espectro razón por la cual se utiliza en el control de varias enfermedades de origen fúngico en plantas. Sin embargo, los resultados muestran que no es efectivo para *S. rolsfii* y *A. alternata*, en nuestras condiciones experimentales con un tiempo de incubación de 2 y 7 días respectivamente, ya que su eficacia se ve disminuida en *R. solani* siendo favorecida la inhibición del crecimiento en éste hongo por la biosíntesis de nanopartículas de plata (AgNPs), en donde las fotografías se tomaron 2 días después de su incubación por lo que si se compara con el control o con el tratamiento con fungicida comercial, resulta mejor la eficiencia por parte de las nanopartículas de plata, figura 20b, de manera que es en este hongo en donde se aprecia de mejor manera la inhibición del crecimiento por parte de la síntesis verde, aunado a ello la síntesis química de nanopartículas de plata también indica claramente un efecto positivo. Sin embargo, la síntesis verde de nanopartículas tiene la ventaja de que su obtención es menos costosa y se considera no tóxica para humanos y animales (Elia, 2014).

A pesar de ello, el fungicida comercial utilizado fue eficaz para la inhibición del crecimiento de *C. gloesporioides* y *F. oxysporum*, de igual manera la síntesis verde y química de nanopartículas de oro no muestran ningún efecto en la inhibición en comparación con a síntesis verde y química de nanopartículas de plata, las cuales si muestran un efecto positivo y después de 7 días de incubación, *C. gloesporioides* y *F. oxysporum*, no presentaron crecimiento alrededor de toda la caja indicando así una inhibición del crecimiento y el posible efecto fungicida de las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de *A. mexicana*, figura 20 e y 20 d.

Sin embargo, dado que la resistencia antimicrobiana va en aumento ya sea por el manejo inadecuado de productos para el control de hongos fitopatógenos o por la falta de regulación, es necesario la búsqueda de otras alternativas que permitan el manejo y control de las enfermedades en cultivos agrícolas. Se sabe que algunos componentes de *A. mexicana* podrían tener un efecto en la inhibición de la germinación de esporas y el crecimiento de las hifas, esto porque se aisló y purificó un componente propio de la planta, la dehidrocolamina, con éste compuesto se realizaron pruebas

para observar el efecto sobre el crecimiento de hongos y se comprobó que éste es el responsable de presentar la actividad antifúngica debido a que inhibe la germinación de esporas (Singh, 2009). De igual manera, se han reportado alcaloides con posible actividad antifúngica como la protopina y barberina (Singh, 2009; 2010). A pesar de ello no hay un efecto por parte del extracto de *A. mexicana* por sí solo, pero si existe un efecto en conjunto con las nanopartículas de plata por lo que pueden ser una alternativa para el control de estos hongos.

Las diferencias en la eficiencia de la actividad antifúngica por parte de la síntesis verde de nanopartículas puede ser atribuida a que existen hongos que tienen mejor tolerancia al estrés, lo cual está dado por la composición en la membrana y pared celular, que es la barrera primaria de protección frente al ambiente que tienen los hongos, si bien los componentes principales de la pared celular son la quitina y los glucanos, polímeros de glucosa unidos por enlaces $\beta(1-3)$ y $\beta(1-6)$, hay diferencias en la concentración de éstos en cada hongo dependiendo de la especie debido a que se ha observado que las enzimas encargadas de la síntesis de la pared celular difieren de un hongo a otro, dependiendo del ambiente en donde se encuentren, de manera que pueden modificar la estructura o composición de acuerdo al nivel de daño, ya sea un daño químico o un estímulo físico, detectado por receptores en la pared celular, puesto que es una estructura con alta plasticidad (Gow, 2017). Además, los hongos tienen la habilidad de inducir respuestas para revertir estos efectos negativos, por ejemplo; *S. cerevisiae* y *C. albicans* tienen enzimas que están implicadas en la reparación de la pared celular, conocidas como “Crh” y su función es la de unión en los enlaces entre la quitina y los glucanos, ya que se han observado niveles altos del ARNm de ésta enzima en respuesta al daño en la pared celular (Munro, 2013). Es por ello que a pesar de que existen estos mecanismos de reparación, hay hongos que son más sensibles al daño y otros que son más tolerantes debido a la conformación de su pared celular que son estructuras esenciales para mantener la viabilidad celular y morfológica, debido que para los hongos patógenos de humanos la pared celular debido la conformación estructural logra evadir la respuesta inmunitaria que de manera similar ocurre en hongos patógenos de plantas ya que al ser detectados por receptores en la células vegetales se inducen respuestas de defensa locales y sistémicas que en algunos casos resultan ser ineficientes (Gow, 2017).

Por ejemplo, *S. cerevisiae* tiene una organización de la pared celular distinta debido a que la quitina se concentra en la región más próxima a la membrana plasmática, mientras que *A. fumigatus* tiene melanina como un componente esencial y presenta mayor proporción de quitina en comparación con otros componentes. En cambio, hay hongos en los cuales la melanina no se encuentra presente, por ejemplo *Schizosaccharomyces pombe* (Munro, 2013; Free, 2013) y en este caso en particular es importante considerar que la melanina es un factor de virulencia como es el caso de *Cryptococcus neoformans* (Gow 2017). Aunado a ello es importante señalar que la estructura de la pared celular

es variable dependiendo de las condiciones ambientales y a la exposición a agentes que producen un daño en ella por lo cual se presentan estas variaciones estructurales y conformacionales (Gow, 2017).

Por lo anterior, las nanopartículas podrían estar provocando un daño físico y conduciendo a una modificación en la estructura de la pared celular, de tal manera que inhiban en función del daño y composición misma de la pared del hongo en cuestión, debido a que se ha reportado la inhibición del crecimiento y la deformación de las hifas en *Rhizoctonia* y *Sclerotium*, esto en respuesta a dosis crecientes de nanopartículas de plata (Min, 2009; Ouda, 2014). Además, se ha observado la disminución en la germinación de esporas en hongos fitopatógenos como *Colletotrichum coccodes* y *Monilinia sp*, patógeno del durazno, cuando se aplican tratamientos a concentraciones menores de nanopartículas de plata sintetizadas con leche de vaca que es otra alternativa para la síntesis de las mismas (Lee, 2013). Se especula que las nanopartículas de plata pueden causar un daño respiratorio en las células de igual manera provocan un daño físico, o bien se acumulan en la pared celular del hongo provocando la deformación de las hifas (Ouda, 2014). También se ha observado que las nanopartículas de plata biofabricadas con metabolitos de *Serratia sp*. reducen los signos de enfermedad en plantas de trigo infectadas por *Bipolaris sorokiniana*, por lo que su aplicación podría ir más allá de solamente ensayos in-vitro (Mishra, 2014).

6.8 Análisis termogavimétrico (TGA) de la síntesis verde de nanopartículas de plata y del extracto de *A. mexicana*

Para determinar cuantitativamente la masa de materia orgánica proveniente del extracto de *A. mexicana*, presente alrededor de las nanopartículas de plata; se llevó a cabo un análisis termogavimétrico (TGA); se seleccionaron las nanopartículas de plata, sobre las de oro, debido a que estas fueron las que presentaron un mejor efecto antimicrobiano. El análisis TGA determina la influencia que tiene la temperatura en la descomposición de una muestra, debido a que se registra la pérdida de peso de la muestra como consecuencia de que ésta se calienta a diferentes temperaturas conforme al tiempo (Manals-Cutiño, 2011).

Los resultados muestran que el extracto de *A. mexicana* se mantiene estable en el rango de temperatura de 50°C a 200°C, posteriormente hay una pendiente negativa en el rango de 250°C a 350°C indicando de manera más pronunciada la descomposición, figura 21. Este dato indica que, en el proceso de síntesis verde a 25°C y 80°C de nanopartículas de plata, pudieran estar presentes componentes importantes que le proporcionen las propiedades antimicrobianas anteriormente descritas, dado que muestra estabilidad hasta los 200°C, indicando la pérdida de algunos componentes, teniendo una pendiente de 0 a los 500°C, lo cual indica que el extracto se descompuso en su totalidad y el material restante corresponde a las cenizas. A pesar de esto,

desconocemos cuales son los compuestos que se unen o están presentes en la matriz del extracto que recubre a las nanopartículas.

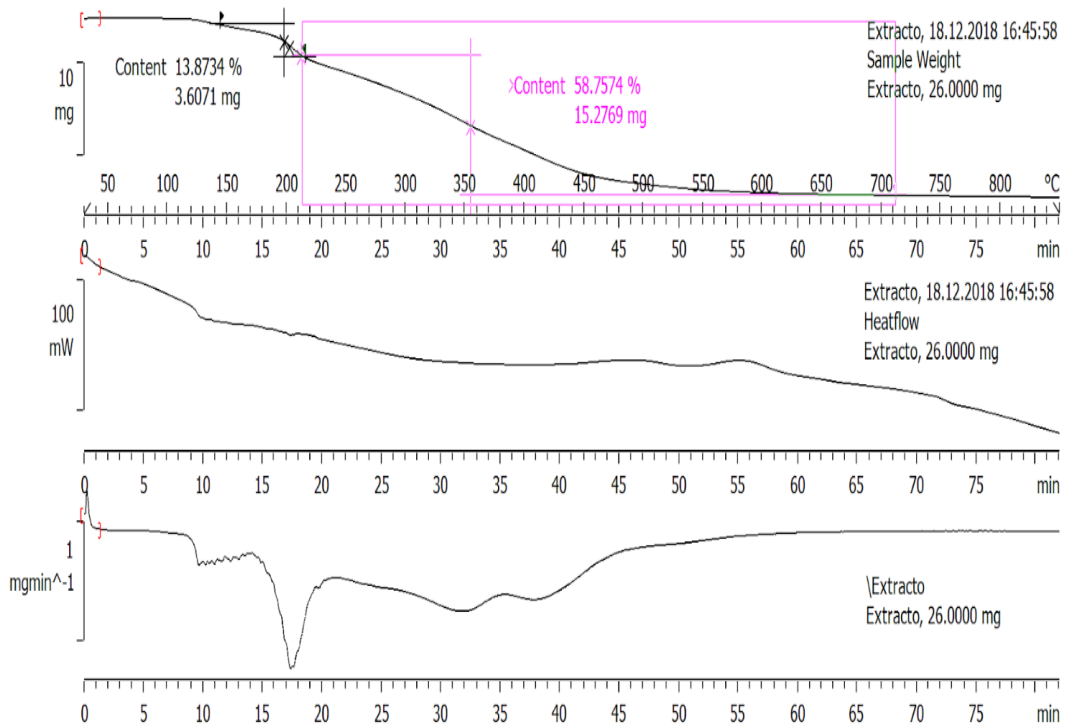


Figura 21. Análisis termogavimétrico del extracto de *A. mexicana*. Se sometieron 26mg de extracto seco y se monitoreo su descomposición en el rango de temperatura de 50°C a los 800°C durante aproximadamente 80 minutos

De la misma manera se llevó a cabo el análisis para la biosíntesis de nanopartículas de plata a 25°C y 80°C, cuyos resultados se muestran a continuación. En la biosíntesis de nanopartículas de plata a 25°C es posible apreciar que comienza una pendiente negativa en el rango de 200°C cuyo resultado coincide con la pendiente del extracto de *A. mexicana* por lo que las nanopartículas de plata pueden mantener la matriz de extracto y ésta comienza a descomponerse y a perder sus propiedades pasando los 200°C. Sin embargo, la biosíntesis aquí realizada se llevó a cabo a temperaturas menores a 100°C. Posteriormente se vuelve a mostrar nuevamente una pendiente negativa la cual comienza a los 450°C, esto puede atribuirse a que es el punto en el que el extracto se descompone por completo dado que en los resultados de TGA para el extracto, éste decae a los 500°C y el contenido sobrante da lugar a la plata, la cual nunca se descompone totalmente, solamente se funde.

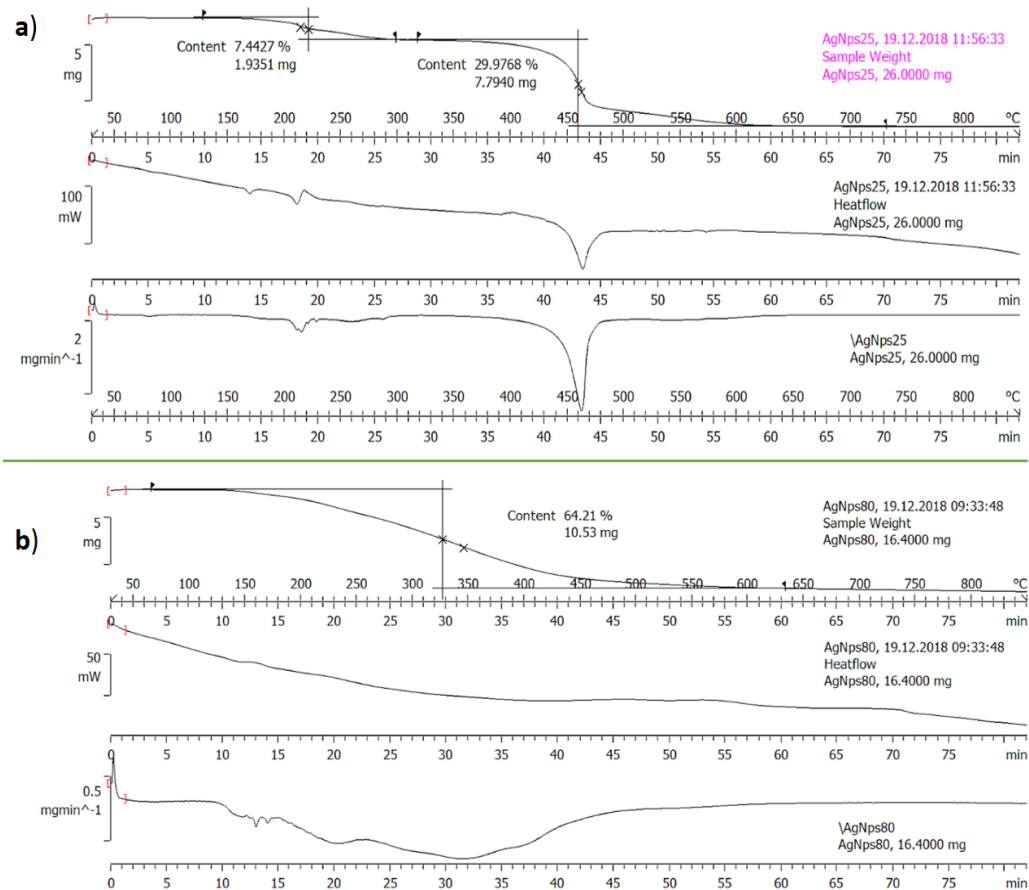


Figura 22. Análisis termogavimétrico de nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de *A. mexicana*. Síntesis verde de nanopartículas de plata a 25°C (a) y 80°C(b). Se monitorea la descomposición de la síntesis verde de nanopartículas en el rango de temperatura de 50°C a 800°C durante 80 minutos.

A diferencia de la biosíntesis a 25°C de nanopartículas de plata, los resultados de TGA para la biosíntesis a 80°C indican solamente una pendiente la cual inicia alrededor de los 200°C y decae completamente a los 500 °C de manera que lo sobrante da lugar a la plata misma, indicando una pérdida de componentes propios del extracto convirtiéndolos en cenizas y materia volátil. Debido a estos resultados se puede concluir que el extracto de *A. mexicana* le proporciona cierta estabilidad a las nanopartículas de plata dado que su descomposición coincide con los picos observados en el análisis de TGA del extracto, esto por la presencia de una pendiente negativa en la biosíntesis de nanopartículas de plata lo cual indica la disociación y conversión en cenizas de los componentes orgánicos propios del extracto, con un porcentaje de 83.28%, que recubren a las nanopartículas (Khalil, 2014)..

Con el análisis termogavimétrico, se obtuvieron los valores para conocer cuánto extracto se consumió y cuánta plata se obtiene de la síntesis verde, tabla 2. Se puede observar que para la síntesis verde a 25°C se obtiene un porcentaje menor de extracto en comparación con la síntesis

verde a 80°C la cual presenta mayor contenido de extracto, a pesar de que la síntesis verde de nanopartículas de plata se realizó a volúmenes 1:1.

Tabla 2. Valores de materia orgánica y plata obtenida en la síntesis verde de nanopartículas de plata

Extracto	Masa total	Materia volátil	Ceniza	
<i>A. mexicana</i>	25.49 mg	77.05 %	22.95%	
Síntesis verde	Masa total	Materia volátil	Extracto	Plata
25°C AgNPs	26.27 mg	9.77 mg	12.52 mg 47.65%	13.75 mg 52.34%
80°C AgNPs	16.75 mg	10.8 mg	13.95 mg 83.28%	2.79 mg 16.71%

Sin embargo, a pesar de que los resultados de la tabla 2 indican que, en efecto, el extracto isopropanólico de *A. mexicana* está acoplado a las nanopartículas aún se desconoce cuánto extracto y cuántas nanopartículas se tienen en la solución acuosa de las mismas que fue aplicada a los ensayos en microorganismos, dado que no se sabe cuántas nanopartículas se pueden formar en el proceso de síntesis debido a que se pierden componentes pertenecientes al extracto por lo cual es necesario la estandarización de un método que permita tener el conocimiento de cuántas nanopartículas se forman y de esta manera poder realizar una relación de qué cantidad de éstas está presente en los ensayos en bacterias y si es extrapolable para la comparación en cuanto al efecto de los antibióticos.

6.9 Discusión general

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que las nanopartículas de plata sintetizadas con el extracto isopropanólico de *A. mexicana*, tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias sensibles y resistentes a antibióticos (figura 18). De igual manera se observa un efecto en el crecimiento de hongos fitopatógenos (figura 20) y levaduras de interés médico como lo es *C. albicans* (figura 19) de tal manera que el efecto con las nanopartículas obtenidas mediante síntesis química se observan valores de inhibición por debajo de la síntesis verde. Aunado a ello, es interesante el efecto que presentan las nanopartículas producidas vía síntesis verde en levaduras patógenas de humanos, esto debido a que actualmente los tratamientos para las infecciones que provocan resultan ineficientes y es importante señalar que *C. albicans* es de los microorganismos que tiene mayor incidencia en las infecciones nosocomiales por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para su control (Höfs, 2016).

A pesar de que se utilizó el mismo extracto para la síntesis de nanopartículas de oro, éstas no presentaron efecto inhibitorio en los microorganismos aquí utilizados por lo que tal vez no tengan el tamaño ni la forma adecuada para provocar dicho efecto, ya que se tienen reportes de que las nanopartículas de oro producidas vía síntesis verde pueden presentar actividad antimicrobiana dependiendo de la forma y tamaño que tengan (Elia, 2014; Patil, 2017).

En estudios previos ya se había reportado el efecto antimicrobiano de los extractos metanólicos y etanólicos de *A. mexicana* (Sahu, 2012). Sin embargo, no se había realizado una cuantificación de los componentes fenólicos por lo que nuestros datos indican resultados preliminares para la cuantificación de taninos, fenoles totales y la actividad antioxidante y nuestros datos indican valores altos de dichos componentes comparados con el estudio realizado por Tovar (Tovar, 2013) en donde cuantificaron taninos y compuestos fenólicos de distintas plantas. A pesar de ello, es necesaria una caracterización con métodos más sensibles, por ejemplo, mediante HPLC o RMN, esto debido a que tiene propiedades antimicrobianas y a que se han caracterizado compuestos con potencial antimicrobiano que pueden ser utilizados en el control de hongos patógenos de plantas o bacterias de interés médico, incluso aquellas resistentes a los antibióticos (Bhattacharjee, 2010; Brahmachari, 2013, Sahu, 2012).

7.- Conclusiones

- La síntesis verde de nanopartículas de plata con el extracto de *A. mexicana* puede ser una futura alternativa para el control de microorganismos patógenos en plantas y humanos.
- El extracto de *A. mexicana*, obtenido con isopropanol, permite una cuantificación mayor de flavonoides, taninos, fenoles totales, así como la capacidad antioxidante, en comparación con lo previamente reportado.
- Las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de *A. mexicana*, obtenido con isopropanol, inhiben el crecimiento de bacterias, no resistentes y resistentes a antibióticos, patógenas de humanos, así como en la levadura *C. albicans*.
- El extracto de *A. mexicana*, obtenido con isopropanol, no tiene efecto alguno en el crecimiento de los hongos utilizados en este estudio.
- El extracto de *A. mexicana*, obtenido con isopropanol, inhibe el crecimiento de bacterias sensibles y resistentes a antibióticos, así como en la levadura *C. albicans*.
- La síntesis verde de nanopartículas de plata con extracto de *A. mexicana* inhibe el crecimiento, *in vitro*, de *R. solani*, *A. alternata*, *F. oxysporum* y *C. gloesporioides*.
- La síntesis verde de nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de *A. mexicana*, obtenido con isopropanol, no tiene efecto alguno en el crecimiento de los microorganismos probados en este estudio.

8.- Perspectivas

- Caracterizar el extracto de *A. mexicana* mediante otros métodos analíticos más sensibles como el HPLC y RMN.
- Extraer los metabolitos de *A. mexicana* utilizando solventes distintos al isopropanol y cuantificar taninos, flavonoides, fenoles totales y probar su actividad antimicrobiana.
- Estandarizar un método que permita la identificación de cuántas nanopartículas se obtienen en el proceso de síntesis verde.
- Realizar ensayos con la síntesis verde de nanopartículas de plata, sintetizadas con extracto de *A. mexicana*, que permitan determinar el efecto que tienen en la germinación de esporas en hongos.
- Producción de nanopartículas utilizando una mezcla de extractos de *A. mexicana*, obtenidos con solventes diferentes al isopropanol.
- Desarrollo de un sanitizante acoplado la síntesis verde de nanopartículas de plata con extracto de *A. mexicana*.

9.- Referencias

- Ahamed, M. K. (2011). Green synthesis, characterization and evaluation of biocompatibility of silver nanoparticles. *Systems and Nanostructures*, 43(6), 1266-1271.
- Ali, M. K. (2015). Inhibition of *Phytophthora parasitica* and *P. capsici* by silver nanoparticles synthesized using aqueous extract of *Artemisia absinthium*. *Phytopathology*, 105(9), 1183-1190.
- Alsammarraie, F. K. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 398-405.
- Arias-Flores, R. R.-Q.-V.-M. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54(1), 20-2.
- Arokiyaraj, S. S. (2013). Enhanced antibacterial activity of iron oxide magnetic nanoparticles treated with *Argemone mexicana* L. leaf extract: an in vitro study. *Materials Research Bulletin*, 48(9), 3323-3327.
- Bhattacharjee, I. C. (2010). Isolation and identification of antibacterial components in seed extracts of *Argemone mexicana* L.(Papaveraceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 547-551.
- Blair, J. M. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13(1), 42.
- Brahmachari, G. G. (2013). *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(3), 559-567.
- Buehrle, D. J. (2017). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and microbiologic treatment failure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(1), 01243-16.
- Dadar, M., (2018). *Candida albicans*-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control—An update. *Microbial pathogenesis*, 117, 128-138.
- Das, B. D. (2017). Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(6), 862-876.
- De Bentzmann, S.(2011). The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environmental microbiology*, 13(7), 1655-1665.
- Dean, R. V.-K. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.
- Doehlemann G, Ö. B. (2017). Plant pathogenic fungi. *Microbiol spectrum*, 5(1)-0023.
- Elia, P. Z. (2014). Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *International journal of nanomedicine*, 9, 4007.
- Espinosa Ruiz, R. H. (2012). Efecto sinérgico de taninos y flavonoides presentes en *Terminalia catappa* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii*. *Fitosanidad*, 16(1).
- Estepa, V. R.-B.-G. (2017). Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital español. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 141-147.

- Estevinho, L. P. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3774-3779.
- Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. In *Advances in genetics*, (Vol. 81, pp. 33-82).
- Ganaie, S. U. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using an otherwise worthless weed *Mimosa pudica*: Feasibility and process development toward shape/size control. *Particulate Science and Technology*, 3(6), 638-644.
- García-Hernández, A.M.-V.-T. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista española de quimioterapia*, 24(2).
- García-Tello, A. G. (2014). Betalactamasas de espectro extendido en las infecciones del tracto urinario causadas por enterobacterias: aproximación a su conocimiento y pautas de actuación. *Actas urológicas españolas*, 38(10), 678-684.
- Ghafourian, S. S. (2014). Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*, 17(1), 11-22.
- Gow, (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology spectrum*.
- Hahn, F. E. (1969). Mechanism of action of gentamicin. *The Journal of infectious diseases*, 119(4/5), 364-369.
- Höfs, S. M. (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*, 54(3), 149-169.
- Husaini, A. M., (2018). Host–Pathogen Interaction in *Fusarium oxysporum* Infections: Where Do We Stand?. *Molecular plant-microbe interactions*, 31(9), 889-898.
- Hussain, I. S. (2016). Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology letters*, 38(4), 545-560.
- Hussein, A. M. (2017). Unconventional Oilseeds and oil sources. Academic Press.
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650.
- Jain, S. &. (2017). Medicinal plant leaf extract and pure flavonoid mediated green synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property. *Scientific reports*, 7(1), 15867.
- Jiang, X. C. (2011). Role of temperature in the growth of silver nanoparticles through a synergetic reduction approach. *Nanoscale Res Lett*, 6(1), 32.
- Jo, Y. K. (2009). Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease*, 93(10), 1037-1043.
- Kanetis, L. T. (2016). Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with Black Scurf in Cyprus. *plant disease*, 100(8), 1591-1598.
- Karp, G. (2009). Cell and molecular biology: concepts and experiments. John Wiley & Sons.
- Khalil, M. M.-B. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(6), 1131-1139.
- Khalil, M. M.-M. (2012). Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract: 1st nano updates. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(4), 431-437.

- Kharissova, O. V. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 31(4), 240-248.
- Kim, K. J. (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *Microbiol Biotechnol*, 18(8), 1482-1484.
- Kumar, P. V. (2014). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti bacterial activity. *Industrial Crops and Products*, 52, 562-566.
- Kumar, S. S. (2018). Cellular imaging and bactericidal mechanism of green-synthesized silver nanoparticles against human pathogenic bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178, 259-269.
- Kumari, C. K. (2013). In vitro antimicrobial activity of the leaf extracts of *Argemone mexicana* against selected pathogenic microorganisms. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 536-541.
- Lee, K. J. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using cow milk and their antifungal activity against phytopathogens. *Materials Letters*, 105, 128-131.
- Li, W. R. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(4), 1115-1122.
- Li, W. R. (2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals*, 24(1), 135-141.
- Logeswari, P. S. (2013). Ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from commercially available plant powders and their antibacterial properties. *Scientia Iranica*, 20(3), 1049-1054.
- Maillard, A. P. (2018). Interaction of green silver nanoparticles with model membranes: possible role in the antibacterial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 320-326.
- Manals-Cutiño, E. P.-M.-O. (2011). Análisis termogavimétrico y térmico diferencial de diferentes biomásas vegetales. *Tecnología Química*, 31(2), 180-190.
- Min, J. S. (2009). Effects of colloidal silver nanoparticles on sclerotium-forming phytopathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal*, 25(4), 376-380.
- Mirzajani, F. G. (2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Research in microbiology*, 162(5), 542-549.
- Mishra, S. S. (2014). Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. *PLoS One*, 9(5), 97881.
- Monge, K. M. (2013). Carbapenemicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista Médica de Costa Rica Y Centroamerica*, 70(608), 599-605.
- More, N. V. (2016). Antifungal and Anticancer Potential of *Argemone mexicana* L. *Medicines*, 3(4), 28.
- Mostafa, A. (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi journal of biological sciences*, 25(2), 361-366.
- Mubarakali, D. T. (2011). Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 360-365.
- Munro, C. A. (2013). Chitin and glucan, the yin and yang of the fungal cell wall, implications for antifungal drug discovery and therapy. *Advances in applied microbiology*, (Vol. 83, pp. 145-172).

- Nilesh V. More, K. R. (2017). Berberine from *Argemone mexicana* L exhibits a broad spectrum. *Acta Biochimica Polonica*, 653–660.
- Ochoa, S. A. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 138-150.
- Ouda, S. M. (2014). Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Research Journal of Microbiology*, 9(1), 34-42.
- Pal, S. T. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 73(6), 1712-1720.
- Panáček, A. K. (2009). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, 30(31), 6333-6340.
- Patil, M. P. (2017). Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(1), 79-92.
- Patzi-Vargas, S. Z.-M.-C.-A.-G. (2015). Diarrheagenic *Escherichia coli* carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(3), e0003510.
- Price, C. L. (2015). Azole fungicides—understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest management science*, 71(8), 1054-1058.
- Rajeshkumar, S. (2019). Antifungal Impact of Nanoparticles Against Different Plant Pathogenic Fungi. In *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*, (pp. 197-217). .
- Ramón, H. J. (2003). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 21(2), 77-82.
- Rios, J. L. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 80-84.
- Sahu, M. C. (2012). Antibacterial activity of *Argemone mexicana* L. against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S800-S807.
- Salomoni, R. L. (2017). Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnology, science and applications*, 10, 115.
- Senthil, B. D. (2017). Non-cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles and its antibacterial activity. *journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 177, 1-7.
- Shaikh, S. F. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi journal of biological sciences*, 22(1), 90-101.
- Siddiqui, I. A. (2002). Evaluation of *Argemone mexicana* for Control of Root-Infecting Fungi in Tomato. *Journal of Phytopathology*, 321-329.

- Siddiqui, M. N. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles and study of their antimicrobial properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(2), 423-433.
- Singh, A. J. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles using *Argemone mexicana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Dig J Nanomater Bios*, 5(2), 483-489.
- Singh, A. S. (2009). Fungal spore germination inhibition by alkaloids dehydrocorydalmine and oxyberberine. *Journal of plant protection research*, 49(3), 287-289.
- Singh, A. S. (2010). Jatrorrhizine and columbamine alkaloids isolated from *Argemone mexicana* are inhibitory to spore germination of some plant pathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(15), 1450-1453.
- Sujitha, M. V. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles using Citrus fruits (*Citrus limon*, *Citrus reticulata* and *Citrus sinensis*) aqueous extract and its characterization. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102, 15-23.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6), S3-S10.
- Tong, S. Y. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology*, 28(3), 603-661.
- Tovar, J. (18 de Enero de 2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Colombia, colombia: Facultad de Tecnología-Universidad Tecnológica de Pereira.
- Varun, S. S. (2015). Green synthesis of gold nanoparticles using *Argemone mexicana* L. leaf extract and its characterization. *Int J Pharm Sci Rev*, 32, 42-44.
- Wibawa, T. (2016). The role of virulence factors in *Candida albicans* pathogenicity. *J Med Sci*, 48(1), 58-68.