



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
APLICADA**

**“ESTUDIO QUÍMICO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE *Bacopa procumbens* EN LA
BIOSÍNTESIS DE NANOESTRUCTURAS METÁLICAS Y SU
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

P R E S E N T A

L.C.A. ELIAS EMILIO HERNÁNDEZ BETETA

COMITÉ TUTORAL

Dr. VALENTÍN LÓPEZ GAYOU IPN (CIBA)
Dr. ABDU ORDUÑA DÍAZ IPN (CIBA)
Dr. ALEJANDO ZAMILPA ALVAREZ IMSS (CIBIS)
M.C. ADA MARIA RÍOS CORTÉS IPN (CIBA)
M.C. ORLANDO ZACA MORAN IPN (CIBA)



Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala. Enero 2017



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla siendo las 12 horas del día 12 del mes de diciembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-IPN para examinar la tesis titulada:

Estudio químico biodirigido del extracto hidroalcoholico de Bacopa procumbens en la biosíntesis de nanoestructuras metálicas y su actividad antimicrobiana

Presentada por el alumno:

Hernández

Beteta

Eliás Emilio

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

A	1	5	0	0	3	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Biotecnología Aplicada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Valentín López Gayou

Dr. Abdu Orduña Díaz

M. en C. Ada Maria Ríos Cortés

Dr. Alejandro Zamilpa Alvares

M. en C. Orlando Zaca Moran

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
Dirección



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tlaxcala de Xicohtécatl el día 12 del mes de Diciembre del año 2016, el que suscribe Elías Emilio Hernández Beteta alumno del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro A150035, adscrito a CIBA-Tlaxcala, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dr. Valentin López Gayou y Dr. Abdu Orduña Díaz cede los derechos del trabajo intitulado **Estudio químico biodirigido del extracto hidroalcoholico de Bacopa procumbens en la biosíntesis de nanoestructuras metálicas y su actividad antimicrobiana** , al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección valgayou@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Lic. Elías Emilio Hernández Beteta

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi familia por haberme apoyado en estos dos años y porque han sido siempre mi motivación y mi fuerza para seguir superándome cada día más.

Agradezco profundamente la atención y disponibilidad del Doctor Alejandro Zamilpa Álvarez y del Doctor Manases González Cortazar, así como todas las enseñanzas otorgadas durante mi estancia en el CIBIS-IMSS, la cual fue como mi segunda casa.

Gracias al Centro de Investigación Biomédica del Sur-IMSS por permitirme realizar la estancia de investigación en el periodo febrero-Noviembre del 2016, a los Doctores; Maribel, Enrique, Jaime, Víctor y a los técnicos Arturo y Jonathan, por su apoyo incondicional.

También agradezco a la Doctora Blanca Eda Domínguez M, del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la UAEM, por su gran contribución en este trabajo.

A mis directores de tesis, Doctor Valentín López Gayou, quien me abrió las puertas para realizar el posgrado bajo su dirección, también por los jalones de oreja que me sirvieron para mejorar en muchos aspectos. Al Doctor Abdu Orduña Díaz, gracias por el apoyo, los consejos y su forma tan peculiar de motivar a las personas, sobre todo a sus estudiantes.

A mi comité tutorial, quienes siempre me hicieron las observaciones precisas para mejorar este proyecto. A la Doctora Patricia Fitz de la UAGro, por su valioso apoyo.

Agradezco el apoyo financiero del CONACYT por el otorgamiento de la beca de manutención y movilidad nacional, al CIBA, Tlaxcala por permitirme realizar el posgrado y culminar esta etapa de mi vida.

Por último y no menos importante, agradezco a todas las personas que estuvieron a mi lado en estos dos años, amigos y compañeros, que no mencionaré pero saben que son parte fundamental en mi vida.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a mis padres

Adelina Beteta Beteta y Elías I. Hernández Hernández

Siempre he comprendido que en cada paso que doy, ellos están ahí, para levantarme, para empujarme, para ayudarme a caminar más rápido o simplemente para verme triunfar. Nunca apartan la mirada, a pesar de que somos 5, y siempre nos motivan a seguir y nos apoyan en nuestras metas. Es un triunfo de ustedes padres, gracias por todo.

RESUMEN

El presente trabajo, se enfocó en la búsqueda y aislamiento de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de *Bacopa procumbens*, que son responsables de sintetizar nanopartículas de oro y que presentan actividad antimicrobiana. El método de Bioautografía, permitió la rápida identificación de los compuestos semipuros con actividad antimicrobiana. Mediante técnicas cromatográficas se aislaron siete compuestos, de los cuales, tres no están reportados en la literatura química, mismos que denominamos ProcumGastrodina A, B y C, respectivamente, los cuales son derivados de la Gastrodina. Otro compuesto es la Arbutina, así también, obtuvimos dos saponinas triterpénicas y uno más del tipo cumarina. Todos estos compuestos presentaron la capacidad de biosintetizar nanopartículas de oro. Las nanopartículas obtenidas a partir de estos compuestos presentaron tamaños promedio de 5.3 nm, con formas cuasi-esféricas. Los análisis espectroscópicos evidenciaron la adición de grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas correspondientes a dichos compuestos. Las pruebas antibacterianas mostraron que las nanopartículas de oro biosintetizadas con los compuestos potencian el efecto inhibitorio de las bacterias, con respecto al producto natural aislado, como lo fue para *Staphylococcus haemolyticus* 731 A.C. MRS, *Staphylococcus haemolyticus* 562 A.C. MRS y *Staphylococcus aureus* ATCC 0198 obteniendo CMI's de 12.5 µg/ml para cada uno, empleando las NPsAu+ProcumGastrodina A, mientras que para el compuesto ProcumGastrodina A las CMI's fue de 50 µg/ml, lo cual es un punto clave en este trabajo, ya que se demuestra el potencial médico que este tipo de estructuras pueden tener.

ABSTRACT

The present work focused on the search and isolation of the compounds present in the hydroalcoholic extract of *Bacopa procumbens*, which are responsible for synthesis of gold nanoparticles and antimicrobial activity. The Bioautography method permitted a quick and easy localization of antimicrobial activity in the complex mixture that represents a hydroalcoholic extract. By means of chromatographic techniques seven compounds were isolated, of which three are not reported in the chemical literature, which we call ProcumGastrodina A, B and C, respectively, which are derivatives of Gastrodine. Another compound is Arbutin, so we also obtained two triterpenic saponins and one more coumarin family. The nanoparticles obtained from these compounds presented average sizes of 5.3 nm, with quasi-spherical shapes, mainly. Spectroscopic analyzes evidenced the addition of functional groups on the surface of the nanoparticles. The antibacterial tests showed that the nanoparticles potentiate the inhibitory effect of the bacterial with respect to natural product, as was for *Staphylococcus haemolyticus* 731 A.C. MRS, *Staphylococcus haemolyticus* 562 A.C. MRS and *Staphylococcus aureus* ATCC 0198, obtaining MICs of 12.5 µg/ml for these bacteria, using NPsAu + ProcumGastrodina A, whereas for ProcumGastrodina A obtaining MICs of 50 µg/ml, which is a key point in this work, since it demonstrates the medical potential of these structures.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	2
2.1 Nanotecnología y Nanomateriales.....	2
2.2 Biosíntesis o Síntesis Verde.....	3
2.3 Métodos verdes para la síntesis de nanopartículas metálicas.....	4
2.3.1 Métodos químicos.....	4
2.3.2 Métodos basados en microorganismos.....	4
2.3.3 Métodos basados en extractos de plantas.....	5
2.4 Biosíntesis de nanopartículas a partir de plantas.....	5
2.4.1 Biosíntesis intracelular y extracelular.....	6
2.4.2 Compuestos que intervienen en el proceso de síntesis.....	8
2.5 Síntesis de nanopartículas metálicas empleando el género <i>Bacopa</i>	10
2.6 <i>Bacopa procumbens</i>	11
2.6.1 Clasificación Taxonomica.....	11
2.6.2 Descripción morfológica.....	11
2.6.3 Distribución y Usos.....	12
3 JUSTIFICACIÓN.....	12
4 HIPÓTESIS.....	13
5 OBJETIVO GENERAL.....	13
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
7.1 ETAPA I Recolección de la planta y obtención del extracto hidroalcohólico liofilizado (HAL).....	15
7.1.1 Recolección.....	15

7.1.2 Obtención del extracto Hidroalcohólico.....	15
7.2 ETAPA II Síntesis de nanopartículas de oro y evaluación antimicrobiana	16
7.2.1 Bioautografía y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	17
7.3 ETAPA III Purificación y elucidación de los constituyentes activos.....	18
7.3.1 Extracción liquido-liquido del extracto HAL.....	18
7.3.2 Fraccionamiento químico y purificación de los compuestos activos de la (FACOEt)	19
7.4 ETAPA IV Caracterización óptica y espectroscópica de las nanopartículas de oro y su actividad antimicrobiana.....	20
7.4.1 Espectroscopia UV-Visible	20
7.4.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	21
7.4.3 Espectroscopía de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	22
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
8.1 ETAPA I Recolección de la planta y obtención del extracto hidroalcohólico liofilizado (HAL)	23
8.2 ETAPA II Síntesis de nanopartículas de oro y evaluación antimicrobiana	24
8.3 ETAPA III Purificación y elucidación de los constituyentes activos.....	26
8.3.1 Fraccionamiento químico y purificación de los compuestos activos de la (FACOEt)	28
8.3.2 Síntesis de NPsAu empleando reuniones de la Columna 1	30
8.3.3 Actividad antimicrobiana por Bioautografía y CMI	33
8.3.4 Fraccionamiento químico y purificación de los compuestos activos de la (BpC1R16 y BpC1R17).....	35
8.3.5 Identificación química de los compuestos aislados y su actividad antimicrobiana ..	38
8.3.6 Importancia biológica de los productos naturales aislados	54
8.4 ETAPA IV Caracterización óptica y espectroscópica de las nanopartículas de oro y su actividad antimicrobiana.....	59
9 CONCLUSIONES	65
10 BIBLIOGRAFÍA	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Métodos empleados en la síntesis de nanopartículas	4
Figura 2 Diagrama esquemático del mecanismo detrás de la biosíntesis de nanopartículas metálicas a partir de plantas.	6
Figura 3 Proceso de la síntesis biológica de nanopartículas Au y Ag a) Extracto de planta b) biomasa de la planta (Gan y Yau, 2012).	7
Figura 4 Principales constituyentes fitoquímicos que reaccionan con los iones metálicos.	8
Figura 5 Recolección de la planta <i>Bacopa procumbens</i> , estado de Hidalgo	15
Figura 6 Tamizado y extracción hidroalcohólica de la planta <i>Bacopa procumbens</i>	16
Figura 7 Ficha de Herbario de la especie <i>Bacopa procumbens</i> (Mill) Greenm	23
Figura 8 Espectro de UV-Visible de NPsAu empleando diferentes relaciones Extracto:Metal	24
Figura 9 Espectros FT-IR de nanopartículas de oro y Extracto HAL	25
Figura 10 CCF de la 1 F. acuosa y 2 F. orgánica (Revelador Komarowsky)	27
Figura 11. Espectro de UV-Visible de NPsAu empleando diferentes concentraciones de la FACOEt.....	27
Figura 12 Perfil cromatográfico de la FACOEt a 280 nm	29
Figura 13 Síntesis de NPsAu empleando las reuniones de la columna 1	31
Figura 14 Espectro de UV-Visible de NPsAu de BpEHC1F14-17	31
Figura 15 Distribución del diámetro de partícula sintetizada a partir de BpEHC1R16	32
Figura 16 CCF de fase reversa de las reuniones BpC1R16 y BpC1R17	35
Figura 17 CCF en fase reversa de seis compuestos aislados de la BpEHC2Fn	37
Figura 18 Perfiles cromatográficos a 280 nm de la FACOEt y compuestos aislados	37
Figura 19 Estructura química de la Arbutina	38
Figura 20 Espectro FT-IR de la Arbutina	39
Figura 21 Espectro de absorción en el UV-Visible de la Arbutina	39
Figura 22 Espectro de absorción en el UV-Visible de la Arbutina	40
Figura 23 Espectro FT-IR de BpEHC2F17	40
Figura 24 Expansión de la región de carbono y protón anomérico del espectro de RMN ¹³ C y ¹ H (600 MHz, CDCl ₃ , acetilado)	41
Figura 25 Correlaciones ¹ H- ¹ H COSY de la ciclohexosa	41
Figura 26 Expansión en la región δ 3.8 a 5.4 del experimento TOCSY	42
Figura 27 Correlaciones 1H-1H COSY de los anillos aromáticos A y B	44
Figura 28 Expansión en la región δ 6.75 a 7.4 del experimento TOCSY	44
Figura 29 Correlaciones 1H-1H COSY del tetragalato	45
Figura 30 Orientación ecuatorial de los metinos del C4" y C5"	45
Figura 31 Interacción NOESY de H5" con H-4" y H-7b"	46
Figura 32 Conexión de la glucosa con el esqueleto gastodigenina generando una unidad de gastrodina	46
Figura 33 Correlación en el espectro HMBC de H-1 con C-1	46
Figura 34 Correlación en el espectro HMBC de C-1" con H-7a", H-7b" y H-3"	47
Figura 35 Correlación en el espectro HMBC de C-1" con H-3" y H-6"	48

Figura 36 Espectro de absorción en el UV-Visible de BpEHC2F23	50
Figura 37 Espectro FT-IR de BpEHC2F23	50
Figura 38 Estructura del <i>trans</i> -Ácido cumárico y <i>cis</i> -Ácido cumárico	51
Figura 39 Estructura química de los compuestos ProcumGastrodina B (<i>trans</i>) y ProcumGastrodina C (<i>cis</i>)	51
Figura 40 Espectro FT-IR de BpEHC2F37	52
Figura 41 Expansión de la región de protón anomérico del espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃).....	52
Figura 42 Gráficas de los porcentajes de inhibición de 5 bacterias Gram + y 5 Gram -	54
Figura 43 Espectro UV-Visible de las NPsAu con los compuestos aislados.....	59
Figura 44 Espectro FT-IR de las NPsAu con los compuestos aislados	60
Figura 45 Distribución del diámetro de partícula sintetizada a partir de los compuestos aislados.....	61
Figura 46 Determinación de la CMI mediante el método de dilución en placa	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Diseño experimental de las pruebas de síntesis	16
Tabla 2 Principales grupos funcionales expuestos en la superficie de las nanopartículas	25
Tabla 3 Bioautografía en CCF en fase normal del Extracto HAL.....	26
Tabla 4 Bioautografía en CCF de la FAcuosa y FACOEt	28
Tabla 5 Proceso de separación química de la FACOEt	29
Tabla 6 Fracciones colectadas y CCF de Reuniones	30
Tabla 7 Bioautografía de las reuniones obtenidas en BpEHC1.....	33
Tabla 8 Concentración mínima inhibitoria de las reuniones activas	35
Tabla 9 Proceso de separación química de la mezcla de BpC1R16 y BpC1R17	36
Tabla 10 Valores de desplazamiento químico de ¹ H y ¹³ C (δ) del compuesto 1	38
Tabla 11 Valores de desplazamiento químico de ¹ H y ¹³ C de BpEHC1F17 acetilado	49
Tabla 12 Porcentajes de inhibición de crecimiento de las bacterias Gram + y Gram -	53
Tabla 13 CCF de los compuestos aislados, revalado con Oro y 4-Hidroxibenzaldehído	59
Tabla 14 Concentración Mínima Inhibitoria de la ProcumGastrodina A y NPsAu	64
Tabla 15 Bacterias empleadas para la determinación de la CMI.....	64

1 INTRODUCCIÓN

La Nanobiotecnología representa la intersección entre la Nanotecnología y la Biotecnología, el cual es un campo emergente dedicado a la creación, mejoramiento y uso de estructuras nanométricas para el avance de la Biotecnología (Sayeed *et al.*, 2013). Una importante área de investigación para este campo es la síntesis de nanopartículas con diferentes composiciones químicas, tamaños y formas. Los métodos de síntesis de estos materiales suelen agruparse en dos aproximaciones, “de arriba hacia abajo” y “de abajo hacia arriba” (*top-down* y *bottom-up*) (Vijayaraghavan y Nalini, 2010). La primera plantea la división del material en secciones más pequeñas y la segunda la conformación de un material a partir de secciones pequeñas. Así, los métodos de síntesis más comunes para el enfoque “de arriba hacia abajo” son físicos tales como la evaporación térmica, deposición química de vapor, preparación de clusters gaseosos, implantación de iones, molienda; mientras que para la síntesis “de abajo hacia arriba” resultan comunes los procesos químicos tales como la coprecipitación, método coloidal, reducción fotoquímica y radioquímica, irradiación con microondas, uso de dendrímeros, síntesis solvotermal, y el método sol-gel (Gran y Li, 2012). Aunque los métodos físicos y químicos existentes han producido con éxito nanopartículas bien definidas, estos procesos son usualmente costosos e implican el uso de reactivos tóxicos. Durante las últimas dos décadas, la Biosíntesis de nanopartículas metálicas (plata, oro, platino, hierro, entre otros) ha recibido gran importancia en la investigación, esto debido a la creciente necesidad de desarrollar tecnologías que ambientalmente no representen un peligro (Chandran *et al.*, 2006). Recientemente se ha demostrado que muchos sistemas biológicos, incluyendo plantas, algas, diatomeas, bacterias, levaduras, hongos y células humanas contienen o producen compuestos químicos capaces de transformar iones metálicos en nanopartículas metálicas a través de reacciones de reducción. (Soundarrajan *et al.*, 2012). El uso de plantas, ha sido considerado como una ruta verde y un método rentable para la biosíntesis de nanopartículas. En comparación con los microorganismos, la velocidad de la reacción de la biosíntesis con plantas es relativamente alto, y la reacción puede variar de algunos minutos hasta varias horas en completarse, dependiendo del tipo y cantidad de planta. Por ello se opta comúnmente por este sistema biológico (Kumar y Yadav, 2009). El primer estudio sobre la biosíntesis de nanopartículas metálicas se realizó por Shankar *et al.* 2003, quienes utilizaron el extracto de hojas de geranio como agente reductor para la síntesis de nanopartículas. Estas se formaron en diversas morfologías, tales como

esférica, triangular y dodecaedro. En otro trabajo del mismo equipo, se observó al emplear extracto de las hojas, se reducía significativamente el tiempo de reacción que generaba la planta completa. Diversos estudios han demostrado que las plantas de género *Bacopa*, en particular la especie *Bacopa monnieri*, poseen compuestos químicos que favorecen la formación de nanopartículas metálicas. Mahitha *et al.* 2011. Diversos estudios han demostrado que las plantas de género *Bacopa*, en particular la especie *Bacopa monnieri*, poseen compuestos fitoquímicos que favorecen la formación de nanopartículas metálicas. Mahitha *et al.* 2011. Mostraron que dicha especie, es capaz de reducir oro y plata, formando así nanopartículas de 10-30 nm. Los principales compuestos encontrados fueron alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos y proteínas que sirven de recubrimiento para evitar la aglomeración. Por su parte Babu *et al.*, 2013, emplearon extracto etanólico de *bacopa monnieri* e irradiación UV para la síntesis de nanopartículas de oro, logrando así la reducción del tiempo de formación. Estos estudios demuestran que la especie *Bacopa procumbens*, podría contener compuestos similares que induzcan la formación de nanopartículas de oro. Por tal motivo, en el presente trabajo se estableció una búsqueda bidirigida hacia los compuestos que sean responsables de la actividad antimicrobiana y reductora, esto con el fin de poder establecer las relaciones de cada actividad ya que comúnmente solo se describen los posibles metabolitos secundarios, más no los compuestos activos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Nanotecnología y Nanomateriales

La nanotecnología involucra el estudio, diseño, síntesis, manipulación de materiales, equipos y sistemas funcionales a través del control de la materia en la nanoescala, siendo un nanómetro (nm) la billonésima parte de un metro. Eric Drexler introdujo el término nanotecnología” en *Engines of Creation* en 1986 para describir la manipulación de átomos y moléculas individuales para crear estructuras complejas con especificaciones atómicas (Wu y Chen 2003).

Los nanomateriales son una nueva clase de materiales (sean cerámicos, metales, semiconductores, polímeros, o bien, una combinación de estos), en donde por lo menos una de sus dimensiones se encuentre entre 1 y 100 nm. Las nanopartículas son particularmente atractivas como piezas de construcción para tales propósitos, debido a sus propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y catalíticas únicas, muchas de las cuales pueden ser moduladas

simplemente cambiando su tamaño, forma, o la funcionalización de la superficie de la nanopartícula, sin cambiar la composición del material (Lu et al., 2007).

El uso de nanopartículas presenta ciertas ventajas conferidas por su tamaño, son capaces de entrar a las células, transitar a través de vasos sanguíneos, atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a sitios donde los compuestos convencionales no logran llegar (McNeil, 2005). Esta particularidad debe ser manejada con cuidado debido a los posibles efectos tóxicos que conlleva. En general, el uso de nanomateriales también se ha enfocado en el diagnóstico y tratamiento de cáncer, así como en enfermedades infecciosas (McNeil, 2005).

Uno de los mayores logros de la nanotecnología ha sido la producción y aplicación de nanopartículas para el área biológica. De acuerdo con la Comisión Europea de Nanotecnología, en un futuro no lejano, la nanotecnología transformara por completo la industria alimentaria, cambiando los procesos de producción, procesamiento, empaque, transporte y consumo de alimentos (Liu, 2006).

2.2 Biosíntesis o Síntesis Verde

Las nanopartículas pueden ser sintetizadas usando componentes químicos, sin embargo, son métodos que poseen varias limitantes, así como altos costos y pueden ser peligrosos para la salud humana y el ambiente. El método alternativo que recientemente ha tenido mayor impacto, se basa en la síntesis verde de nanopartículas, empleando sistemas biológicos. La producción biológica de nanopartículas metálicas se está convirtiendo en un campo importante en la química, biología y ciencia de los materiales. Estos nanomateriales han sido producidos física y químicamente desde tiempo atrás. Sin embargo, la síntesis biológica ha sido investigada recientemente. La reducción biológica de metales a partir de extractos de plantas era bien conocida desde los 90s, a pesar de esto, no se sabía cómo se daba el proceso de reducción y que componentes intervenían. La síntesis de nanopartículas metálicas empleado productos naturales ha mostrados resultados similares a los producidos por métodos físicos y químicos. La utilización de extractos de plantas para la biosíntesis de nanopartículas, ha ganado gran importancia debido a las propiedades físicas, químicas y biológicas que estas poseen. En la figura 1 se muestra un diagrama de las diferentes métodos empleados para la síntesis de nanopartículas, en la que resaltamos la síntesis verde.

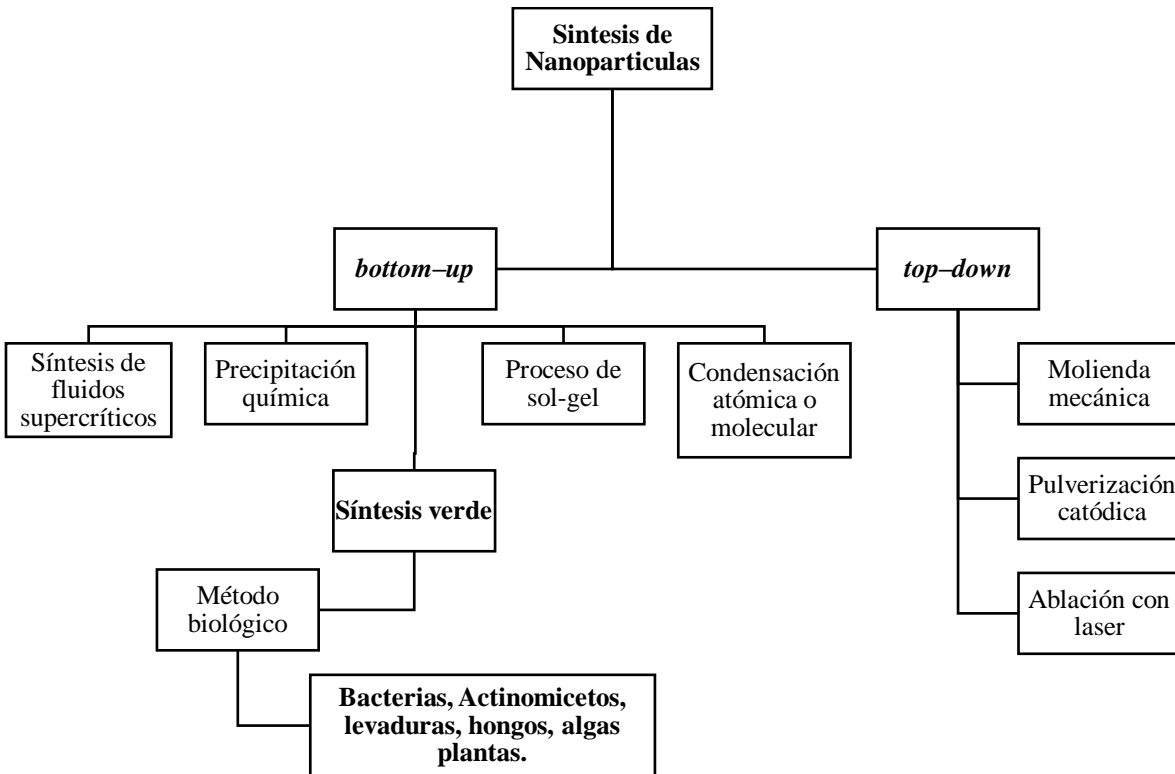


Figura 1 Métodos empleados en la síntesis de nanopartículas

2.3 Métodos verdes para la síntesis de nanopartículas metálicas

2.3.1 Métodos químicos

Estos métodos se basan en el uso de agentes químicos puros, los cuales son ambientalmente amigables. En la mayoría de estos métodos, carbohidratos como la glucosa, sacarosa, almidón, quitosán y alginato de calcio son usados como agentes reductores, de recubrimiento o ambos (Raveendran *et al.*, 2003). También, polímeros biodegradables y no tóxicos como carboxy metil sacarosa (CMC) y polietilenglicol (PEG) se han empleado con éxito en la síntesis verde de nanopartículas metálicas (Virikutyte y Varma, 2011). Las nanopartículas producidas por este método son generalmente de forma esférica.

2.3.2 Métodos basados en microorganismos

En estos métodos, microorganismos como bacterias, hongos y algas son empleados para sintetizar nanopartículas. En estos procesos, dichos microorganismos crecen en medios de cultivo bajo condiciones específicas. En este caso los agentes reductores o de recubrimiento son secretados dentro del medio o en la biomasa. Las nanopartículas son producidas al adicionar los

iones metálicos en dicho medio o biomasa, esto bajo condiciones controladas (Juibari *et al.*, 2011). Entre los microorganismos mencionados, las bacterias procariotas han sido las más estudiadas para la síntesis de nanopartículas metálicas, esto debido a que son relativamente de fácil manipulación (Thakkar *et al.*, 2010).

2.3.3 Métodos basados en extractos de plantas

Para estos métodos, diferentes partes de las plantas tales como la hoja, raíz, brote, pétalo, fruta y la cáscara se utilizan en estado fresco o seco para preparar el extracto. El método de extracción generalmente implica sumergir el material vegetal en un disolvente con o sin agitación. El extracto obtenido contiene los agentes reductores y de recubrimiento necesarios para reducir los iones metálicos. Los beneficios de utilizar la planta deshidratada es que se puede almacenar a temperatura ambiente durante un largo tiempo, pero la planta fresca debe almacenarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar su deterioro. Además, los efectos de las variaciones estacionales que conducen a variaciones en componentes de las plantas se eliminan utilizando materiales secos (Sheny *et al.*, 2011). Las diferentes variaciones tales como la temperatura, concentración del extracto, la concentración de los iones metálicos y el pH pueden influir en el tamaño y la morfología de las nanopartículas.

2.4 Biosíntesis de nanopartículas a partir de plantas

La biosíntesis de nanopartículas a base de plantas, hoy en día, es un campo de amplia exploración. La síntesis biológica de nanopartículas metálicas, especialmente oro y plata, ha recibido mayor atención como una alternativa prometedora, frente a los procedimientos físicos y químicos más empleados (Siavash, 2011). También se plantea como una técnica de bajo costo, incluso a grande escala. El extracto de la planta en la síntesis, puede actuar como agente reductor o de recubrimiento para las nanopartículas. La biorreducción de nanopartículas metálicas por combinaciones de biomoléculas, principalmente está dada por enzimas, proteínas, aminoácidos, vitaminas, polisacáridos y ácidos orgánicos como citratos. Aunque varios estudios se han enfocado en la detección y la identificación de las plantas para la síntesis controlada de nanopartículas metálicas, muy pocos trabajos se han realizado para entender el mecanismo molecular detrás de la síntesis de dichas partículas (Thakkar *et al.*, 2010). Es por lo tanto que la investigación sobre el mecanismo molecular subyacente es esencial para controlar factores como el tamaño, forma, y la cristalinidad de las nanopartículas. En los últimos años, se han

propuesto varias hipótesis para la síntesis de estas, sin embargo, el mecanismo exacto detrás aún no se conoce, por lo que son necesarios estudios más detallados. En la figura 2 se muestran de manera general el diagrama del mecanismo biológico de la síntesis de nanopartículas metálicas.

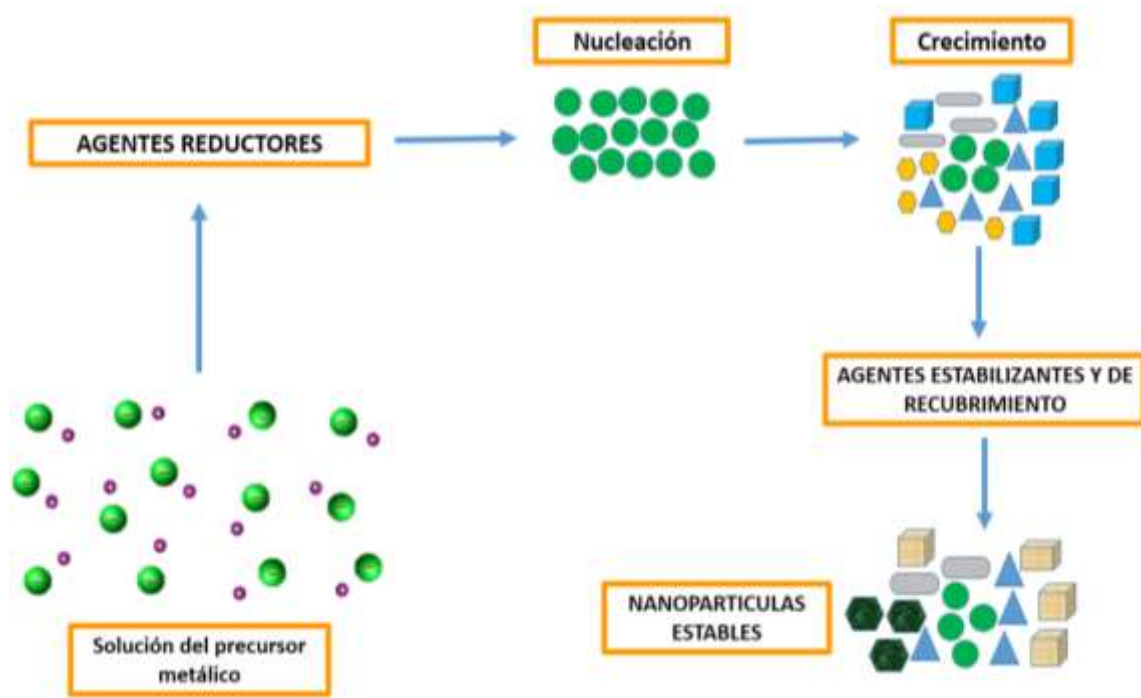


Figura 2 Diagrama esquemático del mecanismo detrás de la biosíntesis de nanopartículas metálicas a partir de plantas.

2.4.1 Biosíntesis intracelular y extracelular

En la figura 3 se observa el proceso de formación de nanopartículas de Oro y Plata de manera intra y extra celular (Gan y Yau, 2012). En el método intracelular, la planta crece en un medio de cultivo rico en iones metálicos. Los iones metálicos se reducen en el medio formando nanopartículas metálicas y se transfieren a la planta. Gardea *et al.*, investigaron la formación y crecimiento de nanopartículas Au y Ag dentro de la planta de alfalfa. Aunque este método se considera de síntesis verde, no se aplica generalmente para la producción de nanopartículas, debido a que la síntesis se produce en la biomasa, y su separación sigue siendo un gran desafío. Sin embargo, se utiliza para la remediación ambiental de metales pesados en los suelos contaminados. En la producción extracelular, empleando extractos de plantas, las nanopartículas

se forman por una simple mezcla entre el extracto y la sal metálica a temperatura ambiente. La reacción es completada en escasos minutos. Nanopartículas de oro, plata y otros metales son producidos por esta vía (Li *et al.*, 2011). La naturaleza del extracto, su concentración, el pH, temperatura, tiempo de contacto y la concentración de la sal metálica, son factores que afectan la velocidad de formación de las nanopartículas.

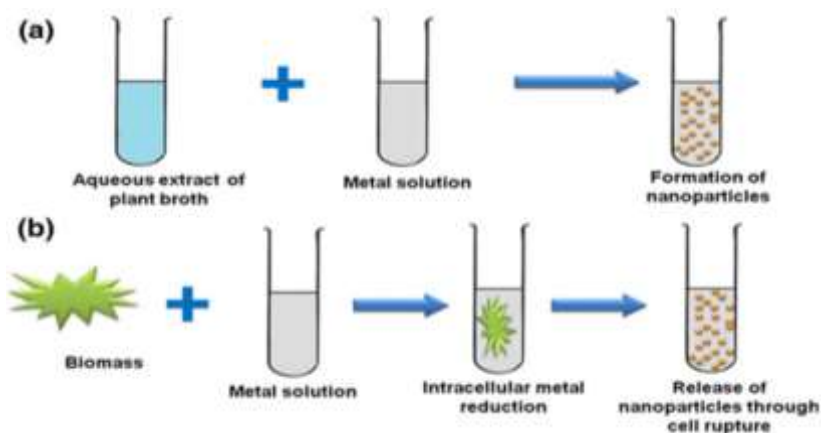


Figura 3 Proceso de la síntesis biológica de nanopartículas Au y Ag a) Extracto de planta b) biomasa de la planta (Gan y Yau, 2012).

Durante la formación de nanopartículas metálicas, intervienen tres componentes obligatorios, que son el agente reductor, agente estabilizador y el medio o disolvente que puede solubilizar el metal de interés (Vijayaragh-avan y Nalini, 2010). La Biosíntesis de nanopartículas se considera como un proceso verde debido a que la biomasa en sí, puede actuar tanto como agente reductor como estabilizador. Además, la mayoría de las síntesis mediadas por plantas pueden realizarse en un medio acuoso en lugar de disolventes orgánicos, que es aparentemente más benigno y rentable para el medio ambiente. Lukman *et al.*, 2011 propusieron que hay tres regímenes de reacción distinguibles que ocurren durante el proceso de biosíntesis: un corto periodo de inducción, una fase de crecimiento y un período de terminación. La velocidad de crecimiento de las partículas es generalmente más lenta que la rápida reducción y nucleación de las sales metálicas, lo que conduce a una mayor concentración de partículas pequeñas. En ausencia de otros ligandos fuertes, los iones metálicos podrían interactuar con la biomasa a través de uniones iónicas con los agentes reductores, tales como flavonoides o terpenoides (Figura 4). Se cree que la adsorción de agentes biorreductores en la superficie de las nanopartículas metálicas es atribuible a la presencia de π -electrones y grupos carbonilo en sus estructuras moleculares. La

teoría HSAB (ácido base dura y blanda) también puede ser aplicada en este proceso. Un metal blando como Au(III) existente en la forma de $[AuCl_4]^-$ prefiere unirse a la biomasa principalmente, a través de ligandos blandos, tales como grupos amino y sulfhidrilo, especialmente cuando los ligandos blandos están cargados positivamente a un pH bajo (Shankar *et al.*, 2004a). De hecho, la formación de nanopartículas podría ser el resultado de la nucleación heterogénea y el crecimiento generado por el proceso de maduración de Ostwald.

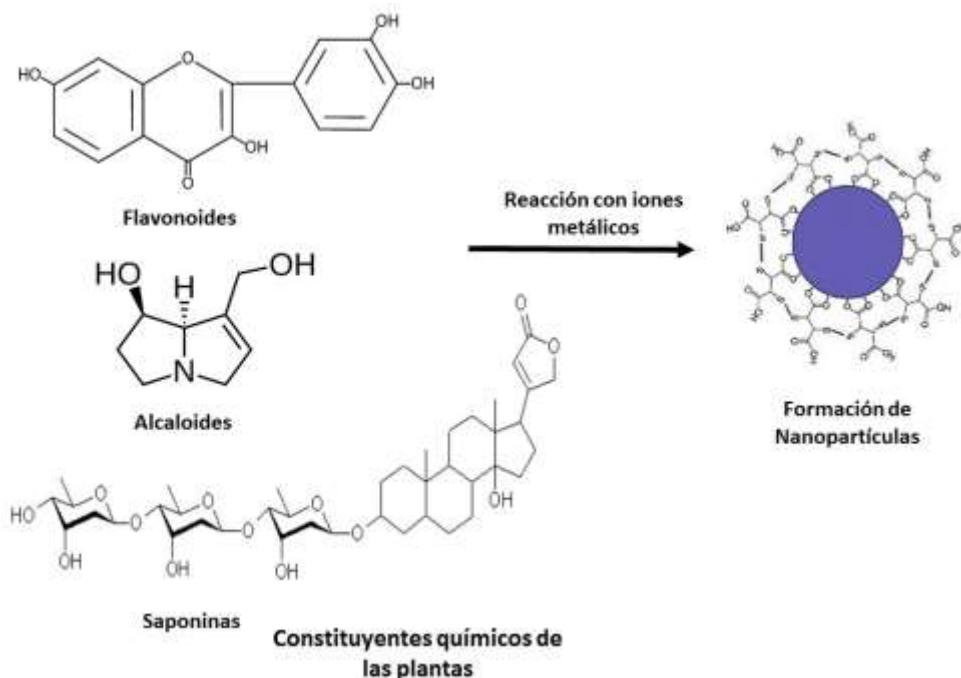


Figura 4 Principales constituyentes fitoquímicos que reaccionan con los iones metálicos.

2.4.2 Compuestos que intervienen en el proceso de síntesis

Debido a la complejidad del sistema, en este caso las plantas, es una tarea complicada identificar los componentes particulares que podrían ser los responsables de la formación de las nanopartículas. Algunas biomoléculas como terpenoides, flavonoides, polisacáridos, proteínas y alcaloides, son generalmente reconocidas como biorreductores potenciales y agentes estabilizadores en la formación de nanopartículas. Es muy probable que el proceso de biorreducción de los iones metálicos, es en realidad producto de la interacción de varios componentes activos presentes en la biomasa. A continuación, se describe cómo cada uno de los compuestos es responsable del proceso de síntesis.

- **Flavonoides**

Los flavonoides son moléculas polifenólicas solubles en agua, su estructura molecular es de 15 átomos de carbono. Se componen de 6 subgrupos principales: Flavonas, Flavonoles, Isoflavonas, Flavanonas y Flavanoles. La capacidad de varios flavonoides, tales como la quercetina como agente quelante de diversos iones metálicos, ha sido descrita. Se propuso la biosíntesis de nanopartículas de Plata, a partir de la planta albahaca, para ser iniciado por la luteolina. La luteolina se encuentra en las partes aéreas de la planta, liberan hidrógeno reactivo, el cual es responsable de la conversión de Ag^+ a Ag^0 (Gan y Li, 2012). Al igual que la luteolina, el ácido rosmarínico es otro flavonoide de origen vegetal que también induce la reducción de iones de plata. La presencia de dos grupos hidroxilo en un carbón en la forma enol del ácido rosmarínico, resulta ser poco estable y por tanto tiende a su forma ceto, que es más estable, liberando en el proceso hidrógenos reactivos. En estos casos, los hidrógenos podrían participar en la síntesis de nanopartículas de plata (Ahmad *et al.*, 2010).

- **Terpenoides**

Los terpenoides (también conocidos como isoprenoides) pertenecen a la subclase de prenillipids (terpenos), que representan un extenso grupo de productos moleculares pequeños, sintetizados por las plantas. Los terpenoides contribuyen al olor, sabor y el color de algunas plantas, como la canela, el clavo y la cannabis (Song *et al.*, 2009). Los terpenoides en la hoja de geranio pueden ser responsables de la síntesis de nanopartículas de Ag. La corteza de *C. zeylanium* es rica en terpenoides, incluyendo linalol, eugenol y chavicol de metilo, que contribuyen a su distintivo aroma. Se sugirió por Singh *et al.* 2010, que eugenol es capaz de liberar un protón a través de su grupo OH^- y que incluso puede liberar simultáneamente dos electrones que son responsables de la reducción de iones de Au y Ag.

- **Azúcares reductores**

La capacidad de los diferentes azúcares como agentes reductores para la síntesis de nanopartículas metálicas se demostró por Panigrahi *et al.* (2004). Su estudio muestra que las nanopartículas con un tamaño uniforme se pueden producir utilizando fructosa, mientras que se generaron partículas de tamaños variables empleando glucosa y sacarosa.

- **Proteínas**

Debido a la complejidad de la estructura de las proteínas, la biorreducción con estas macromoléculas es usualmente más complicada. De acuerdo al análisis FTIR de la biosíntesis de nanopartículas, la presencia de amida I y amida II así como bandas de C-O son observadas frecuentemente, lo que indica la presencia de grupos funcionales de proteínas (Lukman *et al.* 2011). Los roles de los péptidos como agentes reductores y envolventes fueron probados en nanopartículas de Ag sintetizadas por péptidos cíclicos en el látex de *Jatropha curcas* enriquecidos con prolina y residuos de aminoácidos que contienen grupos hidroxilo (Bar *et al.*, 2009).

2.5 Síntesis de nanopartículas metálicas empleando el género *Bacopa*

Mahitha *et al.*, (2013), evaluaron la actividad antimicrobiana de nanopartículas de oro, sintetizadas a partir del extracto de *Bacopa monniera*. Encontrando que las nanopartículas biológicamente sintetizadas son altamente eficaces contra diferentes patógenos humanos resistentes a múltiples fármacos tales como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus*. Obtuvieron partículas de 15 a 35 nm. Los análisis de FTIR evidenciaron la presencia del grupo funcional hidroxilo presente en alcoholes y fenoles, otras vibraciones mostraron ésteres, ácidos aromáticos carboxílicos y aminas primarias y secundarias.

Nellore *et al.*, (2013), demostraron la rápida formación de nanopartículas de platino empleando extracto de la planta *Bacopa monnieri*, En base a los análisis de TEM, los tamaños estimados oscilan entre 5-20 nm. De acuerdo a los análisis de FTIR, evidenciaron la presencia de proteínas que forman una capa que cubre las nanopartículas de platino para estabilizar y prevenir su aglomeración. En este estudio, concluyeron en base a la prueba en pez cebra, que las nanopartículas de platino pueden ser empleadas como un supresor ante el mal de Parkinson.

Babu *et al.*, (2013), sintetizaron nanopartículas de oro, empleando extracto etanólico de *Bacopa monnieri* y radiación UV. Mostraron que el extracto de la planta empleada posee funciones reductoras y envolventes, lo cual le otorga alta estabilización a las nanopartículas. Los análisis de UV-Visible y TEM, indicaron la formación de nanopartículas de oro en un rango de tamaño de 3-45 nm, con un diámetro promedio de 11 nm. Los espectros del FTIR mostraron la presencia de grupos OH⁻, el grupo metil de los alcanos y enlaces C-N correspondientes al enlace amida.

Dichos autores concluyen que estas nanopartículas pueden ser aplicadas en biomedicina y otras áreas.

Mahitha *et al.*, (2011), sintetizaron nanopartículas de plata con tamaños promedio de 10 nm, utilizando el extracto de *Bacopa monnieri*. La caracterización de UV-Visible, TEM, demostraron la estabilidad de la biosíntesis. Los análisis de FTIR evidenciaron la presencia de alcoholes y fenoles, ácidos carboxílicos, proteínas y metabolitos secundarios. Las nanopartículas fueron empleadas para evaluar su actividad antimicrobiana, lo cual, en comparación con un antimicrobiano comercial, obtuvieron buenos resultados.

2.6 *Bacopa procumbens*

El género *Bacopa*, es uno de los 220 generos que pertenecen a la familia Scrophulariaceae, es principalmente americano y comprende alrededor de 60 especies; sin embargo la especie *B. procumbens* (Mill.) Greenm., es la misma que *Mecardonia procumbens* (Mill) Small.

2.6.1 Clasificación Taxonomica

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Scrophulariales
Familia	Scrophularia
Genero	<i>Bacopa</i>
Especie	<i>Bacopa procumbens</i> (Mill.) Greenm

2.6.2 Descripción morfológica

Es una hierba perene nativa de México. Tallos procumbentes o subrectos, ramificados desde la base, glabros, de 4 a 30 cm de largo; hojas opuestas, sésiles o brevemente pecioladas, de 5 a 15 mm de largo, ápice agudo o redondo, márgenes aserrados; pedúnculos, más largos que las hojas; inflorescencias solitarias en las axilas de las hojas; cáliz de 5 sépalos, de 4 a 8 mm de largo, glabros; corola bilabiada de 6 a 12 mm de largo, lóbulos amarillos; estambres 4; el fruto

es una cápsula oblogada, de hasta 1 cm de largo y semillas cilíndricas, pequeñas y numerosas. La planta se ennegrece con el secado (Rzendowski y Rzendowski, 2001).

2.6.3 Distribución y Usos

Especie originaria de México, genero de regiones tropicales y templadas. Ampliamente distribuida, desde el sur de Estados Unidos hasta Sudamérica, habita en climas semisecos entre 700 a 2850 metros sobre el nivel del mar. Asociada principalmente a pastizales y matorrales xerófilos, sin embargo, también se encuentra como planta ruderal, a lo largo de caminos y sitios húmedos. En México los usos dependen de la localidad, en el estado de Tabasco, se bebe la infusión de la planta, con la finalidad de eliminar la fatiga del cuerpo. En Veracruz, es usada como un antimalárico, en desordenes biliares y contra anemia, en Nayarit, las hojas de emplean para manchas de la cara, También esta hierba se utiliza para el tratamiento de erupciones y como un antiséptico.

3 JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente incorporación de compuestos tóxicos al ambiente, se han planteado la síntesis de nanomateriales que sean inocuos y que no representen algún riesgo o afectación al medio ambiente, y que además puedan ser aplicados en diferentes áreas. Por ello se ha planteado la Bio-síntesis de nanopartículas metálicas a partir de extractos de plantas, como un método prometedor y amigable con el medio ambiente. Diversos estudios han demostrado que las plantas poseen compuestos fitoquímicos capaces de reducir el metal y estabilizarlo, para formar partículas de tamaño manométrico. En base a esto se planteó sintetizar nanopartículas de oro a partir de la planta *Bacopa procumbens*.

4 HIPÓTESIS

Los compuestos químicos presentes en el extracto Hidroalcohólico de *Bacopa procumbens* serán capaces de biosintetizar nanopartículas de oro

5 OBJETIVO GENERAL

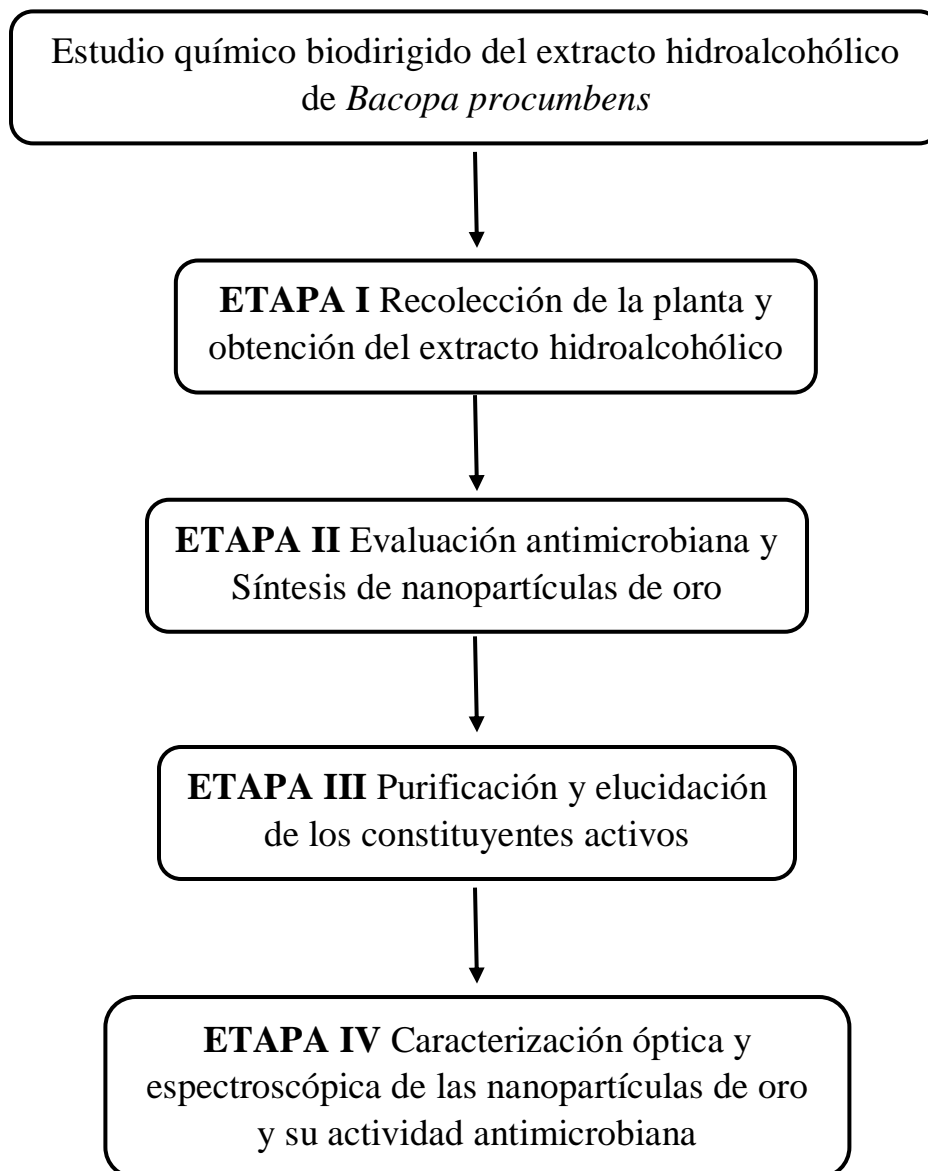
Biosintetizar y caracterizar nanopartículas metálicas a partir de los compuestos químicos presentes en *Bacopa procumbens*, y evaluar su efecto antimicrobiano.

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Dirigir los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico de *Bacopa procumbens* hacia la síntesis de nanoestructuras de oro y actividad antimicrobiana
- Caracterización mediante métodos espectroscópicos y microscópicos de las nanopartículas sintetizadas
- Purificación de los compuestos activos y elucidación de su composición química
- Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados vs las nanopartículas de oro

7 MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental para dar cumplimiento a los objetivos



7.1 ETAPA I Recolección de la planta y obtención del extracto hidroalcohólico liofilizado (HAL)

7.1.1 Recolección

La planta fue recolectada durante el mes de octubre del 2015 en el estado de Hidalgo, a una altura aproximada de 2,093 metros sobre el nivel del mar, temperatura 16 °C, Figura 5. (No. Registro, Herbario Iztacala UNAM, 1,792)



Figura 5 Recolección de la planta *Bacopa procumbens*, estado de Hidalgo

Una vez obtenido el material vegetal, se procedió a secarlo durante 4 días a temperatura ambiente. El proceso de molienda se realizó en una licuadora industrial.

7.1.2 Obtención del extracto Hidroalcohólico

El polvo obtenido fue tamizado, volviéndose a moler los fragmentos de mayor tamaño hasta formar un polvo uniforme. La extracción se realizó en una columna de reflujo, por cada 40 gramos del polvo se agregaron 600 ml del disolvente, empleado una relación 50:50 de etanol: agua. Se mantuvo a reflujo durante 4 horas a 75 °C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos, se colectó el sobrenadante en un frasco ámbar y se repitió el proceso 4 veces con los 40 gramos de inicio, Figura 6. El extracto obtenido se concentró mediante el proceso de destilación a presión reducida, en el rotavapor rotatorio Buchi®-490; Buchi, Suiza.

Para eliminar el agua residual del extracto, se sometió a un sistema de alto vacío (Liofilizadora LABCONCO®, freezer drye 18), posteriormente se conservó a -4 °C para los futuros ensayos.



Figura 6 Tamizado y extracción hidroalcohólica de la planta *Bacopa procumbens*

7.2 ETAPA II Síntesis de nanopartículas de oro y evaluación antimicrobiana

Las nanopartículas de oro (NPsAu) se sintetizaron en base al siguiente método.

Se empleó el precursor metálico HAuCl_4 a una concentración de 1 mM. Del extracto liofilizado HA se prepararon soluciones en base a la relación masa/volumen al 1, 0.75, 0.5 y 0.25 %, posteriormente, en base a la relación Extracto/Sal metálica se probaron; 9:1, 7:3, 5:5, 3:7 y 1:9 a un volumen total de 400 μl , de esta manera en la tabla 1 se muestra el diseño experimental. La respuesta a medir esta denotado por las letras en mayúsculas y minúsculas Aa, Ba, etc.

Tabla 1 Diseño experimental de las pruebas de síntesis

	A	B	C	D	F
Extracto:Sal	9:1	7:3	5:5	3:7	1:9
% Extracto					
a 1%	Aa	Ba	Ca	Da	Fa
b 0.75%	Ab	A-b	Cb	Db	Fb
c 0.50%	Ac	Ac	Cc	Dc	Fc
d 0.25%	Ad	Ad	Cd	Dd	Ff

La formación de las nanopartículas se corroboró por Espectroscopía UV- Visible. Se evaluó la posición y la forma del pico medio de absorción, para predecir el tamaño, la forma y la polidispersidad de las estructuras, el medio circundante y las sustancias adsorbidas en sus superficies.

7.2.1 Bioautografía y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para ambos ensayos, se emplearon los métodos descritos por Navarro *et al.*, en 1998.

Los microorganismos empleados para ambos métodos fueron: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358) *Escherichia coli* (ATCC 8937), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Candida albicans* (ATCC 10231) (American-type Culture Collection Rockville, MD. USA).

Para la prueba de Bioautografía, empleamos cortes de 5 x 5 cm de placas de aluminio recubiertas de silica gel F254 (fase normal, cat. 1.05554.0001, Merck). Se emplearon diferentes sistemas de elución con los disolventes Diclorometano:Metanol, dependiendo de la polaridad de los compuestos. Todas las placas cromatográficas fueron manipuladas en condiciones de esterilidad, del mismo modo, se emplearon placas control para esta prueba. La bacteria fue ajustada mediante turbidez al estándar de McFarland de 0.5 (aproximadamente 10^8 UFC/ml), posteriormente se le realizó una dilución 1:10 (10^7 UFC/ml). Esta suspensión bacteriana fue dispersada sobre toda la placa con los compuestos ya eluidos. Se colocaron en cámaras húmedas y fueron incubadas a 37 °C durante 24 hrs. Después de la incubación, se revelaron las placas con la solución de TTC (2, 3, 5-Cloruro de Tetrazolio).

Para la determinación de la CMI se emplearon diferentes concentraciones del extracto HAL, de la fracción acuosa, la fracción de acetato de etilo, así como de los productos semipuros. Se disolvieron en el medio Müller Hinton (MH) pH=7.4 a 45 °C. Aproximadamente 10 ml del medio de cultivo fueron agregados en cajas Petri. Los microorganismos empleados fueron crecidos hasta tener 10^8 UFC/ml en caldo MH, posteriormente se le realizó una dilución 1:20. De esta solución, se aplicaron 0.002 ml, con lo cual obtenemos un círculo con diámetro de 5-8 mm, esta cantidad contiene 10^4 UFC/ml. Las cajas fueron incubadas por 24 h a 37 °C. Se empleó Gentamicina de 5-120 µg/ml como antibiótico de referencia.

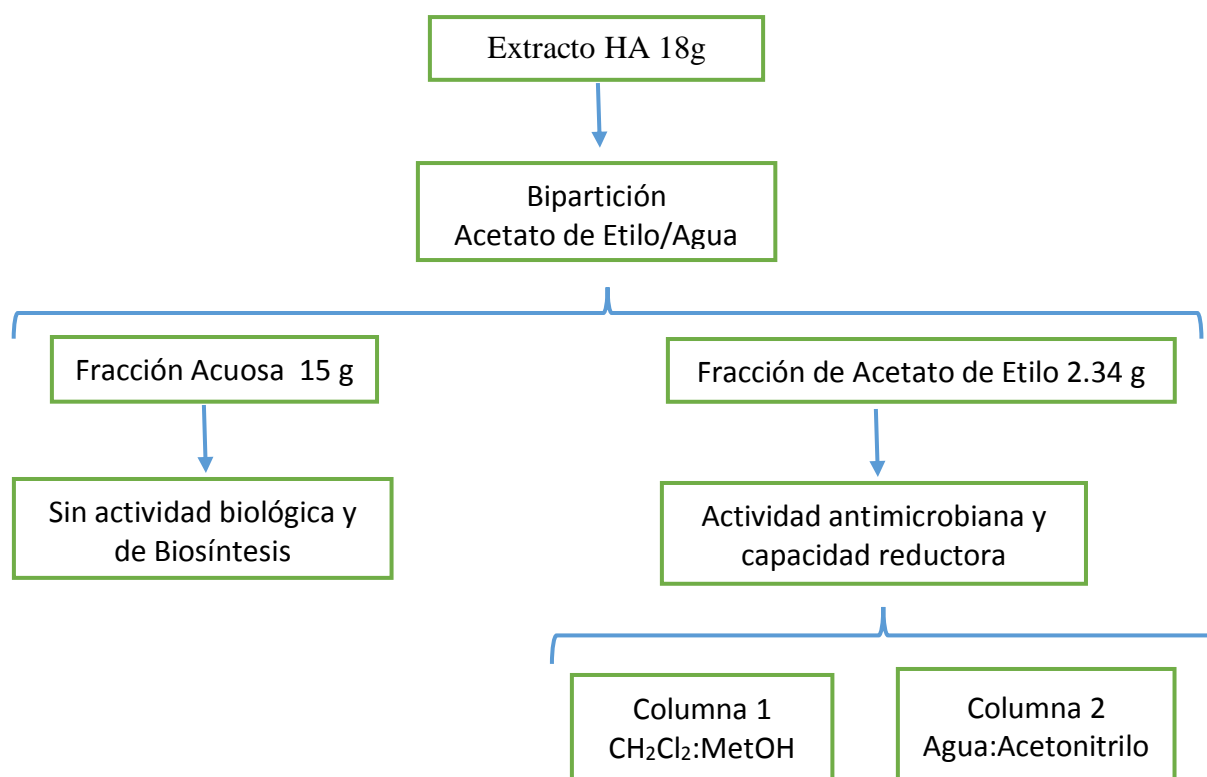
7.3 ETAPA III Purificación y elucidación de los constituyentes activos

Corroborada la actividad antimicrobiana y la formación de nanopartículas de oro del extracto HAL, procedimos con la purificación de los compuestos activos, el cual se desarrolló en base al diagrama 2. La metodología empleada se describe a continuación

7.3.1 Extracción liquido-liquido del extracto HAL

En primera instancia, separamos los metabolitos secundarios del extracto HAL en base a su polaridad, mediante el proceso de extracción liquido-liquido. Se disolvieron 18 gramos del extracto HAL en 500 ml de agua destilada y empleando la relación 1:1, en un embudo de separación agregamos 500 ml de Acetato de etilo (CtEAe, J.T. BAKER, 9289-03), se agitó vigorosamente la mezcla y separamos la fracción orgánica y la acuosa por diferencia de densidades, de esta manera obtuvimos los compuestos de baja y mediana polaridad en la fracción de acetato de etilo (FACOEt) y los de mayor polaridad en la fracción acuosa (FAcuosa). Para ambas fracciones se realizaron pruebas de síntesis de NPsAu y ensayos antimicrobianos.

DIAGRAMA 2. Fraccionamiento químico biodirigido de la planta *Bacopa procumbens*



7.3.2 Fraccionamiento químico y purificación de los compuestos activos de la (FACOEt)

En base a los resultados obtenidos en la síntesis de NPsAu y actividad antimicrobiana de la FAcuosa y FACOEt, se observó que la actividad es dada por los compuestos de baja y mediana polaridad, obtenidos en la fracción orgánica, por tal motivo se le realizó el fraccionamiento químico. Empleando las técnicas cromatográficas convencionales como Cromatografía en columna gravitacional abierta (CCA), Cromatografía en capa fina (CCF) y Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en ese orden, se obtuvieron 18 reuniones mayoritarias con etiquetas **BpEHC1R1-18**, donde Cn y Rn denotan el número de columna y el número de reunión. Para la BpEHC1 y BpEHC2 empleamos sílica gel 60 0.063-0.200 mm (fase normal, Merck), placas de aluminio recubiertas de sílica gel F₂₅₄ (fase normal, cat. 1.05554.0001, Merck) y sílica gel 60 RP-18 F254S (fase reversa cat. 1.05559.0001, Merck). El sistema óptimo de elución para las CCP de fase normal fue 85:15 Diclorometano (CH₂Cl₂ 2610-L, TECSIQUIM): Metanol-HPLC (CH₃OH-HPLC, MT-2515-7, TECSIQUIM), mientras que para las CCP en fase reversa fue 6:4 Agua-HPLC (H₂O-HPLC, WX-004-1, Merck): Acetonitrilo-HPLC (CH₃CN-HPLC, AT0090-7, TECSIQUIM). (TPA, Merck). Las placas se analizaron con una lámpara de luz ultravioleta (UVGL-58, UVP, 254-365 nm UV, Cambridge UK). El HPLC empleado, consta de un sistema cromatográfico de Modulo de Separación (Waters 2695), un Detector de serie de fotodiodos (Waters 2996) y una Columna Licrosphere 100 RP-18 de 250 x 4 mm (5 µm de tamaño de partícula).

Para la detección física de los compuestos presentes, se utilizó el reactivo de Komarowsky (KOM), el cual contiene 1 ml de ácido sulfúrico-etanólico al 50 % y 10 ml de 4-hidroxibenzaldehído metanólico al 2% los cuales son mezclados antes de ser usados. Una vez rociada la placa se calienta a 100 °C durante 5-10 minutos. Este reactivo sirve para detectar aceites esenciales, principios pungentes, principios amargos y saponinas, entre otros.

En la BpEHC2 se purificaron las reuniones activas obtenidas en la BpEHC1, donde se obtuvieron 6 compuestos, etiquetados como BpEHC2F5, BpEHC2F17, BpEHC2F23, BpEHC2F31, BpEHC2F37 y BpEHC2F39.

La BpEHC2F17 fue sometida a un proceso de acetilación. En un vial de vidrio de 14 ml, se preparó una mezcla de 1 ml de anhídrido acético y piridina con una relación 2: 1 (v/v), en esta mezcla se adicionaron 55 mg de muestra y una vez disuelta, se dejó reaccionar por 30 min

en un baño maría a 60°C. Transcurrido el tiempo, se adicionaron 10 ml de agua y el producto de reacción se extrajo con Acetato de etilo (10 ml x 3 veces).

Cada muestra fue analizada mediante métodos espectroscópicos como UV-Visible, Infrarrojo por Transformada de Fourier, Espectrometría de masas, Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C para la elucidación estructural de cada compuesto.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono (RMN de ^1H y ^{13}C) así como los experimentos de 2-dimensiones (2-D) de correlated spectroscopy (COSY), heteronuclear simple quantum coherence (HSQC). heteronuclear multiple bond coherence (HMBC), fueron obtenidos por el equipo Varian Lnova-400 a 400 y 100 MHz para espectros los de RMN ^1H y ^{13}C respectivamente, las muestras fueron diluidas de acuerdo a su solubilidad utilizando metanol deuterado (CD_3OD). Para su posterior análisis e interpretación se utilizó el software ACD/Labs Predictor y ACD/Processors 12.0 como simulador teórico de los compuestos aislados.

7.4 ETAPA IV Caracterización óptica y espectroscópica de las nanopartículas de oro y su actividad antimicrobiana

7.4.1 Espectroscopia UV-Visible

La espectroscopía UV-visible es una técnica que permite saber si el proceso de síntesis ha concluido con la formación de nanopartículas. Por ejemplo, la aparición de un pico de absorción alrededor de los 400nm es un indicativo de la presencia de nanopartículas de plata (Kapoor, 1998). La absorción de radiación UV-visible provoca una excitación de los electrones de orbitales de más baja energía a orbitales de más alta energía en una molécula. La máxima absorción UV-visible ocurre en una longitud de onda característica de la estructura de la molécula (Moore, 2000). Los materiales a nivel nanométrico presentan propiedades ópticas que difieren grandemente de sus contrapartes en bulto (Zhao *et al.*, 2006). Los espectros de absorción óptica de nanopartículas metálicas son dominados por resonancias de plasmón superficial (Pal *et al.*, 2007).

La posición y la forma del pico de absorción dependen principalmente de factores como el tamaño, la forma y la polidispersidad de las partículas, el medio circundante y las sustancias adsorbidas en sus superficies (Mitra y Bhaumik, 2007; Slistan-Grijalva *et al.*, 2008). El pico de absorción tiende a ubicarse hacia longitudes de onda mayores, a medida que el tamaño de

la partícula aumenta. Por ejemplo, la emisión de un pico a 400 nm corresponde a nanopartículas de plata de menos de 5 nm de diámetro, mientras que si el pico de absorción se desplaza a 420 nm, el tamaño de 24 predominante de las partículas es de alrededor de 20 nm (An *et al.*, 2008). Además, la agregación de las nanopartículas provoca una disminución en la intensidad del pico, y la aparición de “hombros” en longitudes de onda mayores (Kapoor, 1998). Por otra parte, el número de picos de resonancia disminuye con el incremento de la simetría de la partícula (Elechiguerra *et al.*, 2005). De acuerdo con la teoría de Mie, solo una banda simple de resonancia de plasmón superficial se presenta en espectros de absorción de nanopartículas esféricas, mientras que en partículas anisotrópicas se pueden presentar dos o más bandas, dependiendo de la forma de las partículas (Pal *et al.*, 2007).

La comprobación para el proceso de síntesis verde, se realizó en un espectrofotómetro UV-vis marca Thermo Scientific, modelo Evolution 600, las muestras se analizaron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Se realizaron mediciones, de 190 a 900 nm buscando bandas de absorción del material biológico y de Resonancia de plasmón de superficie características para AuNPs tras la síntesis. Como blanco se utilizó agua. Los datos se procesaron con el programa Origin 8.0.

7.4.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Es la técnica más importante para caracterizar nanopartículas metálicas, ya que permite observar el tamaño, forma, estructura interna y, a través de difracción de electrones, las especies químicas de las nanopartículas (Baker *et al.*, 2004). En un MET, un haz de electrones es dirigido hacia la superficie de una muestra. Los electrones penetran la muestra, son dispersados a medida que la atraviesan, son enfocados por la lente objetivo, son amplificados por la lente magnificadora y finalmente la imagen deseada es producida (Poole y Owens, 2003). Dos tipos de imagen pueden ser obtenidas: campo oscuro y campo claro. Las imágenes en campo claro son producidas por los electrones que se propagan a través de la muestra. Por otro lado en el campo oscuro la imagen es producto de los electrones difractados (Baker *et al.*, 2004). En equipos de alta resolución se pueden obtener resoluciones de 0.1nm o menos. La imagen es formada de los electrones que se transmiten a través del material analizado. Los patrones de difracción de electrones permiten determinar las constantes de redes de las partículas lo que ayuda a la identificación de la especie. La preparación de las muestras para

su observación en TEM, consiste en realizar una dispersión de las nanopartículas en un solvente y dejarlas secar sobre una rejilla de cobre con recubrimiento de carbono.

Para la caracterización del tamaño y forma de las nanoestructuras de Au sintetizadas, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución, (JEOL® modelo JEM 2010 con un voltaje de aceleración de 200 kV).

Mediante el uso de este equipo se tomaron imágenes a 2k, 4k, 6k, 20k, 100k y 200k para observar la forma y los diferentes tamaños de partícula sintetizada. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de la suspensión de AuNP's sobre una rejilla de cobre con fombart cubierta con carbono tipo B de la marca TED Pella INC, ésta se dejó secar al medio ambiente dentro de una caja Petri, para posteriormente almacenarla en un porta rejillas hasta su análisis (Nölting, 2006).

7.4.3 Espectroscopía de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12800 y 10 cm^{-1} , que corresponden a longitudes de onda de 0.78 a 1000 μm . Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de la instrumentación, es conveniente dividir el espectro infrarrojo en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano (Skoog y Leary, 1994).

El FTIR utiliza la interacción de la radiación infrarroja con la materia para obtener información sobre la estructura molecular. Tanto la espectroscopía de infrarrojo como espectroscopía Raman están basadas en las transiciones vibracionales discretas que tienen lugar en el estado electrónico de las moléculas. Las posiciones relativas de los átomos en una molécula no son exactamente fijas, sino que fluctúan continuamente como consecuencia de una multitud de tipos de vibración y rotación diferentes alrededor de los enlaces en la molécula. El principal uso de la FTIR en la caracterización de nanopartículas metálicas es para detectar especies químicas enlazadas a la superficie y para monitorear reacciones también en la superficie (Baker et al., 2004). Esta técnica es esencialmente sensible a la presencia de grupos polares tales como O-H, C=O, C-O y N-H (Ma y Phillips, 2002). La técnica de ATR (Attenuated Total Reflection) es utilizada en el IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la

superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito de interés. (Nölting, 2006).

Para la caracterización por espectroscopia FTIR se utilizó un equipo modelo Vertex 70 de la marca Bruker, los barridos se realizaron en modo ATR con los siguientes parámetros: 60 escaneos de background y 120 escaneos para análisis de la muestra, con un barrido de 370 a 5000 cm^{-1} .

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 ETAPA I Recolección de la planta y obtención del extracto hidroalcohólico liofilizado (HAL)

Algunos ejemplares colectados fueron seleccionados y utilizados para llevar a cabo la identificación taxonómica, realizada por la Bióloga María Edith López Villafranco, corroborando la especie de la planta *Bacopa procumbens* (Mill) Greenm. Además, se realizaron dos fichas de herbario las cuales fueron depositadas en el herbario IZTA- FLORA ÚTIL DE MEXICO de la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, UNAM, con número de registro 1792 (Figura 7). En base al método de extracción empleado, se obtuvo un rendimiento de 20 %, lo cual se asemeja a lo reportado por Hidalgo en el 2010.



Figura 7 Ficha de Herbario de la especie *Bacopa procumbens* (Mill) Greenm

8.2 ETAPA II Síntesis de nanopartículas de oro y evaluación antimicrobiana

De forma visual, se observaron coloraciones características de la formación de nanoestructuras de oro (rojo rubí). En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos en UV-Visible en cuanto a las variaciones de relación Extracto:Metal, corroborándose así, en primer instancia, la capacidad reductora de oro, dada por los metabolitos presentes en el extracto HAL de la planta.

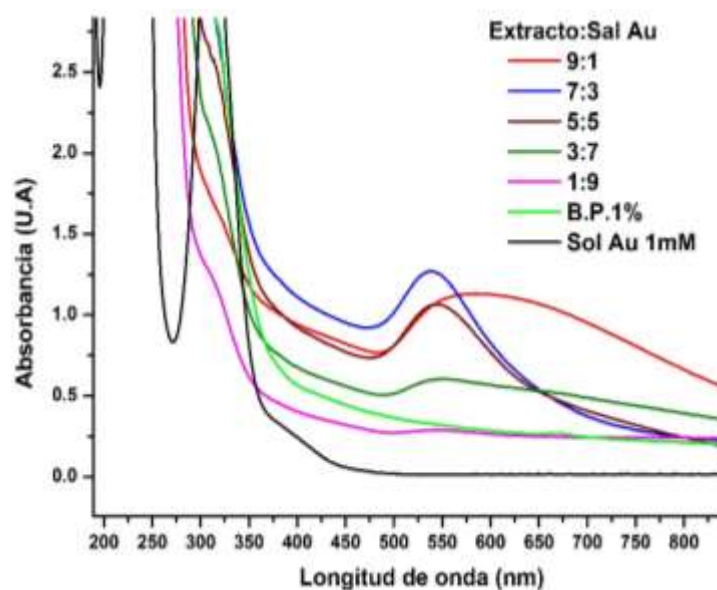


Figura 8 Espectro de UV-Visible de NPsAu empleando diferentes relaciones Extracto:Metal. La posición del pico medio de absorción, así como la distribución del espectro de absorción en la región 500 a 650 nm, nos indica que la formación de nanoestructuras depende en gran medida de la relación Extracto:Metal empleada, en el caso de la relación 9:1, observamos que la banda de absorción es más amplia, con respecto a los demás, de acuerdo con Lu *et al.*, 2007, estos espectros son característicos de aglomerados y estructuras polimórficas. Es por esto que en base al diseño experimental empleado, así como los resultados obtenidos por UV-Visible, se eligió sintetizar las nanoestructuras en base a la relación Extracto/Metal 7:3, con el cual se obtuvo una mejor coloración, estabilidad y una distribución más uniforme del espectro de absorción, empleado siempre disoluciones de 1mg/ml del extracto, fracción o compuesto activo. Las reacciones se llevaron a un volumen total de 1 ml.

Para evidenciar la funcionalización de las nanoestructuras empleando el extracto HAL, se realizó la determinación de los principales grupos funcionales que quedaron expuestos en las

partículas. En la figura 9 se muestran los espectros vibracionales de las nanopartículas lavadas con agua desionizada, así como el espectro del extracto HAL de *Bacopa procumbens*.

En la Tabla 2 se muestran los principales grupos funcionales asociados a los espectros de infrarrojo obtenidos en el equipo FTIR. Cabe mencionar que se logra apreciar la aparición de ciertos grupos funcionales en las nanopartículas ya lavadas, así como el incremento en ciertos picos, lo cual corrobora la funcionalización de estas. Kumar *et al.* 2009; Bar *et al* 2009; Ahmad *et al.*2010 y Gan *et al.*2012, describieron que los posibles grupos funcionales adheridos a las nanopartículas, corresponden a metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos, alcaloides, entre otros.

Tabla 2 Principales grupos funcionales expuestos en la superficie de las nanopartículas

2927 Y 2850	C-H (CH ₃ Y CH ₂)	Alcanos
1723	C=O	carbonilo (esteres o ácido carboxílico)
1655	C=O	carbonilo (aldehído)
1610	C=O	carbonilo (cetona)
1650 Y 1513	N-H	amina primaria y secundaria flexión
1447	C-C	ácido carboxílico de aromáticos, estiramiento
1375	C-N	grupo amino aromático, estiramiento
1070, 1050 Y 1035	C-N, C-C Y C-O	alcoholes, ácido carboxílico, esteris y éteres, flexión en el plano

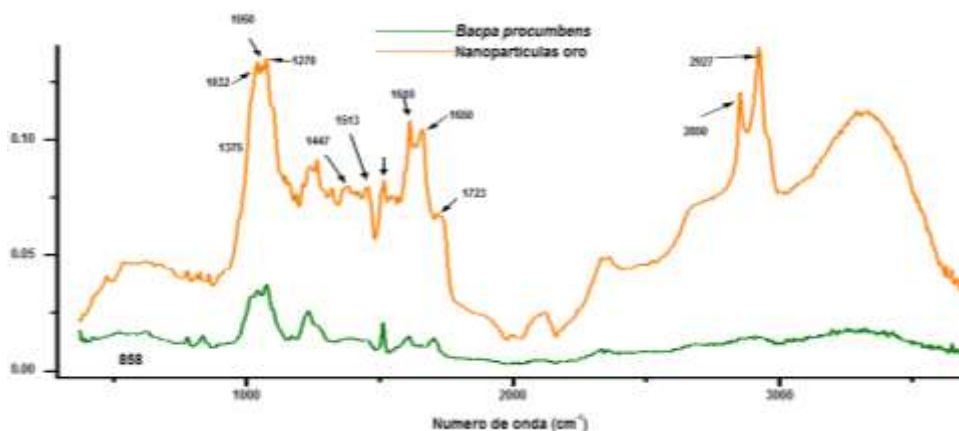
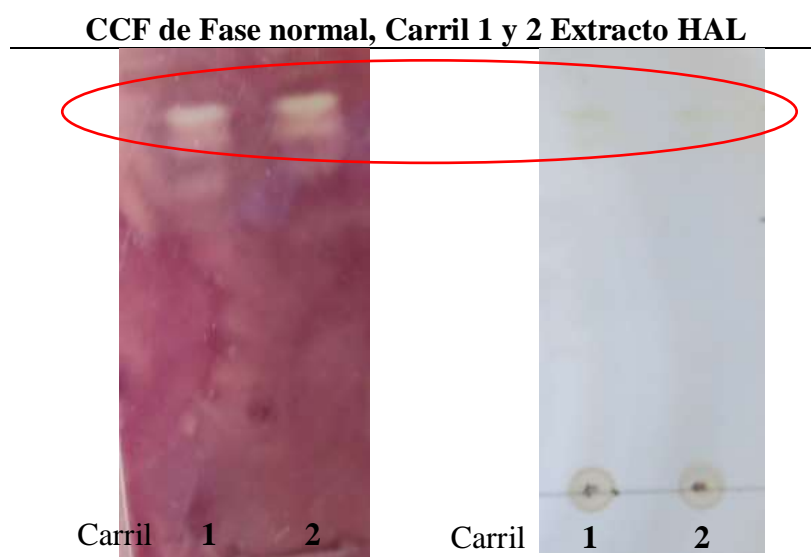


Figura 9 Espectros FT-IR de nanopartículas de oro y Extracto HAL

Las pruebas microbiológicas por el método de Bioautografía del Extracto HAL, fueron favorables, se observó que los compuestos de mediana y baja polaridad pueden ser los responsables del halo de inhibición observado en la placa cromatográfica (Tabla 3), esto

respecto al control. El sistema óptimo de elución empleado fue 85:15 Diclorometano:Metanol. Estos resultados son semejantes a lo reportado por Navarro *et al.*, en 1997, con extractos Hexánicos, Diclorometánicos y clorofórmicos, los cuales presentaron actividades significativas.

Tabla 3 Bioautografía en CCF en fase normal del Extracto HAL



La CMI del extracto HAL fue de 300 $\mu\text{g/ml}$, únicamente para la bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358), para las demás bacterias fue mayor a 400 $\mu\text{g/ml}$. La Gentamicina presentó MICs de 5 $\mu\text{g/ml}$ para *S. aureus* y 10 $\mu\text{g/ml}$ para el resto. De acuerdo a la literatura, para extractos, la CMI debe ser menor a 450 $\mu\text{g/ml}$, para ser considerado un producto antimicrobiano potencial, por esta razón se decidió continuar con la purificación de los compuestos activos, tanto para la síntesis de nanopartículas de oro como para la actividad antimicrobiana.

8.3 ETAPA III Purificación y elucidación de los constituyentes activos

Del proceso de bipartición, obtuvimos 15 g de la fracción acuosa y 2.6 g de la FACOE_t, en la Figura 10 se observa la CCF de ambas fracciones, empleando el sistema de elución 85:15 Diclorometano:Metanol. Cabe mencionar que en ambas fracciones, al ser concentradas a presión reducida, observamos la formación de espuma en gran cantidad, por lo que posiblemente tengamos compuestos del tipo Saponina. Siguiendo el proceso de purificación, evaluamos la actividad biológica de ambas, así como la capacidad reductora.



Figura 10 CCF de la 1 F. acuosa y 2 F. orgánica (Revelador Komarowsky)

Se observa en la Figura 11 que la síntesis difiere significativamente entre la FACOEt y la FAcuosa, por ello se realizaron síntesis empleando concentraciones crecientes, donde podemos observar que a partir de los 15 min, las coloraciones se intensifican, lo cual se corrobora en pico medio de absorción, sin embargo, observamos que después de las 24 h el coloide precipita, esto para las concentraciones 3 y 5 mg/ml, lo cual se puede atribuir al incremento del material vegetal, comúnmente las partículas mayores de la FACOEt que no se logran diluir se agrupan, formando así aglomerados. Por esta razón se empleó siempre 1mg/ml de las fracciones o compuestos puros.

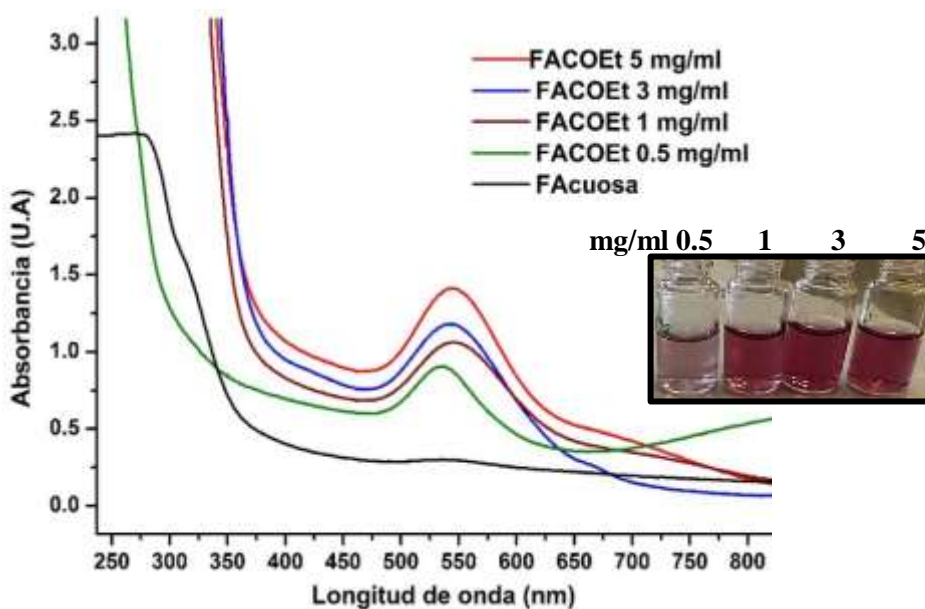
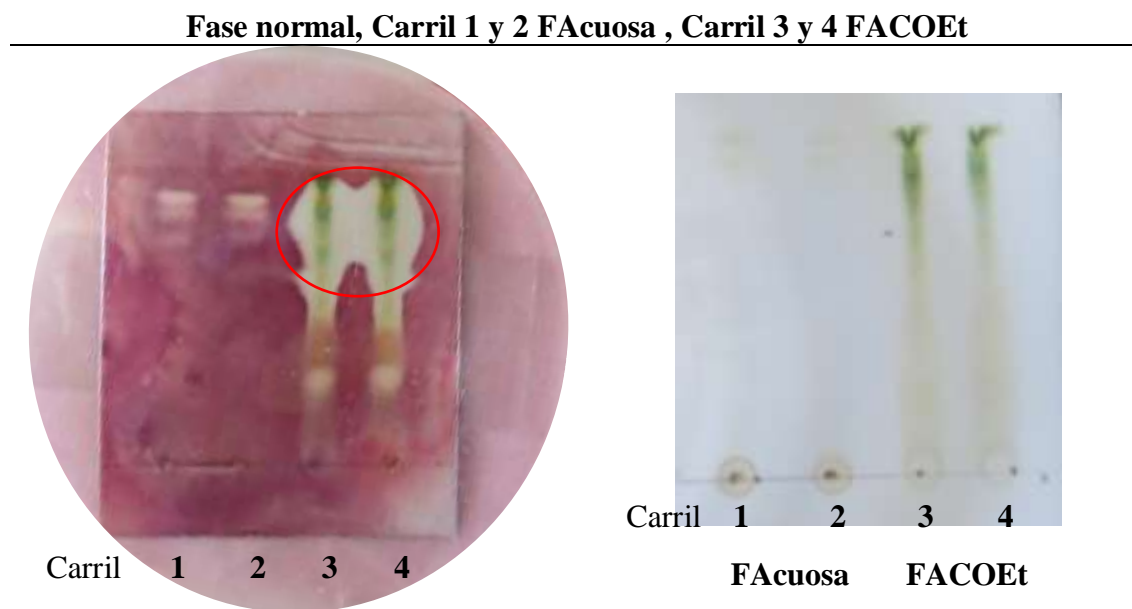


Figura 11. Espectro de UV-Visible de NPs Au empleando diferentes concentraciones de la FACOEt

En la Tabla 4 se observan las pruebas realizadas con ambas fracciones mediante el método de Bioautografía, donde se corrobora que los compuestos de baja y mediana polaridad presentes en la fracción orgánica, son los responsables de la inhibición del crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358) así como de la biosíntesis. En base a los resultados, se procedió con la purificación de la FACOEt.

Tabla 4 Bioautografía en CCF de la FAcuosa y FACOEt



8.3.1 Fraccionamiento químico y purificación de los compuestos activos de la (FACOEt)

El proceso de separación de la FACOEt se llevó a cabo en una CCA de fase normal, empleando el gradiente de mezcla de disolventes Diclorometano: Metanol. En la tabla 5 se observa el resumen del proceso de separación, así como las actividades de biosíntesis y actividad biológica. Se colectaron fracciones de 20 ml, siendo posteriormente concentradas en rotavapor a presión reducida. Mediante Cromatografía en capa fina, se monitoreó la composición química de cada fracción y en base a la similitud entre estas se obtuvieron 18 fracciones. En la figura 12, se muestra el perfil cromatográfico de la FACOEt, observada a 280 nm en HPLC, en donde podemos apreciar la presencia de compuestos mayoritarios a esta longitud de onda, en especial el que tiene un tiempo de retención de 9.68 minutos.

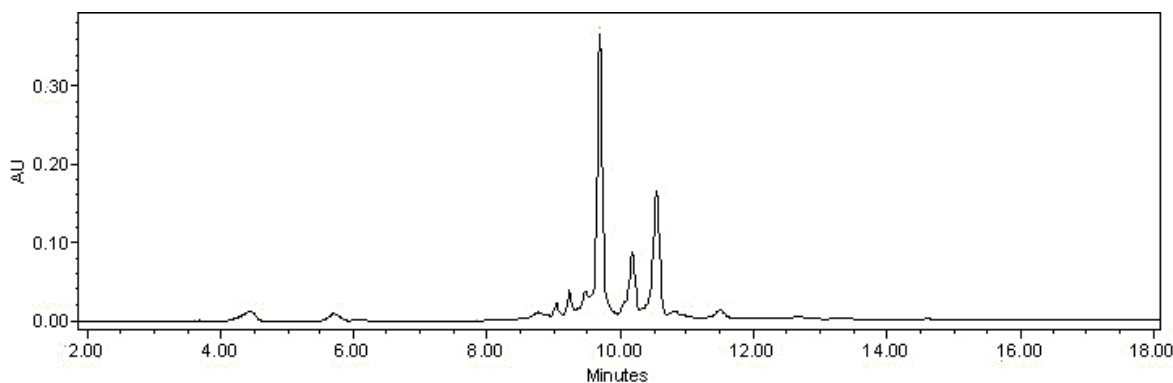


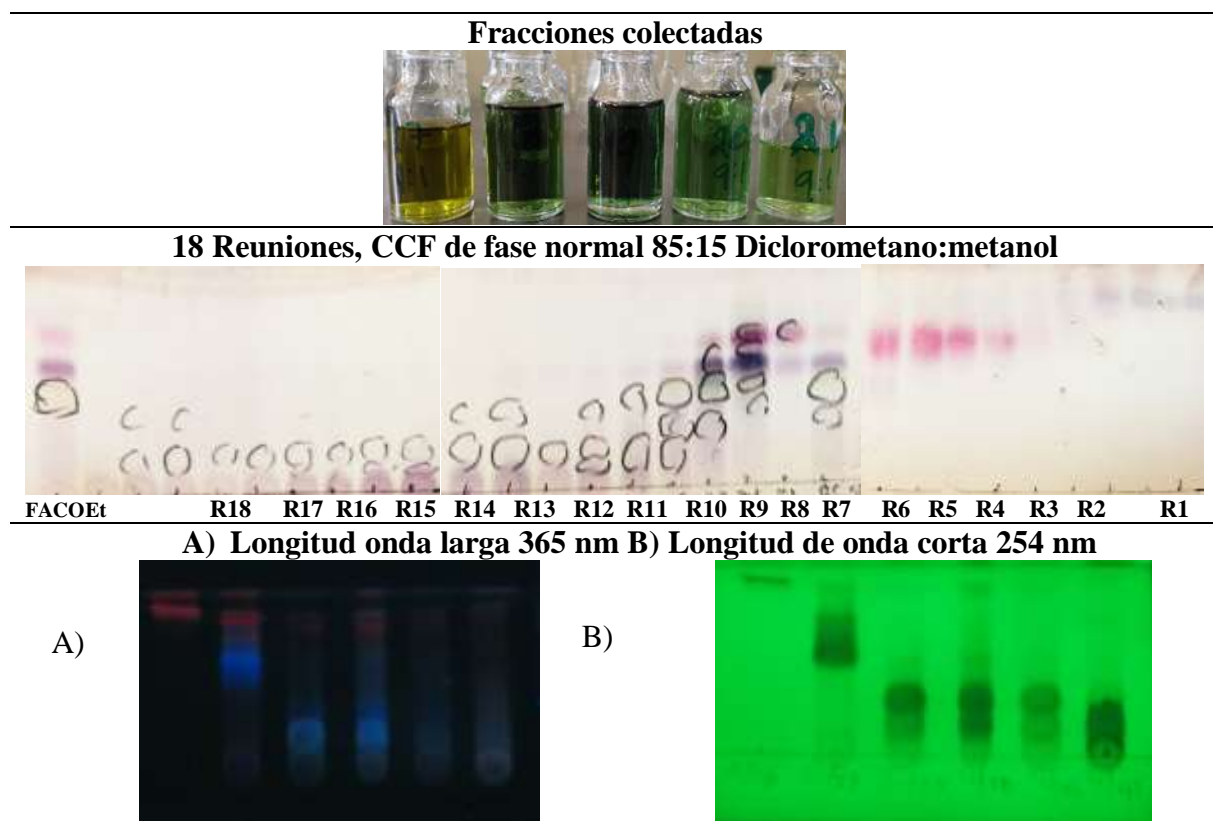
Figura 12 Perfil cromatográfico de la FACOEt a 280 nm

Tabla 5 Proceso de separación química de la FACOEt

Sistema Cl ₂ CH/ MetOH	Fracciones del sistema	Fracciones reunidas	Clave	Actividades y observaciones
100:0	1-7	1-6	BpEHC1R1	NPsAu, Bioautografía
95:5	8-16	7-9	BpEHC1R2	NPsAu, Bioautografía
90:10	17-21	10-13	BpEHC1R3	NPsAu, Bioautografía
85:15	22-26	14	BpEHC1R4	NPsAu, Bioautografía
80:20	27-32	15-16	BpEHC1R5	NPsAu, Bioautografía, CMI
70:30	33-36	17-18	BpEHC1R6	NPsAu, Bioautografía, MIC (activo)
50:50	37-43	19-21	BpEHC1R7	NPsAu, Bioautografía
0:100	44-50	22	BpEHC1R8	NPsAu, Bioautografía
		23-25	BpEHC1R9	NPsAu, Bioautografía
		26-27	BpEHC1R10	NPsAu, Bioautografía, CMI
		28-29	BpEHC1R11	NPsAu, Bioautografía
		30-32	BpEHC1R12	NPsAu, Bioautografía
		33-34	BpEHC1R13	NPsAu, Bioautografía, CMI (activo)
		35-36	BpEHC1R14	NPsAu, Bioautografía, CMI (activo)
		37-38	BpEHC1R15	NPsAu, Bioautografía, CMI (activo)
		39-40	BpEHC1R16	NPsAu, Bioautografía, CMI (activo)
		41-43	BpEHC1R17	NPsAu, Bioautografía, CMI (activo)
		44-49	BpEHC1R18	NPsAu, Bioautografía,

NPsAu: formación de nanopartículas de oro CMI Determinación de la concentración para estas reuniones

Tabla 6 Fracciones colectadas y CCF de Reuniones



En la tabla 6 se observa la CCF de las reuniones, de derecha a izquierda están las reuniones de menor a mayor polaridad, esto de acuerdo al sistema de elución empleado. En la lámpara de UV a longitud de onda larga, se observaron compuestos cromóforos posiblemente del tipo coumarina.

8.3.2 Síntesis de NPsAu empleando reuniones de la Columna 1

A las 18 reuniones se les realizó una dilución de 1mg/ml, para llevar a cabo la reacción de síntesis. En la figura 13 se observan los coloides obtenidos en base a cada reunión, los resultados sugieren que la coloración de sistema coloidal depende en gran medida de la polaridad de los compuestos, hasta la reunión 10 se observan coloraciones moradas y azules, principalmente, dichas reuniones fueron obtenidas en un sistema 80:20 diclorometano:metanol, a partir de estas, conforme se aumentó la cantidad de metanol en el sistema, los compuestos de mediana y alta polaridad dan coloraciones rosadas y rojo rubí, principalmente. Cada muestra fue analizada mediante UV-Visible (Figura 14), sin embargo

únicamente se muestran los coloides más estables después de 5 días, los cuales fueron de las reuniones 14, 15, 16 y 17.

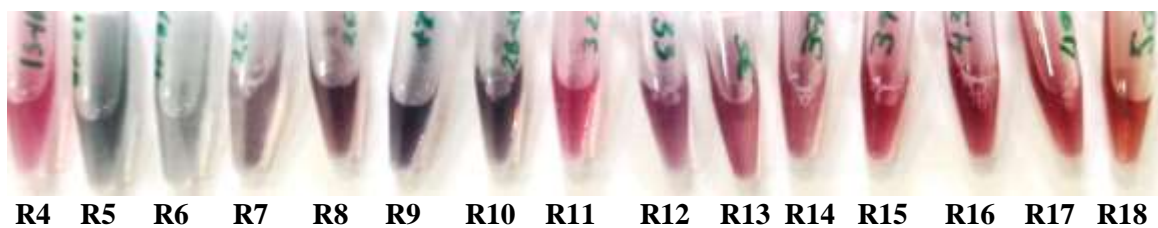


Figura 13 Síntesis de NPsAu empleando las reuniones de la columna 1

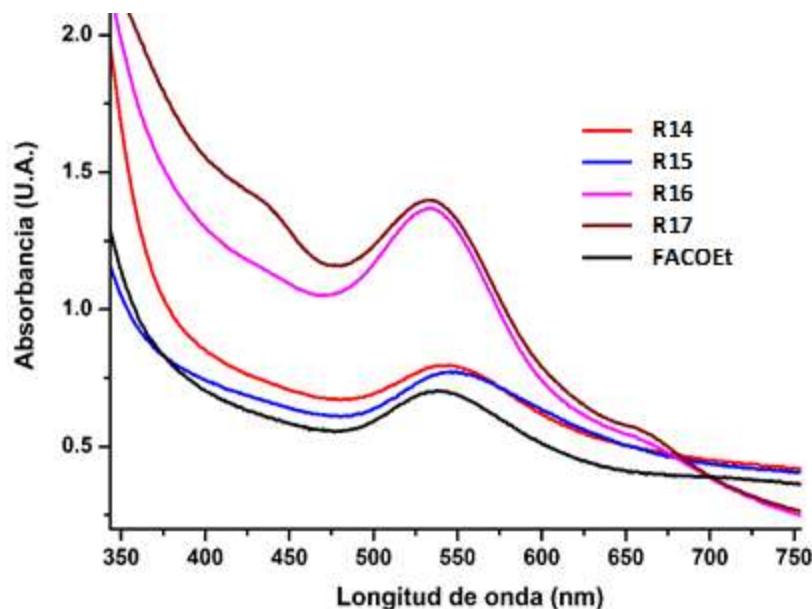


Figura 14 Espectro de UV-Visible de NPsAu de BpEHC1F14-17

En ese sentido, se ha reportado que las NPsAu presentan una banda de absorción en la región visible, la cual va de 500 a 600 nm, esto respecto a la resonancia del plasmón de superficie (RPS), fenómeno propio de las nanopartículas metálicas. Este fenómeno es atribuido a la oscilación colectiva de la conducción libre de electrones, inducida por la interacción del campo electromagnético en las nanopartículas metálicas (Noruzi *et al.*, 2011). En base al cambio de color ya sea rojo o violeta, en el caso de las NPsAu, confirmamos la producción de nanoestructuras. La banda de RPS nos proporciona información acerca del tamaño y forma de las nanopartículas sintetizadas. El aumento en el tamaño de partícula causa el aumento de la longitud de onda máxima (cambio rojo), y la disminución en el tamaño de partícula conduce a la disminución de la longitud de onda máxima (Cambio azul). Estas variaciones en la longitud de onda de la RPS respecto a las variaciones en el tamaño de partícula se ha

sido reportado por diversos autores (Vilchis-Nestor *et al.*; Shen *et al.*, 2011; Noruzi *et al.*, 2012), por otra parte las bandas asimétricas y anchas de la RPS es Indicativo de la formación de nanopartículas anisotrópicas, es decir, presentan diferentes formas e incluso tamaños, lo cual también repercute en su propiedades fisicoquímicas.

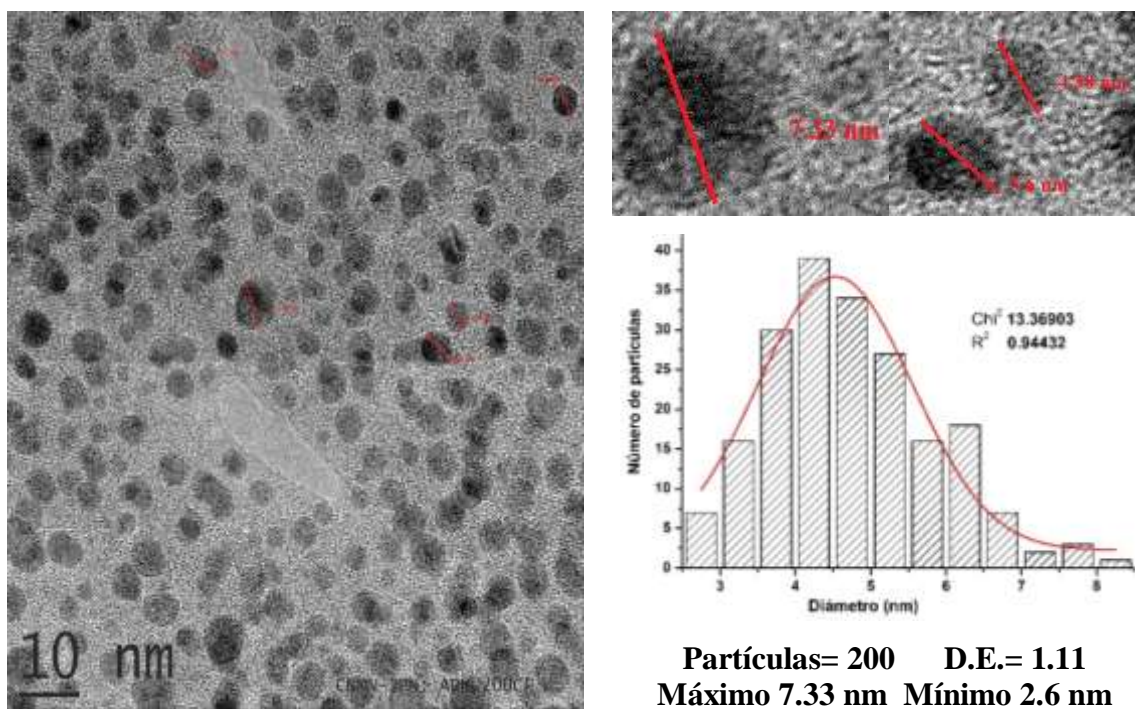


Figura 15 Distribución del diámetro de partícula sintetizada a partir de **BpEHC1R16**

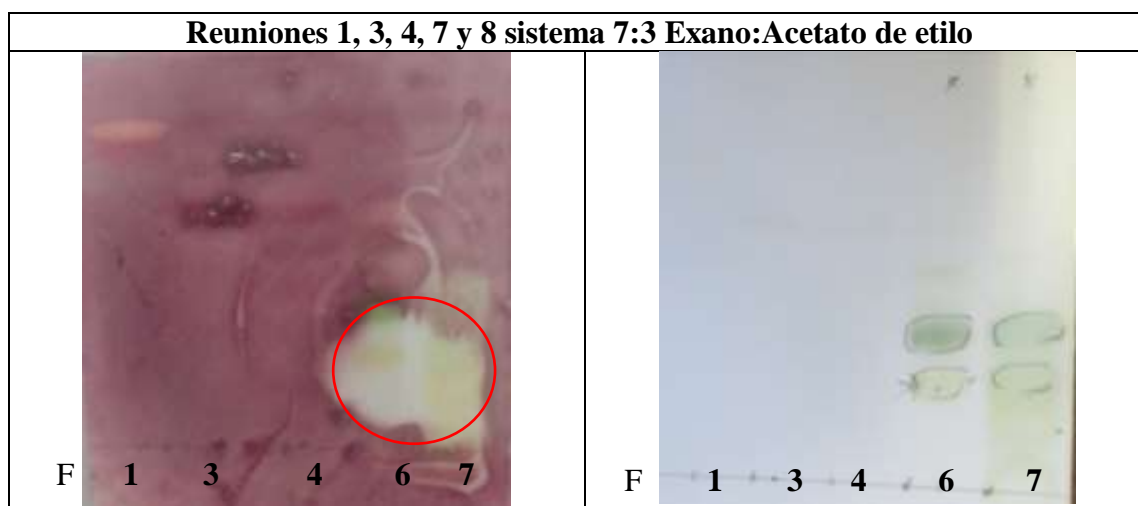
En la figura 15 se observan los resultados obtenidos mediante MET de la síntesis de NPsAu con la reunión C1R16. Se obtuvo partículas cuasi-esféricas con un diámetro promedio de 4.75 nm de una muestra de 200 partículas. El rango de tamaño es de 7.33 como máximo y 2.6 nm como mínimo. La desviación estándar de los tamaños es de 1.11. Babu y colaboradores en el 2013, reportaron tamaños promedio de 5-100 nm, empleando extracto etanólico de la planta *Bacopa monniera*, así también, Mahitha y colaboradores en el mismo año, reportaron tamaños de NPsAu de 15 a 35 nm, empleando la misma planta. Por su parte, Huang *et al.*, reportaron en el 2007 la formación de nanopartículas de oro a partir del extracto metanólico de la planta *Cinnamomun camphora* (partes aéreas), con variación de tamaño y forma. Narayanan y Sakthivel en el 2008 sintetizaron nanopartículas triangulares y dodecaedros, principalmente, con tamaños promedio de 6.7 a 57 nm, empleando el extracto hidroalcohólico de *Coriandrum sativum*. Haciendo la comparación de los resultados

obtenidos por estos autores, con lo reportado en este trabajo, ya sea con el mismo género o con otras especies de plantas, podemos observar la gran diferencia en la distribución de tamaño, así como la morfología, lo cual indica que la síntesis de NPs_{Au} generada a partir de productos semipuros, mejora las características morfológicas de las nanopartículas, lo cual podría deberse a que en un extracto integro como el empleado en las fuentes reportadas, intervienen compuestos de diferente naturaleza, incluso metabolitos primarios. Estos compuestos pueden intervenir en el proceso de síntesis y ocasionar mayor variación del tamaño y forma, a diferencia de emplear compuestos semipuros. Por esta razón se decidió realizar una purificación mayor a esta reunión, dependiendo también de los resultados obtenidos de las pruebas biológicas, las cuales se muestran a continuación.

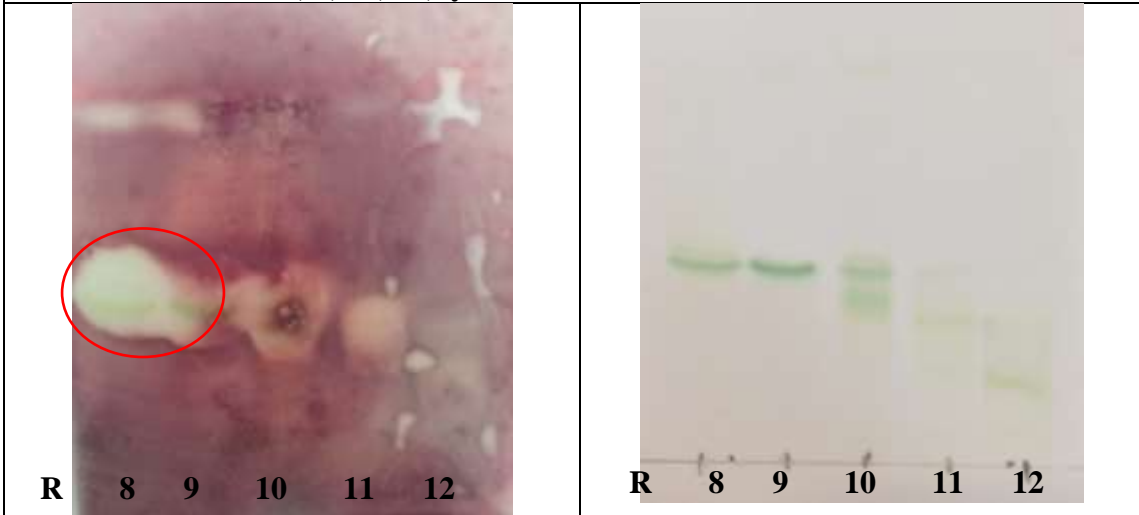
8.3.3 Actividad antimicrobiana por Bioautografía y CMI

Mediante el método de Bioautografía identificamos las reuniones de la BpEHC1 que presentaban mayor actividad biológica, esto en base al halo de inhibición observado. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos. Las reuniones más activas fueron 6, 7, 8, 9, 13, 16 y 17. Mediante el método de dilución en placa, se determinó la CMI de cada reunión activa (Tabla 8). Todas las reuniones fueron activas únicamente para bacterias Gram positivas, las reuniones 16 y 17 presentaron MICs de 150 y 75 µg/ml, respectivamente, para *staphylococcus faecalis* y de 300 µg/ml para *Staphylococcus aureus*. En base a estos resultados y lo obtenido en la biosíntesis, se seleccionaron a las reuniones 16 y 17 para la purificación de los compuestos activos.

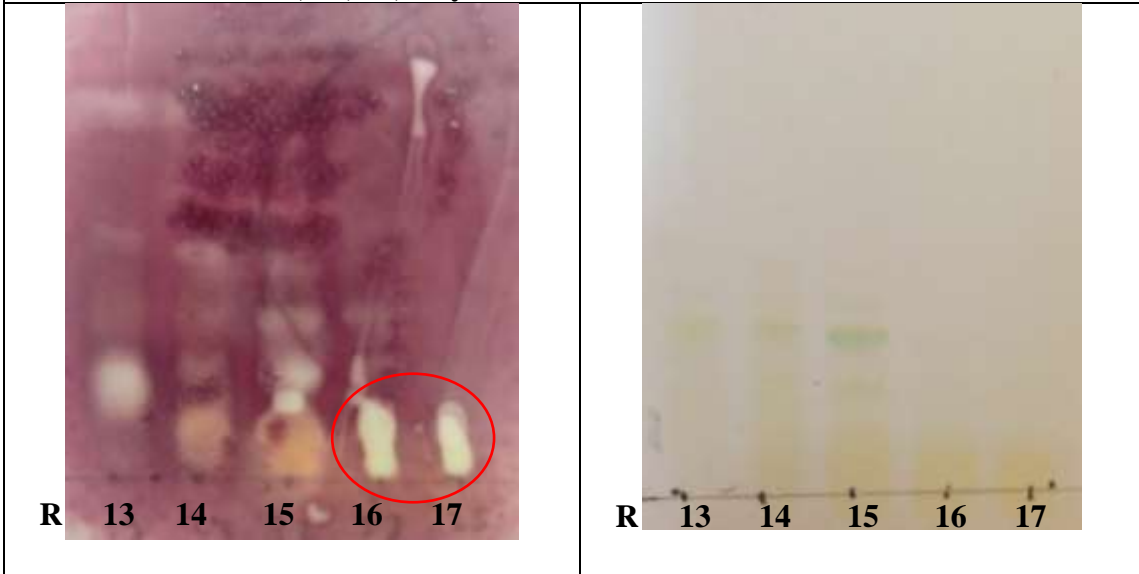
Tabla 7 Bioautografía de las reuniones obtenidas en BpEHC1



Reuniones 8, 9, 10, 11, y 12 sistema 95:5 Diclorometano:Metanol



Reuniones 13, 14, 15, 16 y 17 sistema 90:10 Diclorometano:Metanol



Reuniones 16 y 17 sistema 70:30 Diclorometano:Metanol

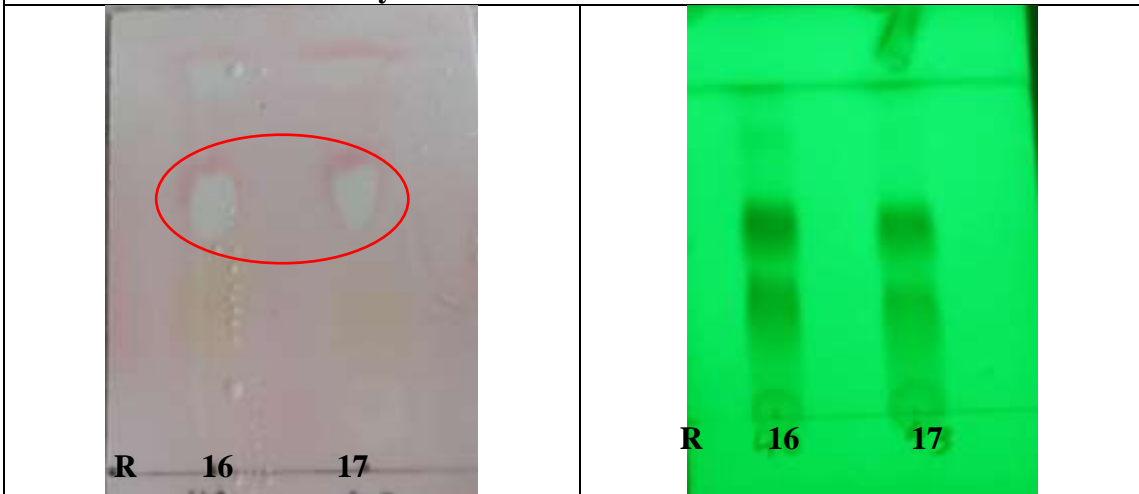


Tabla 8 Concentración mínima inhibitoria de las reuniones activas

Reunión	Actividad antimicrobiana ($\mu\text{g/ml}$)				
	Gram +		Levadura	Gram -	
	<i>S.a.</i>	<i>S.f.</i>	<i>C. a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>P. a.</i>
BpC1R6	>300	>300	>300	>300	>300
BpC1R7	300	300	>300	>300	>300
BpC1R8	>300	150	>300	>300	>300
BpC1R9	>300	>300	>300	>300	>300
BpC1R13	300	150	>300	>300	>300
BpC1R16	300	150	>300	>300	>300
BpC1R17	300	75	>300	>300	>300

8.3.4 Fraccionamiento químico y purificación de los compuestos activos de la (BpC1R16 y BpC1R17)

Mediante CCF de fase reversa, se realizó la comparación de las reuniones BpC1R16 y BpC1R17, en la figura 16 podemos observar la similitud de ambas, por lo que se reunieron para someterlas a un proceso de purificación mayor.

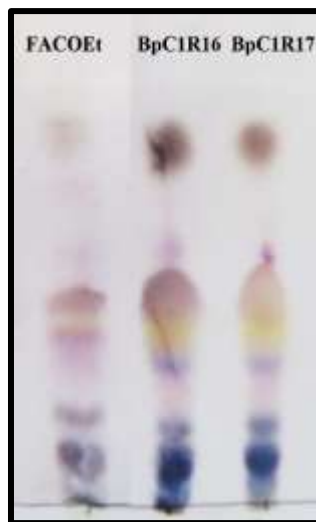


Figura 16 CCF de fase reversa de las reuniones BpC1R16 y BpC1R17

De la mezcla de ambas reuniones se obtuvo un total de 700 mg. Para el proceso de purificación, se absorbió la muestra en 1 g de sílica de fase reversa. Se montó una CCA en un gradiente Agua:Acetonitrilo y se colectaron fracciones de 15 ml aproximadamente. En la tabla 9, se muestra el resumen del proceso de purificación. A cada fracción con rótulos BpEHC2Fn se les realizaron pruebas de síntesis, así como actividad antimicrobiana (CMI) por el método de micro dilución en placa de 96 pozos.

Tabla 9 Proceso de separación química de la mezcla de BpC1R16 y BpC1R17

Sistema H₂O/ ACN	Fracciones del sistema	Fracciones reunidas	Clave	Actividades
100:0	1-5	1-3	BpEHC2F1	
95:5	6-10	4-6	BpEHC2F5	NPsAu, CMI
90:10	11-15	7	BpEHC2F7	
85:15	16-24	8-9	BpEHC2F8	
80:20	25-36	10-15	BpEHC2F10	
70:30	37-41	16	BpEHC2F16	
50:50	41-45	17-18	BpEHC2F17	NPsAu, CMI
0:100	46-50	19-20	BpEHC2F19	
MetOH	51	21	BpEHC2F21	
		22-24	BpEHC2F23	NPsAu, CMI
		25	BpEHC2F25	
		26-28	BpEHC2F26	
		29	BpEHC2F29	
		30-31	BpEHC2F31	NPsAu, CMI
		32-33	BpEHC2F32	
		34-36	BpEHC2F34	
		37	BpEHC2F37	NPsAu, CMI
		38	BpEHC2F38	,
		39-40	BpEHC2F39	NPsAu, CMI
		41-50	BpEHC2F41	

NPsAu: formación de nanopartículas de oro

En la figura 17 se observa el resumen cromatográfico en capa fina de los compuestos aislados. Se obtuvieron 6 compuestos con diferente factor de retención. En la figura 18 se muestra el perfil cromatográfico mediante HPLC a 280 nm de 3 compuestos. El compuesto 1 tiene un factor de retención en HPLC de 4.38 minutos, seguido del compuesto mayoritario 2 con un tiempo de 9.68 minutos y por último el compuesto 3, el cual es una mezcla de dos compuestos con tiempos de retención de 10.46 y 10.53 minutos. En comparación con el perfil

cromatográfico de la FACOEt, observamos que los picos corresponden a los compuestos aislados.

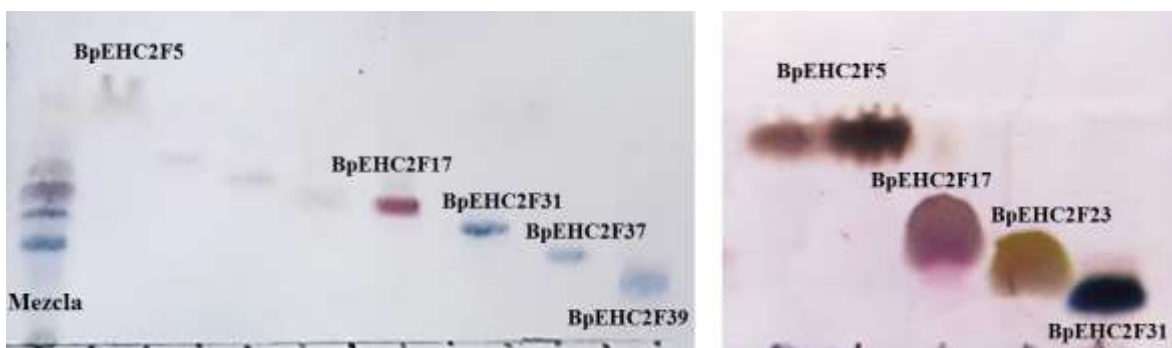


Figura 17 CCF en fase reversa de seis compuestos aislados de la BpEHC2Fn

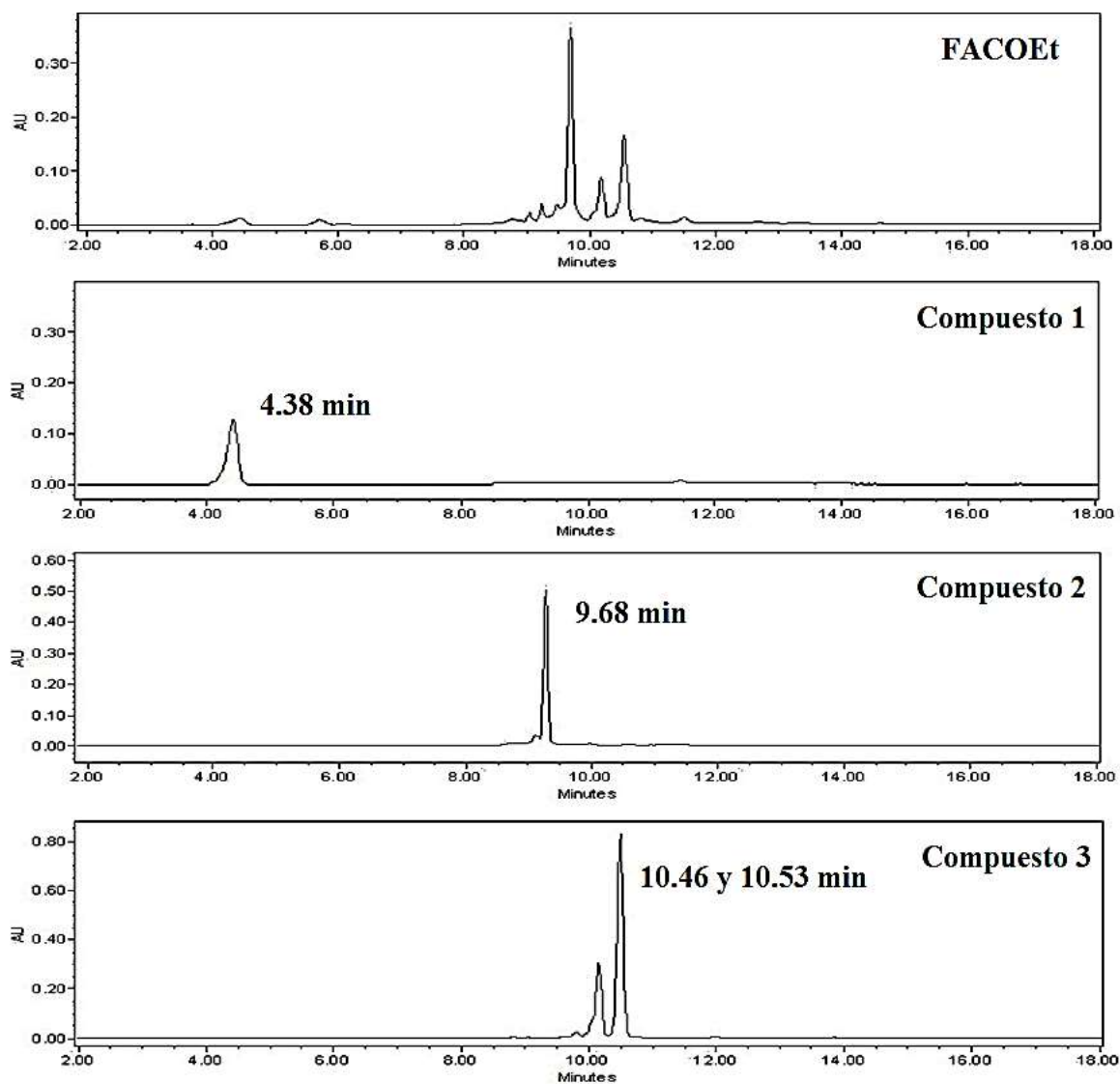


Figura 18 Perfiles cromatográficos a 280 nm de la FACOEt y compuestos aislados

8.3.5 Identificación química de los compuestos aislados y su actividad antimicrobiana

La fracción **BpEHC1F5** es un sólido cristalino con forma de agujas, en CCF de fase reversa tienen un factor de retención de 0.9 al eluir con un sistema 6:4 Agua:Acetonitrilo y revela de color café con 4-hidroxibenzaldehído. En el anexo 1 se muestran los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C correspondientes a este compuesto. En la tabla 10 se observan los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C (δ), así como las constantes de acoplamiento de cada ^1H .

Tabla 10 Valores de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C (δ) del compuesto 1

POSICION	^1H (δ)	^{13}C (δ) Exp	^{13}C (δ) Teórico
p-hidroxibenzoilo			
1	-	153.84	152.30
2	6.96 (<i>d</i> , J=8.85 Hz)	116.61	115.40
3	6.69 (<i>d</i> , J=8.85 Hz)	119.36	117.60
4	-	152.39	150.10
5	6.69 (<i>d</i> , J=8.85 Hz)	119.36	117.60
6	6.96 (<i>d</i> , J=8.85 Hz)	116.61	115.40
Glucosa			
1'	4.91 (<i>d</i> , J= 7.63 Hz)	103.63	101.06
2'	3.42 (<i>dd</i> , J= 7.63, 8.84 Hz)	74.96	73.97
3'	3.38-3.39 (m)	77.98	76.59
4'	3.43-3.44 (m)	71.42	70.50
5'	3.37-3.38 (m)	78.02	76.79
6a'	3.88 (<i>dd</i> , 1.53, 11.90 Hz)	62.54	62.2
6b'	3.70 (<i>dd</i> , 1.53, 11.90 Hz)		

En base a lo reportado por Pathak *et al.*, se realizó la comparación con los compuestos aislados por estos autores y observamos que el compuesto 1 o BpEHC1F5 corresponde a la Arbutina. La Arbutina o 4-hydroxyphenyl β -d-glucopyranoside es un glucósido fenólico, estructurado de una molécula para-hidroxifenólico o hidroquinona, el cual a su vez tiene unida una molécula de glucosa en el carbono 1 (figura 19). Su fórmula molecular es $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$ y su peso molecular de 272.25 g.

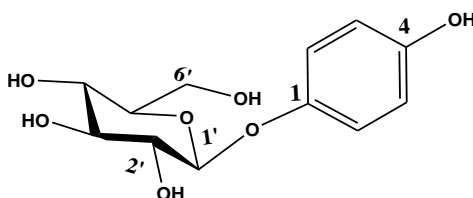


Figura 19 Estructura química de la Arbutina

El espectro de FT-IR de la Arbutina (figura 20) consiste en la absorción de bandas predominantes de grupos hidroxilo –OH de estiramiento en 3373 cm^{-1} , de núcleos de aromáticos C-C (1406 , 1461 y 1516 cm^{-1}) y de enlaces C-O de estiramiento (1019 y 1215 cm^{-1}). El espectro de absorción en el UV-Visible del compuesto (figura 21), muestra dos bandas características de enlaces dobles en 221.6 y 282.8 nm , datos que concuerdan con lo reportado por Prabhu *et al.*, 2011 y Yun Li *et al.*, 2016 para este compuesto. Por su parte, el espectro de masas corrobora el peso molecular del compuesto con el ion molecular en 272.06 m/z (Anexo 2).

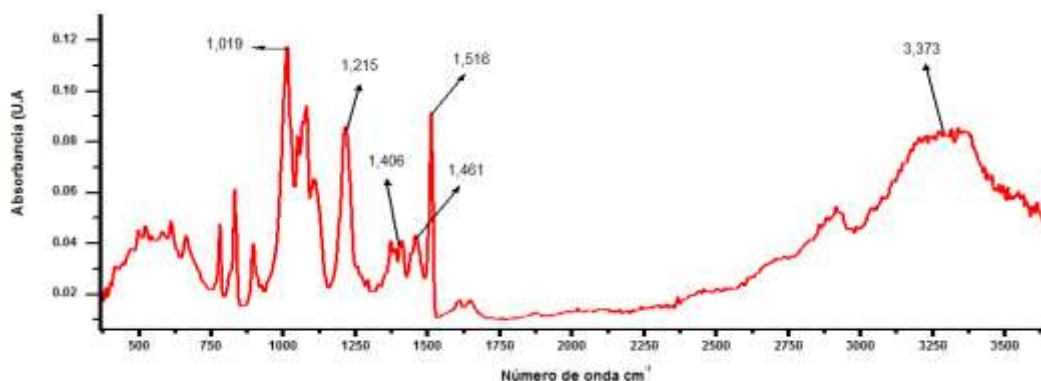


Figura 20 Espectro FT-IR de la Arbutina

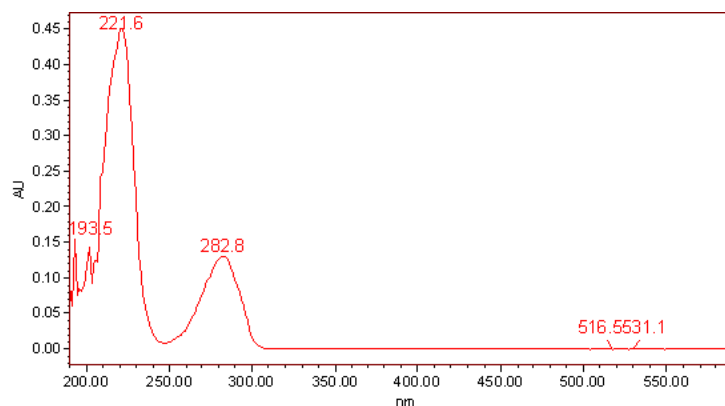


Figura 21 Espectro de absorción en el UV-Visible de la Arbutina

La arbutina es un inhibidor común en la biosíntesis de la melanina, usado principalmente como agente aclarador de piel en la industria cosmética. Fue aislado por primera vez de hojas de *Arctostaphylos uva-ursi*; Ericaceae (Macbeth y Mackay, 1923). En los últimos años, se ha registrado un gran número de productos naturales derivados de Arbutina, aislados en más de 100 plantas. Los derivados de Arbutina constituyen uno de los grupos más importantes y diversos en estructura. En ese sentido, estos derivados han sido reportados con diversas

propiedades biológicas como antioxidantes, antimicrobianas, antimalárico y citotóxico, principalmente (Xu *et al.*, 2015). En base a su conformación química, se han agrupado en 3 grupos; 1-Derivados de Arbutina acilados. 1.1 Arbutinas~hidroxi-cinamoilos 1.2 Benzoilarbutinas 1.3 Galoilarbutinas 1.4 otras arbutinas aciladas, 2 Derivadas de Arbutina no aciladas, 3 Homoarbutinas y isohomoarbutinas 3.1 Homoarbutinas y 3.2 Isohomoarbutinas.

La Fracción **BpEHC2F17** es un semisólido de tipo resina con coloración amarilla. En cromatografía en capa fina de fase reversa, el compuesto tiene un FR de 0.7 al eluir en un sistema 6:4 Agua:Acetonitrilo y revela de color rosa con 4-hidroxibenzaldehido. El punto de fusión del compuesto es de 86-88 °C.

En el espectro de absorción en el UV-Visible se observan dos bandas en 216.9 y 128.0, los cuales corresponden a enlaces dobles conjugados y anillos aromáticos (Figura 22). Referente al espectro de FT-IR en la figura 23, las señales predominantes son de grupos hidroxilo –OH de estiramiento en 3258 cm^{-1} , de núcleos de aromáticos C-C (1514 cm^{-1} y 1610), también de grupos carboxilo C=O (1693 cm^{-1}) y de C-O de estiramiento en 1066 y 1162 cm^{-1} .

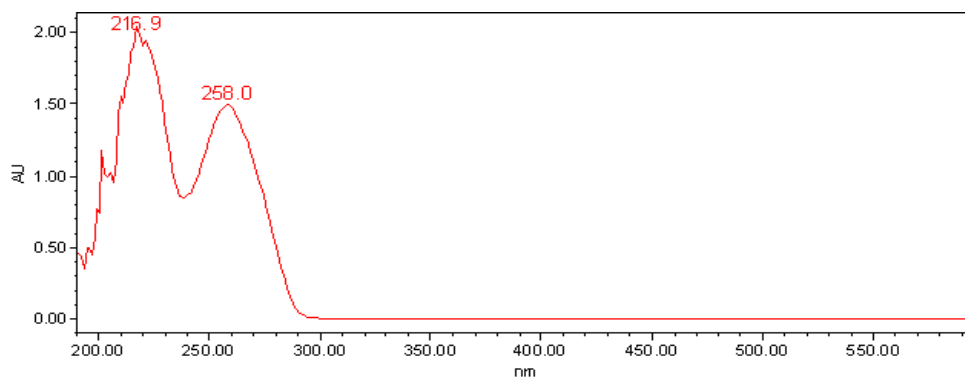


Figura 22 Espectro de absorción en el UV-Visible de la Arbutina

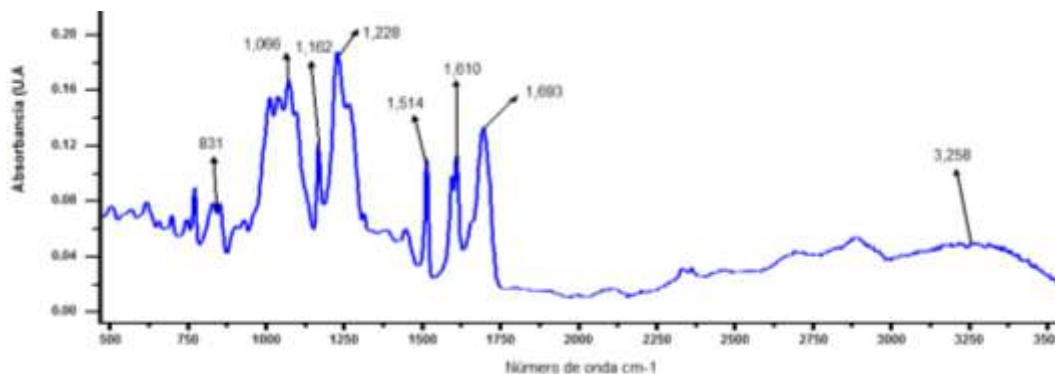


Figura 23 Espectro FT-IR de BpEHC2F17

El análisis de RMN ^{13}C del compuesto acetilado (Anexo 3) indicó la presencia de un carbono anomérico correspondiente a una molécula de azúcar en δ 98.86. El experimento de HSQC indicó que el protón que correspondiente a este carbono se encuentra ubicado en un desplazamiento químico de 5.085 ($\text{H}1'$, d , $J= 7.45$ Hz) (figura 24).

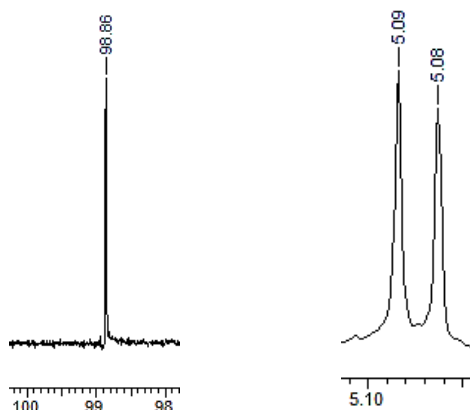


Figura 24 Expansión de la región de carbono y protón anomérico del espectro de RMN ^{13}C y ^1H (600 MHz, CDCl_3 , acetilado)

Para determinar la identidad del azúcar, se analizó el experimento de correlación homonuclear en dos dimensiones ^1H - ^1H COSY (Anexo 4), en donde se observó la conectividad secuencial del hidrógeno anomérico (Figura 25).

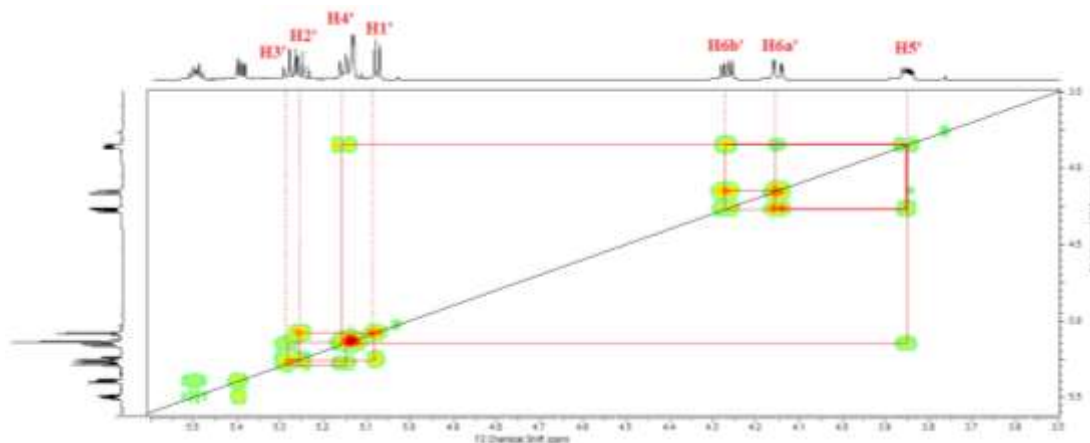
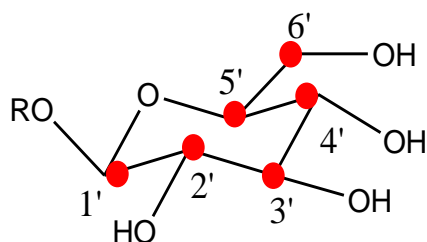


Figura 25 Correlaciones ^1H - ^1H COSY de la ciclohexosa

El análisis comenzó con el hidrógeno anomérico localizado en δ 5.085 ($\text{H}1'$, d , $J= 7.45$ Hz), el cual muestra una correlación con una señal doble de doble, centrada en δ 5.26 con constantes de acoplamiento de 7.8 y 9.5 Hz, asignada a $\text{H}2'$, este hidrógeno a su vez, muestra correlación con una señal doble de doble centrada en δ 5.29, con constantes de acoplamiento

de 9.5 y 9.5 Hz, asignada a H3'. La correlación de esta señal con el doble de doble ubicado en δ 5.16, ($J= 7.4$ y 9.9 Hz) permitió identificar el H-4' que a su vez correlaciona con H-5 cuya señal ddd se localiza δ 3.86 ($J= 2.4, 5.3$ y 7.8 Hz). Por último, este hidrógeno muestra correlación con dos señales doble de doble centradas en δ 4.16 y δ 4.27, con constantes de acoplamiento de 2.4, 12.0 Hz y 5.3, 12.4 Hz, para H6a' y H6b', respectivamente. Estas conectividades, así como la multiplicidad y constantes de acoplamiento observadas para estas señales, indican una interacción *trans* diaxial en todos los protones indicando que el azúcar corresponde a la glucopiranososa.



Para corroborar la secuencia de acoplamientos del experimento COSY, analizamos el espectro de correlación total homonuclear (TOCSY, Anexo 5, Figura 26) ya que con este análisis se pueden identificar todos los protones de los carbonos que están formando el ciclo del azúcar. El protón anomérico H1' en δ 5.085 (*d*, $J= 7.45$ Hz), presentó correlación con H5', H6a', H6b' H4' H2' y H3' en δ 3.86, δ 4.16, δ 4.27, δ 5.16, δ 5.26 y δ 5.29, respectivamente.

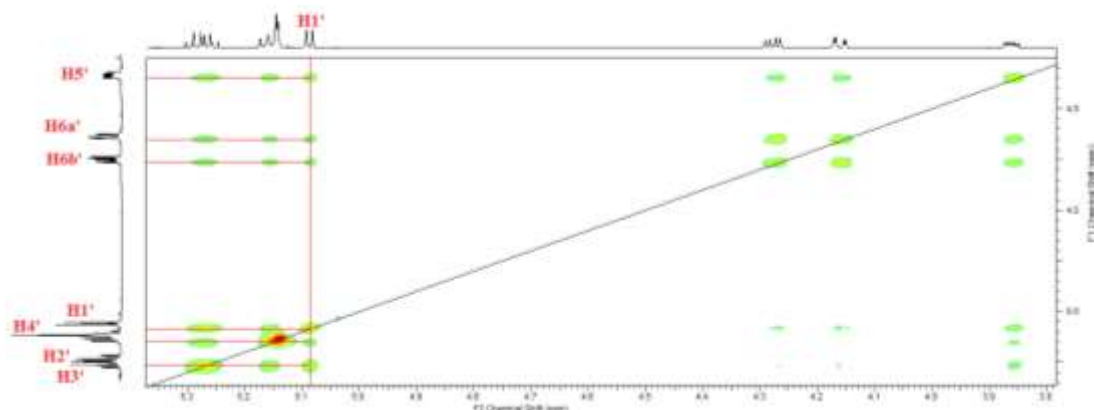
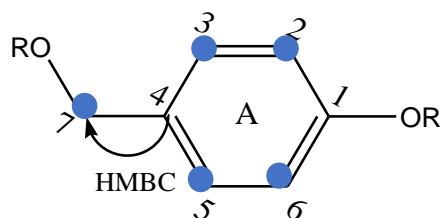


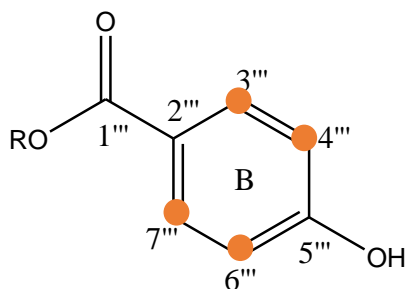
Figura 26 Expansión en la región δ 3.8 a 5.4 del experimento TOCSY

Siguiendo con el análisis de RMN ^{13}C y ^1H del compuesto acetilado, se identificó la presencia de dos anillos aromáticos sustituidos en posición *para* (C-4; sistemas AB). La asignación de todas las señales correspondientes al anillo A (Figura 27) fue determinada mediante el

análisis de los experimentos de RMN ^1H y ^{13}C así como de los experimentos de HSQC y HMBC. Las señales de carbono ubicadas en δ 130.12 y δ 116.96 presentaron correlación heteronuclear a una ligadura con los protones localizados en 7.31 (*d*, $J=8.8$, H3, H5) y δ 6.98 ($J=8.8$; H-3, H-5) respectivamente (Figura 26). La asignación del C-5 fue determinada por la correlación heteronuclear a tres ligaduras entre H-3 y H-5 con el carbono cuaternario ubicado en 130.12 ppm. De forma similar se asignó el C-1 de este anillo mediante la correlación a tres ligaduras de los protones H-2 y H6 con el carbono cuaternario situado en 156.87 ppm. Adicionalmente, se observó una correlación a tres ligaduras entre el carbono cuaternario C-4 con una señal singulete que integra para dos protones ($\text{CH}_2\text{-O}$) ubicada en 5.15 ppm. Toda esta información permitió proponer un fragmento de alcohol *p*-hidroxibencil también denominado gastrodigenina.



Para llevar a cabo la asignación de las señales correspondientes al segundo anillo (Anillo B), se encontró en el experimento HSQC la correlación entre las señales de ^{13}C del metino ubicado en δ 131.24 con la señal *doblete* centrada en 8.0; (*d*, $J=8.5$ Hz; 2H; H3''', H7''') así como del metino localizado en δ 121.76 con la señal *doblete* centrada en δ 7.17 ($d= 8.5$ Hz; 2H; H4''', H6'''). También en este caso se realizó la asignación del C-5''' mediante la correlación a tres ligaduras observada entre los protones H3''', H7''' con el carbono cuaternario situado en 154.6. La correlación observada entre los protones H3''', H7''' con una señal característica de un carbonilo de tipo éster (164.1 ppm), indicó corresponde a un fragmento de tipo *p*-hidroxibenzoilo.



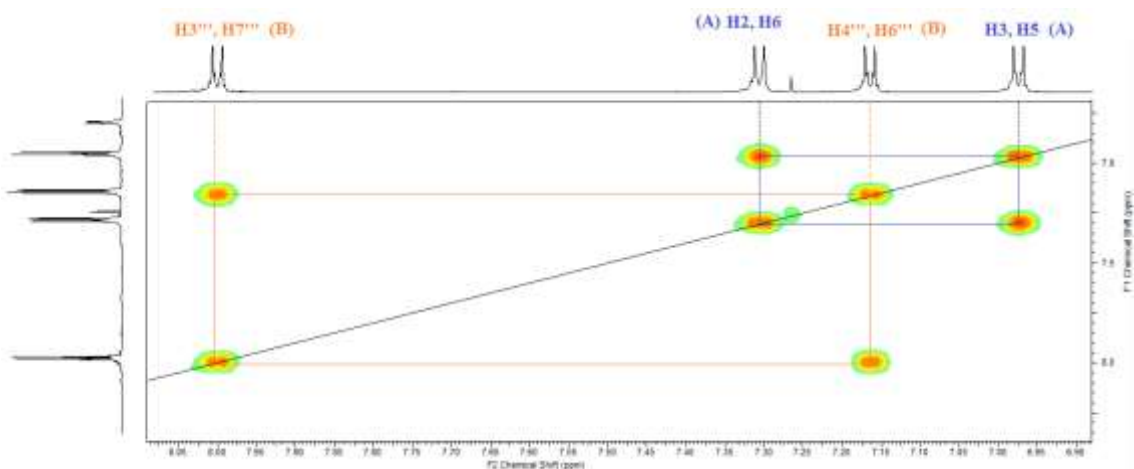


Figura 27 Correlaciones 1H-1H COSY de los anillos aromáticos A y B

Además de la presencia de estos dos anillos aromáticos, también se observó una señal doble característica de los hidrógenos vinílicos de un alqueno centrada en δ 6.82 con una $J=4.26$ que presenta correlación heteronuclear a una ligadura (HSQC) con el carbono ubicado en δ 132.69. En el experimento TOCSY (Figura 28) se observó que este protón vinílico forma parte de un ciclohexeno constituido por cuatro metinos (δ 5.4, δ 5.50, δ 5.79 y δ 6.82) y un metileno (δ 2.54, δ 3.08).

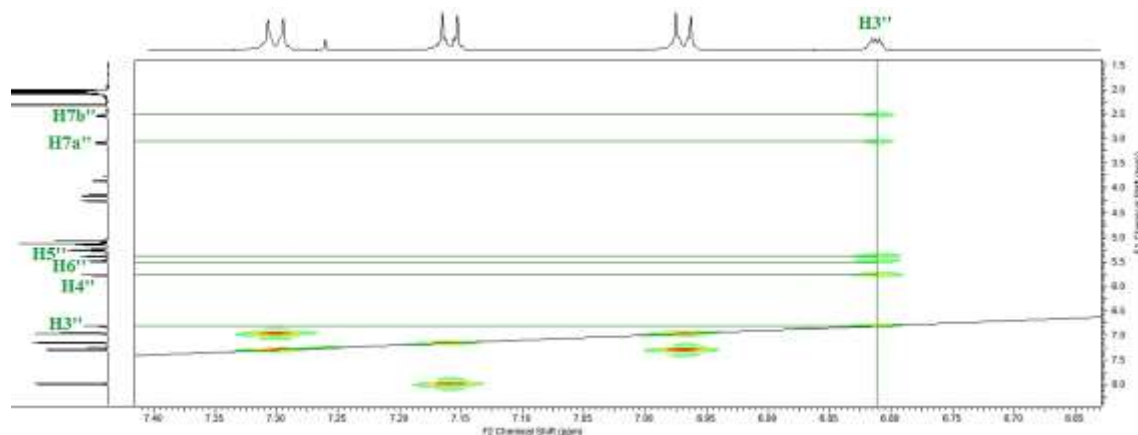


Figura 28 Expansión en la región δ 6.75 a 7.4 del experimento TOCSY

El experimento COSY permitió seguir la numeración de todos los protones de este ciclohexeno ya que el metino vinílico δ 6.82 (asignado a H3'') presentó una correlación vecinal con la señal doble de doble en δ 5.79 (1H, $J=4.2, 4.2$ Hz) asignada a H-4''. Este metino base de oxígeno correlaciona con otra señal doble de doble, centrada en δ 5.4 (H5''), con constantes de acoplamiento de 4.2 y 8.5 Hz (δ 68.08), así mismo, este hidrógeno

correlaciona con una señal doble de doble de doble, centrada en δ 5.50 (H6'') con constantes de acoplamiento de 6.03, 6.03 y 8.5 Hz, (δ 71.65), finalmente, este hidrogeno presenta correlación con dos señales doble de dobles centradas en δ 3.08 y δ 2.54, con constantes de acoplamiento de 5.6,18.82 Hz y 6.3,18.8 Hz, para H7a'' y H7b'' (δ 29.02), respectivamente (Figura 29).

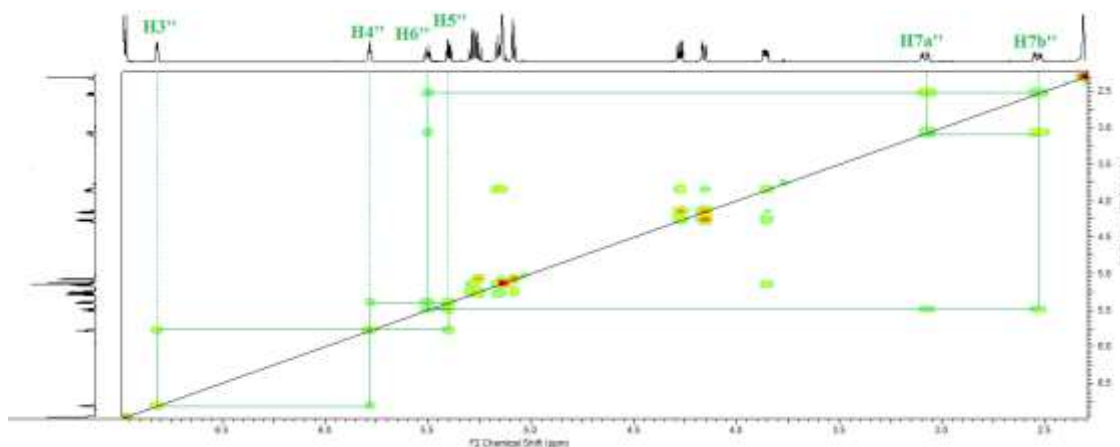


Figura 29 Correlaciones 1H-1H COSY del tetragalato

La orientación de los metinos dentro del ciclo fue determinada mediante las constantes de acoplamiento de cada protón y de la interacción encontrada a través del espacio en el experimento NOESY de H-5'' en δ 5.4 con H-7b'' en δ 2.54 y con H-4'' en δ 5.79 confirmando que los protones H4'' y H5 se encuentran en posición ecuatorial (Figura 30). Además, se observó que H3'' en δ 6.82 (*d*, J = 4.26 Hz), tiene correlación con H7b'', H7a'', H5'' H6'' H4'' y H3'' en δ 2.54, δ 3.08, δ 5.4, δ 5.50, δ 5.79 y δ 6.82, respectivamente. Este análisis permitió concluir que este anillo corresponde a un esqueleto ciclohexeno de tipo tetrahidrogalato (Figura 31).

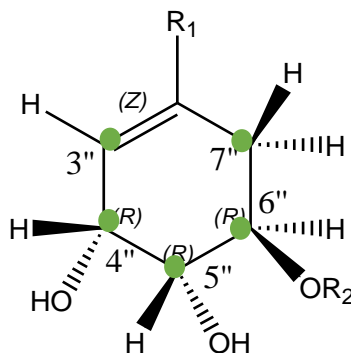


Figura 30 Orientación ecuatorial de los metinos del C4'' y C5''

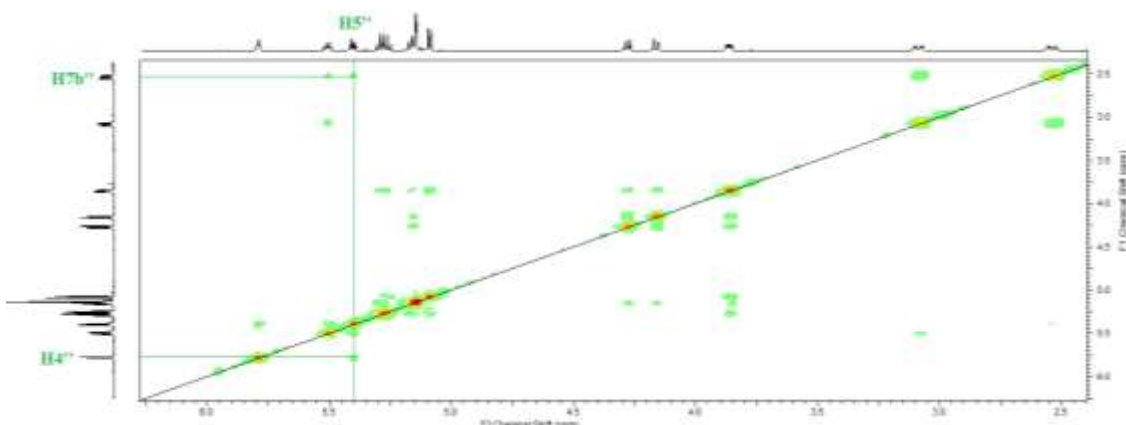


Figura 31 Interacción NOESY de H5'' con H-4'' y H-7b''

Para la determinación de la conectividad entre estos sistemas cíclicos, se utilizó el análisis del experimento HMBC en donde se observó una correlación entre el protón anomérico H-1' δ 5.085 (*d*, $J=7.45$ Hz) de la glucopiranos, (Figura 32 y 33) con la señal en δ 156.87 del carbono cuaternario del alcohol benzoil (C-1).

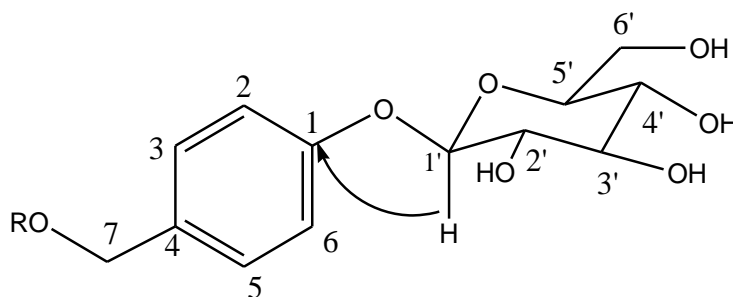


Figura 32 Conexión de la glucosa con el esqueleto gastrodigenina generando una unidad de gastrodina

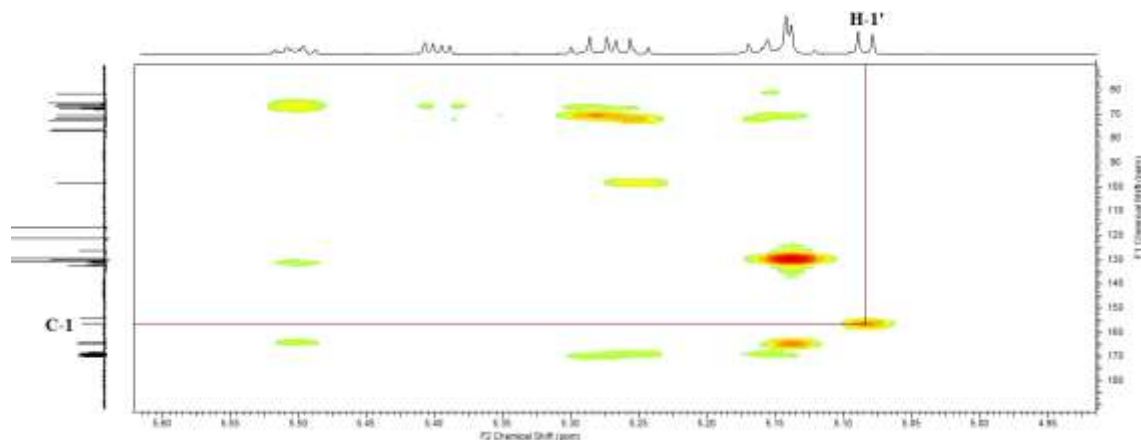


Figura 33 Correlación en el espectro HMBC de H-1 con C-1

La conexión es esta unidad de gastrodina con el esqueleto de tipo tetrahidrogallato fue determinada mediante la correlación a tres ligaduras del metileno H-7a y H7b (δ 5.15, s) con el carbono cuaternario C-1'' ubicado en δ 165.01 (carbonilo del anillo tetrahidrogallato) (Figura 34).

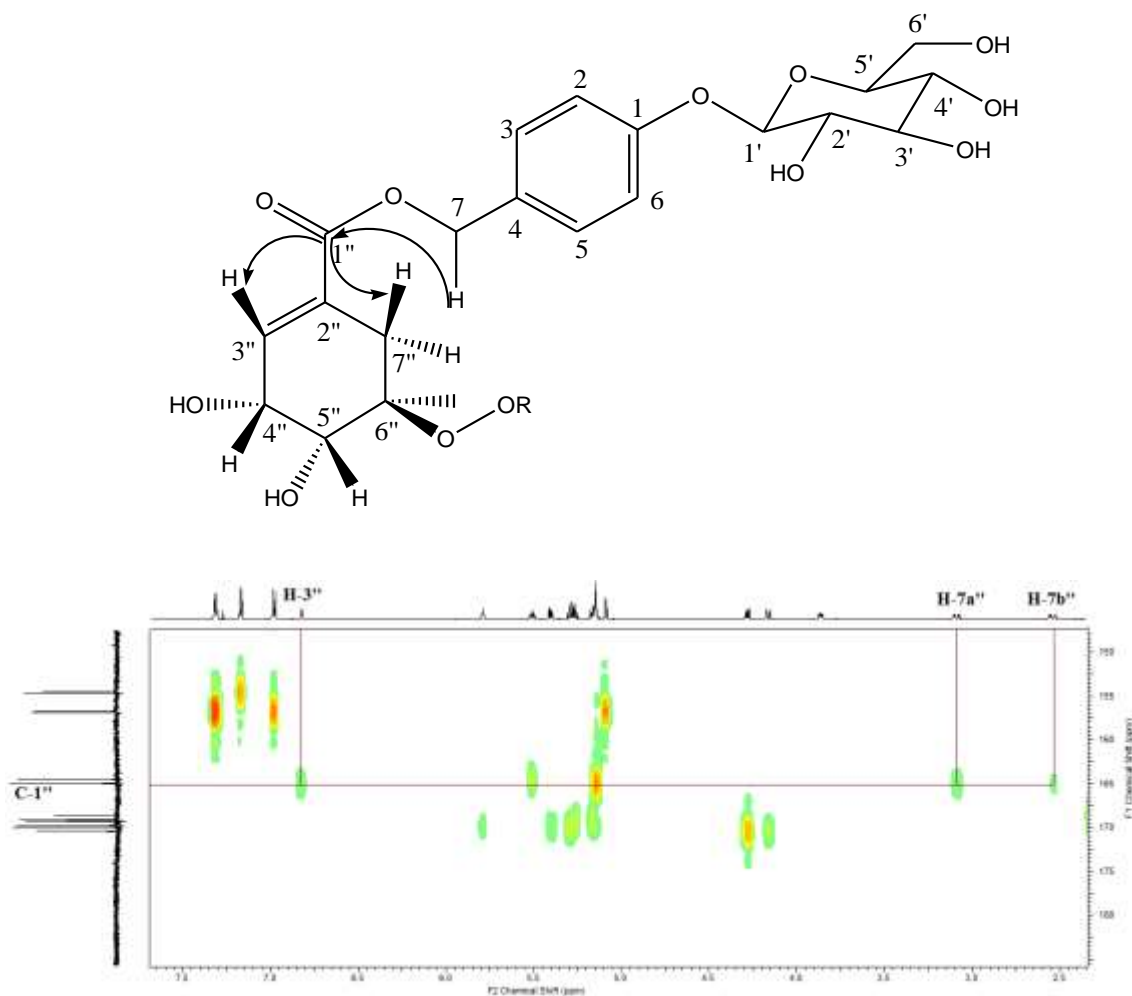


Figura 34 Correlación en el espectro HMBC de C-1'' con H-7a'', H-7b'' y H-3''

Finalmente, la molécula descrita como anillo B fue situada en la posición C-6 del tetrahidrogallato debido a la correlación observada entre H-3''' δ 8.0 (*d*, $J = 8.5$) con la señal de carbonilo (C-1''') en δ 164.6 (Figura 35).

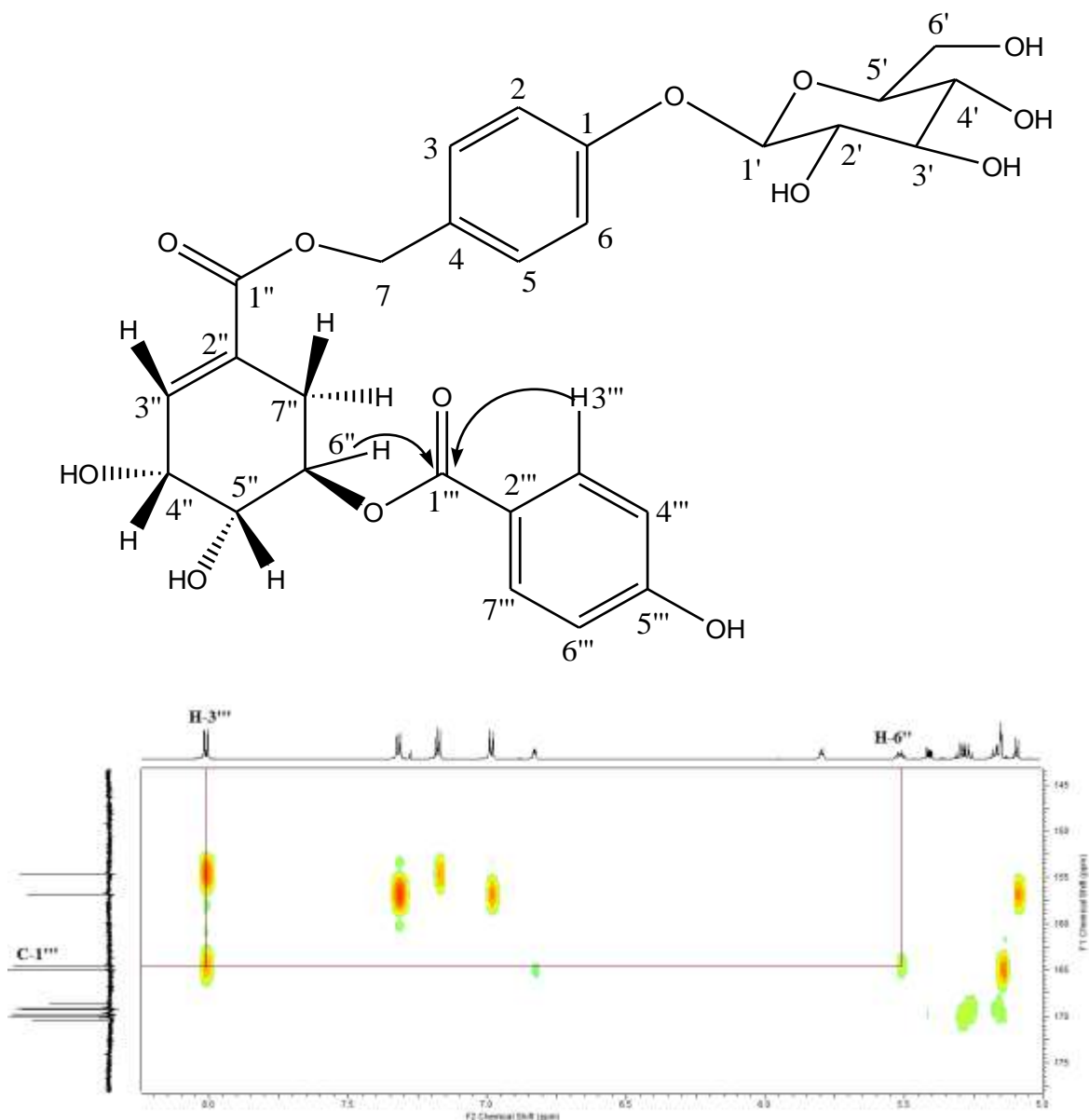


Figura 35 Correlación en el espectro HMBC de C-1'' con H-3''' y H-6''

En la tabla 11 se muestran los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C del compuesto BpEHC1F17 acetilado. De esta manera la fórmula molecular del compuesto descrito es $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$, con un peso molecular de 562.51 g, mismo que se corrobora con el análisis de espectrometría de masas, en donde se observa el ion molecular en 562.22 m/z (Anexo 7). En base a los análisis espectroscópicos realizados, así como a la evidencia de RMN de ^1H y ^{13}C , corroboramos la obtención de un compuesto no reportado en la literatura química, derivado de gastrodina, al cual denominamos Procumgastrodina A.

Tabla 11 Valores de desplazamiento químico de ^1H y ^{13}C de BpEHC1F17 acetilado

POSICIÓN	^1H (δ)	^{13}C (δ) Teórico	^{13}C (δ) Exp
Gastrodigenina			
1	-	157	156.87
2	7.31, d, J= 8.8	131.10	130.12
3	6.98, d, J=8.8	114.08	116.96
4	-	126.9	130.35
5	6.98, d, J= 8.8	114.08	116.96
6	7.31, d, J= 8.8	131.0	130.12
7	5.15, s	66.68	66.46
Glucosa			
1'	5.08, d, J= 7.45	100.2	98.86
2'	5.26, dd, J=7.8, 9.5	73.7	71.07
3'	5.29, dd, J= 9.5, 9.5	76.8	72.62
4'	5.16, dd, J= 7.4, 9.9	69.7	68.19
5'	3.86, ddd, J= 2.4, 5.3, 7.8	77	76.79
6a'	4.16, dd, J= 2.4, 12	60.60	61.86
6b'	4.27, dd, J= 5.3, 12.4		
Tetrahidrogálato			
1''	-	163.45	165.01
2''	-	126.5	129.98
3''	6.82, d, J= 4.26	133.9	132.69
4''	5.79, dd, J= 4.2, 4.2	63.97	65.8
5''	5.4, dd, J= 4.2, 8.5	73.83	68.08
6''	5.50, ddd, J= 6.03, 6.03, 8.5	66.17	71.65
7a''	3.08, dd, J=5.6, 18.8	30.06	29.02
7b''	2.54, dd, J=6.3, 18.8		
p-hidroxibenzoilo			
1'''	-	165.70	164.6
2'''	-	120.6	126.84
3'''	8.0, d, J= 8.5	132.08	131.24
4'''	7.17, d, J= 8.8	116.00	121.76
5'''	-	161.50	154.63
6'''	7.17, d, J=8.8	116.00	121.76
7'''	8.0, d, J= 8.5	132.08	131.24

Siguiendo con la identificación química de los compuestos aislados, la mezcla de dos compuestos denotada como **BpEHC2F23** se obtuvo como un semisólido con características similares a la ProcumGastrodina, esto en cuanto al color y consistencia, sin embargo su RF en CCF de fase reversa es de 0.6 en el mismo sistema de elución. Revela de color amarillo con el 4-Hidroxibenzaldehído.

El análisis espectroscópico de UV-Visible muestra bandas en 313 y 223 nm para el compuesto 3 (A) y para el compuesto 3 (B) bandas en 310 y 222 nm, mismos que corresponden a dobles enlaces en anillos aromáticos y conjugados (Figura 36). Respecto al análisis de FT-IR se observa una banda a 2880 cm^{-1} , el cual corresponde al alargamiento del enlace C-H posiblemente de aldehído. También se observa una banda intensa a 1694 cm^{-1} provocada por el estiramiento del grupo carbonilo. En 3341 cm^{-1} la banda corresponde al alargamiento del enlace O-H del grupo carboxílico. Por otra parte entre $1000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ aparecen una serie de bandas que dependen del grado de sustitución del anillo aromático y de la posición relativa de los sustituyentes de dicho anillo (Figura 37).

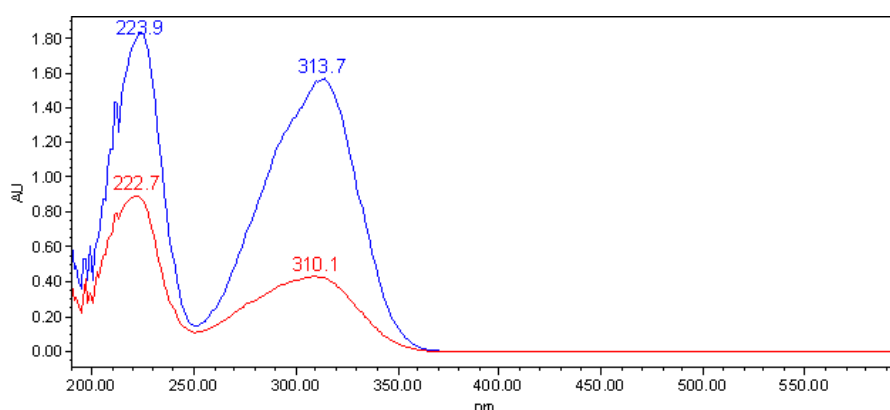


Figura 36 Espectro de absorción en el UV-Visible de **BpEHC2F23**

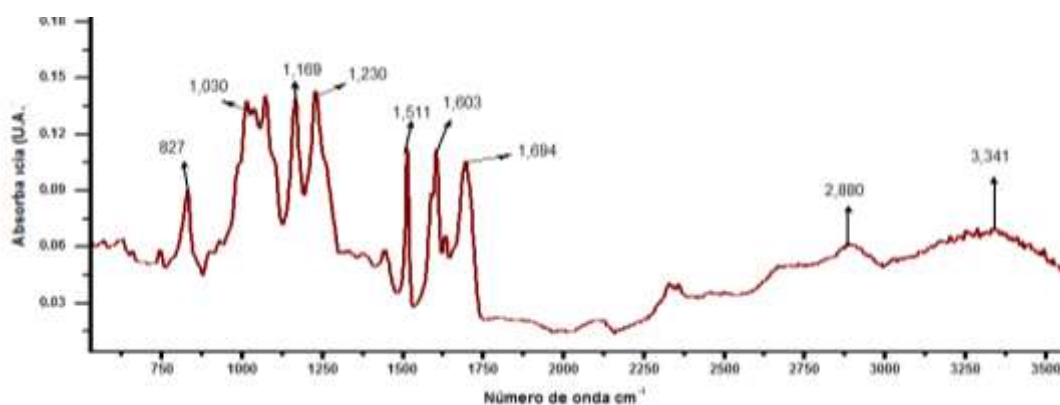


Figura 37 Espectro FT-IR de **BpEHC2F23**

El análisis de RMN ^{13}C y ^1H de la mezcla **BpEHC2F23** en comparación con los espectros del **BpEHC2F17** (producto natural), muestra diferencias marcadas en algunas señales. En principio corroboramos la presencia en la estructura de la Gastrodina unida al Tetrahidrogalato, señales que se describieron anteriormente. En RMN de ^1H (Anexo 9) se

observaron cuatro señales dobles, la primera centrada en δ 5.78, *d*, con $J= 13.0$ Hz, la segunda centrada en δ 6.89, *d*, con $J= 13.0$ Hz, la tercera centrada en δ 6.34, *d*, con $J= 16.0$ Hz y la cuarta señal centrada en δ 7.63, *d*, con $J= 16.0$ Hz. En base a esto, se propone que las señales corresponden a compuestos derivados de ácido cinámico, en especial al *cis*-Ácido cumárico y *trans*-Ácido cumárico, este último se encuentra en mayor proporción en la mezcla (Figura 38).

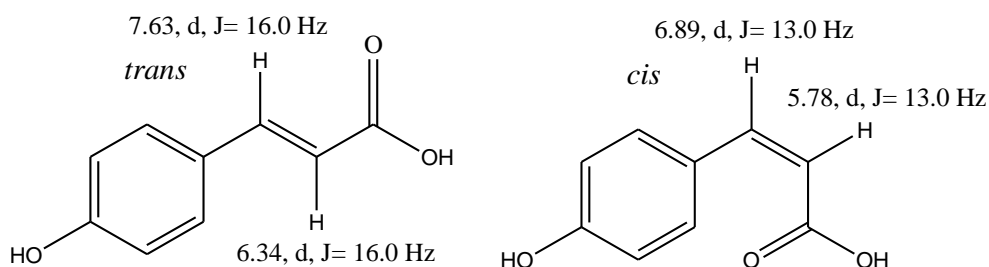


Figura 38 Estructura del *trans*-Ácido cumárico y *cis*-Ácido cumárico

En ese sentido proponemos dos nuevas moléculas, las cuales denominamos ProcumGastrodina B (*trans*) y ProcumGastrodina C (*cis*), mostradas en la figura 39.

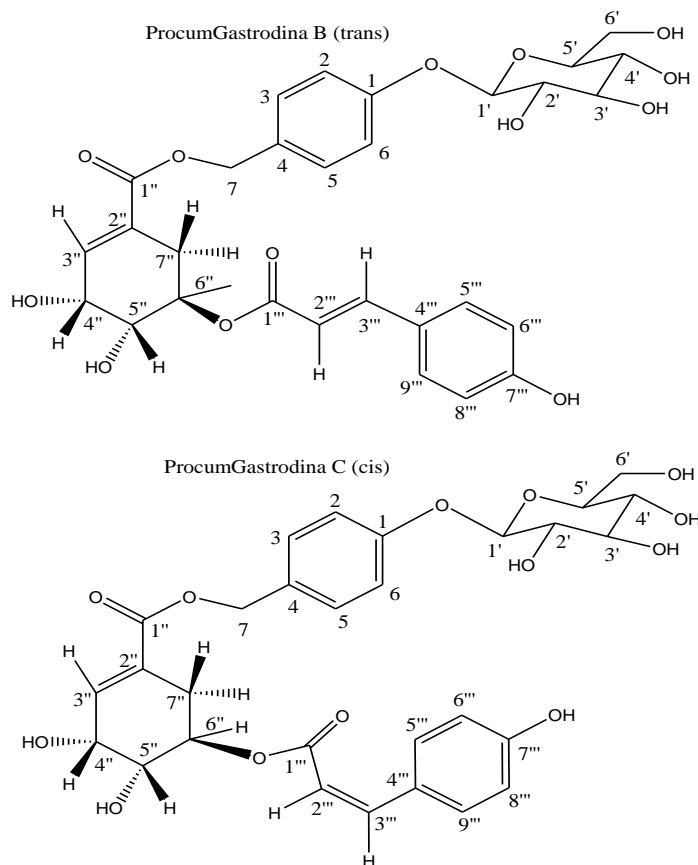


Figura 39 Estructura química de los compuestos ProcumGastrodina B (*trans*) y ProcumGastrodina C (*cis*)

Por último el compuesto **BpEHC2F37** se obtuvo como polvo de coloración blanca, al ser concentrado a presión reducida se observó la generación de espuma. En CCF de fase reversa al eluir en un sistema 6:4 Agua:Acetonitrilo tiene un Rf de 0.4. Revela de color azul con 4-Hidroxibenzaldehído.

El intervalo de absorción del análisis FT-IR fue de 3500 cm^{-1} a 770 cm^{-1} (figura 40). Se observa una banda ancha en 3376 cm^{-1} correspondiente al grupo hidroxilo (-OH). Se observa también una banda de estiramiento C-H alifático a 2936 cm^{-1} , por lo tanto, se muestran picos alrededor de $1236 - 1024\text{ cm}^{-1}$ debidos a la presencia del grupo O - CH. La señal en 2363 cm^{-1} corresponde a ácidos carboxílicos. Un pico agudo a 1704 cm^{-1} indica la presencia del grupo (C = C) en el compuesto aislado.

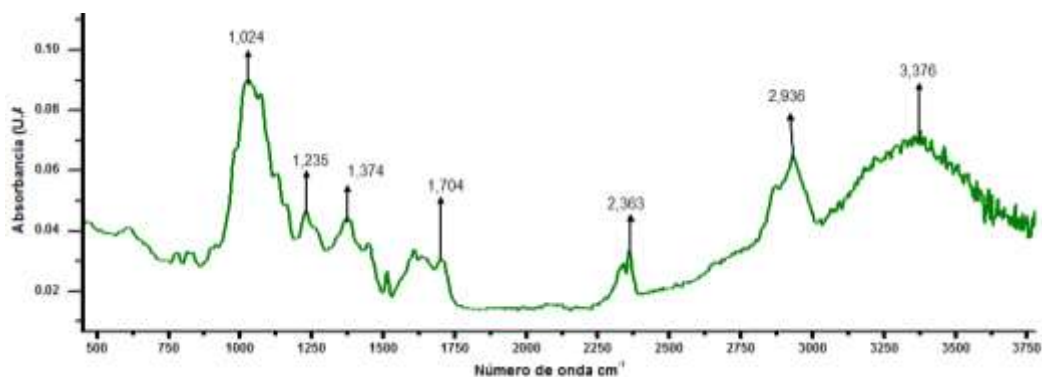


Figura 40 Espectro FT-IR de **BpEHC2F37**

El análisis de RMN ^{13}C y ^1H (Anexo 10) de este compuesto **BpEHC2F37**, se observan tres señales de carbono anomérico en δ 90.72, 102.20 y 104.95 (Figura 41), asociados a azúcares como glucosa, ramnosa, xilosa etc. Los ^1H anoméricos asociados a cada carbón están desplazados a δ 4.95, 4.53 y 4.11, señales dobles con diferente constante de acoplamiento.

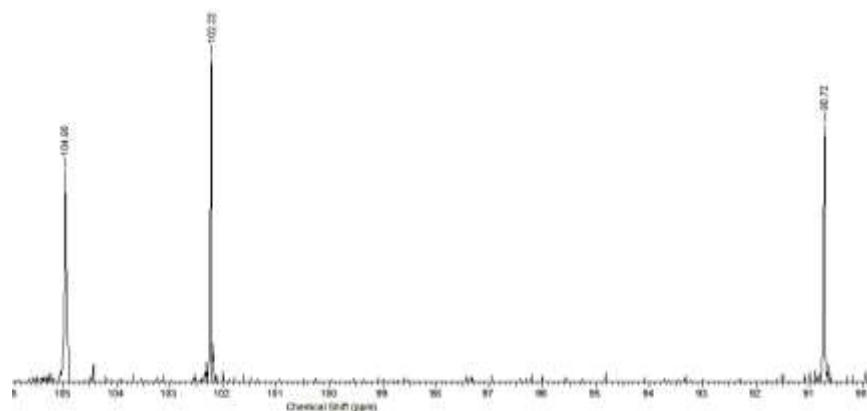


Figura 41 Expansión de la región de protón anomérico del espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3)

En base a lo anterior, se propone que el compuesto corresponde a una saponina triterpénica, sin embargo faltaría realizar los demás análisis para proponer la estructura.

Actividad antimicrobiana de cada compuesto

Los resultados en cuanto a la actividad antimicrobiana se muestran en la tabla 12 y figura 42, en donde podemos observar que la mayor inhibición fue para bacterias Gram positivas, en especial para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Staphylococcus sciuri* ATCC 29213. La actividad de cada compuesto difiere respecto a la bacteria, sin embargo, los compuestos denominados ProcumGastrodina A, B y C presentaron la mayor inhibición respecto a los otros. La CMI de estos últimos es de 50 µg/ml para bacterias Gram + y de 150 µg/ml para Gram -. Estos resultados concuerdan con lo reportado por diferentes autores para moléculas derivados de Arbutina y Gastrodina, las cuales son de gran importancia biomédica.

Tabla 12 Porcentajes de inhibición de crecimiento de las bacterias Gram + y Gram -

Compuesto	Porcentaje de inhibición para cada bacteria									
	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %	6 %	7 %	8 %	9 %	10 %
BpEHC2F5	71.67	39.71	73.72	59.13	68.43	53.72	45.55	44.92	51.52	39.60
BpEHC2F17	69.60	43.92	80.15	60.57	74.59	53.40	43.45	48.70	47.28	37.72
BpEHC2F23	79.30	39.25	74.42	60.57	69.98	51.69	43.45	46.28	44.31	36.31
BpEHC2F31	71.76	45.32	76.11	59.49	71.26	50.29	43.45	44.88	70.39	38.09
BpEHC2F37	69.83	34.11	73.70	57.34	77.68	73.44	45.44	50.00	48.66	45.73
BpEHC2F39	68.60	28.97	67.83	44.80	67.24	55.10	42.51	48.98	45.72	46.74

Numero Bacteria

- | | |
|-----------|--|
| 1 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 |
| 2 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 |
| 3 | <i>Staphylococcus sciuri</i> ATCC 29213 |
| 4 | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 |
| 5 | <i>Enterococcus caseofluvialis</i> ATCC 700327 |
| 6 | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 |
| 7 | <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853 |
| 8 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 |
| 9 | <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 700323 |
| 10 | <i>Salmonella dublin</i> ATCC 9676 |

Compuesto	Nombre o tipo de compuesto
BpEHC2F5 (1)	Arbutina
BpEHC2F17 (2)	ProcumGastrodina A
BpEHC2F23 (3)	ProcumGastrodina B y C

BpEHC2F31 (4) Cumarina
 BpEHC2F37 (5) Saponina triterpénica
 BpEHC2F39 (6) Saponina triterpénica

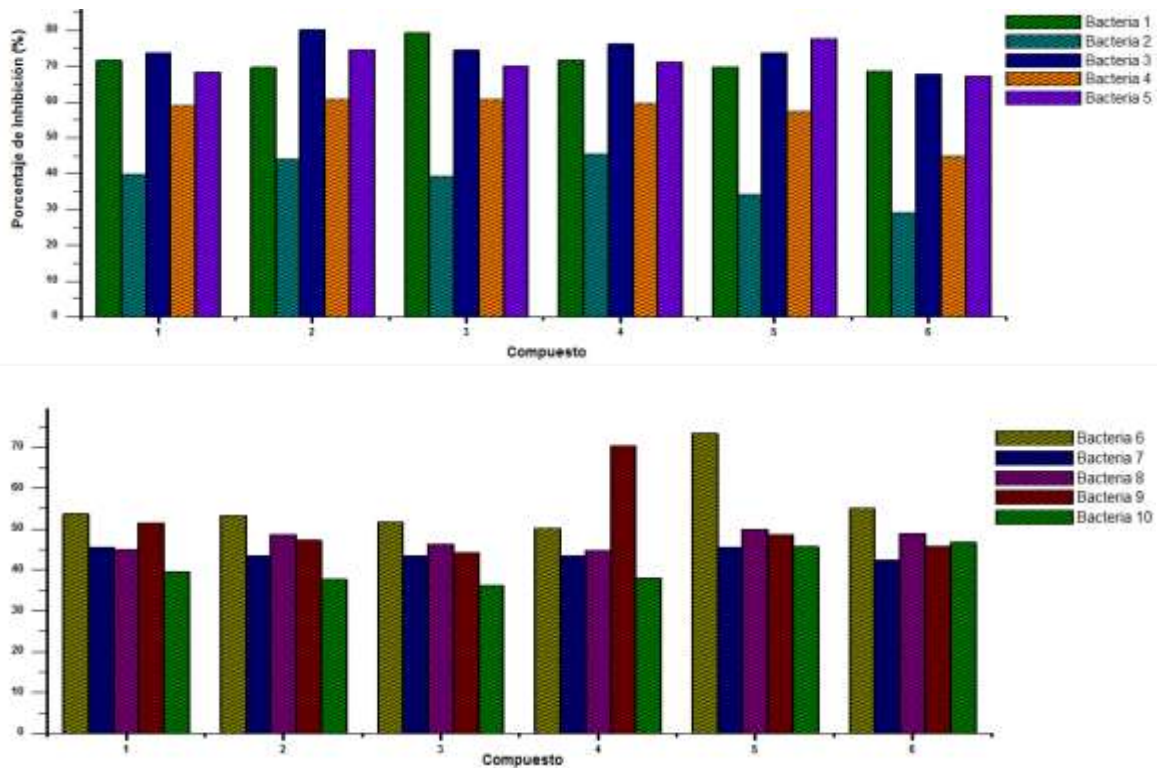


Figura 42 Gráficas de los porcentajes de inhibición de 5 bacterias Gram + y 5 Gram -

8.3.6 Importancia biológica de los productos naturales aislados

Arbutina y sus derivados

La actividad antioxidante ha sido descrita ampliamente para este tipo de compuestos. En el año 2000 Masuda *et al.*, fraccionaron rizomas de *Alpinia speciosa* (Zingiberaceae), lo cual condujo al aislamiento del 4-hidroxi-3-metoxifenil-4-O-feruloil- β -D-glucopiranosido, compuestos que presentó mayor actividad antioxidante que la epicatequina. Así también, siete derivados de Arbutina no acilados, aislados del trigo (*Triticum Aestivum*, Poaceae), mostraron actividades antioxidantes entre 0.8 y 1.76 en unidades TEAC (capacidad antioxidante equivalente al trolox) (Zhokhov *et al.*, 2009). En cuanto a la actividad antimicrobiana, derivados de Arbutina aislados de *Toronia toru* (Proteaceae) en un fraccionamiento biodirigido, mostraron actividad antibacteriana de amplio espectro contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y actividad antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* (MacLeod *et al.*, 1997). El Pirolasido B aislado de la planta

Protea rotundifolia (Proteaceae), mostró actividades significativas contra dos organismos Gram positivos, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*, con valores de CMI de 35 y 20.5 μM , respectivamente (Chang y Inui, 2005). En cuanto a la actividad citotóxica reportada, los derivados 4'-O-[(E)-*p*-coumaroilo] arbutina, 4'-O- [(E)-cafeoil] arbutina y 4'-O-[(E)-feruloilo] arbutina, aislados de la *Casearia multinervosa* (Flacourtiaceae), mostraron efecto citotóxico frente a la línea celular de leucemia linfática P388 en ratones, con valores de CL50 de 543.0, 179.0 y 464.0 μM (Ashik *et al.*, 2006). Hasta el 2015 se han descrito 170 derivados de Arbutina, siendo uno de los grupos más importantes y variados en cuanto a la estructura, por ello las diversas actividades biológicas que presentan.

Gastrodina y derivados

El glucósido Gastrodin o Gastrodina, es un componente principal extraído de la planta *Gastrodia elata* Bl, es bien conocido con funciones antioxidantes y antiinflamatorias. Durante mucho tiempo se ha utilizado clínicamente para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. En su trabajo Dai *et al.*, 2011, investigaron los posibles mecanismos por el cual la Gastrodina afecta la expresión de proteínas potencialmente pro-inflamatorias, donde concluyen que la Gastrodina podría ser un fármaco anti-inflamatorio en enfermedades neurodegenerativas. Por su parte Liu *et al.*, 2005 evaluaron los efectos de la Gastrodina en las neuronas inductoras de la enfermedad de Alzheimer, tomando como modelo células corticales y del hipocampo cerebral. Sus resultados mostraron que podrían proteger las células contra el daño inducido por Abeta25 -35, lo cual potencia a la Gastrodina como un agente preventivo del Alzheimer. En el 2008 Wang *et al.*, estudiaron la cinética y las inter-relaciones entre la Gastrodina en plasma de rata, el líquido cefalorraquídeo (LCR) y microdiálisis de cerebro (corteza frontal, el hipocampo, el tálamo y el cerebelo), esto con el fin de entender la farmacocinética del compuesto, lo cual contribuye a entender lo que el compuesto le hace al organismo, y como el organismo lo asimila. También se han realizado estudios para el tratamiento del Parkinson, como el de Kumar *et al.*, 2013 quienes reportaron que la Gastrodina es eficaz en la prevención de la apoptosis neuronal mediante la atenuación de las actividades antioxidantes y antiapoptóticas en áreas del cerebro. También, dependiendo de la dosis, protege las neuronas dopaminérgicas contra la neurotoxicidad a través de la regulación de los radicales libres, lo cual sugiere que tiene efectos protectores en

modelos experimentales y que puede desarrollarse como un candidato clínico para mejorar los síntomas de Parkinson.

Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios que se encuentran en una gran cantidad de plantas. Forman espumas muy estables parecidas a las del jabón en soluciones acuosas, de aquí se deriva su nombre (*sapos*: jabón) (Sparg *et al*, 2004.) se caracterizan estructuralmente por la presencia de una unidad de oligosacárido unido a un esteroide o aglicona triterpénica o esteroidal. Las saponinas son compuestos importantes de defensa de la planta, de actividad antimicrobiana y fungicida (Colegale y Molyneux, 1993). Químicamente, como grupo, incluyen compuestos que son esteroides, triterpenos y alcaloides esteroidales glicosilados.

La gran diversidad estructural de las saponinas se refleja en sus diferentes propiedades biológicas y fisicoquímicas, y en el uso que se hace de ellas en jabones, antimicrobianos, anticancerígenos y hemolíticos, entre otros. A pesar de su gran aplicación industrial y farmacéutica, las saponinas glicoalcaloides, en determinadas concentraciones, son tóxicas para microorganismos, insectos, animales y humanos, y por ello cuando están presentes en los alimentos se consideran como factores antinutricionales (Friedman, 2006; Wallace, 2004).

Las saponinas con una cadena de azúcares unida al carbono-3 tienen gran actividad antimicrobiana. Esta actividad depende de la ramificación de los azúcares (Hostettmann and Marston, 1995; Morrissey *et al.*, 1999), ya que cuando la saponina pierde un azúcar terminal, la cadena de azúcares queda linearizada y la saponina pierde la actividad microbicida. La saponina SC-2 aislada de *Solanum chrysotrichum* afecta a numerosas especies de la levadura *Candida*, a la cuál le causa cambios en membrana celular, cambios en la morfología de la pared celular, separa la membrana citoplasmática de la pared y se desintegra. También se reporta que la saponina SC-2 tiene una actividad fungicida o fungistática según la especie de *Candida* (Herrera-Arellano *et al.*, 2007). Recientemente, Ito y colaboradores en 2007 mostraron que la saponina tomatina induce la muerte celular programada por la posible activación de las vías de señalización, a través de la tirosina quinasa y la proteína G, la cual lleva a una acumulación intracelular de Ca^{++} y a la producción de oxígeno reactivo como el

peróxido de hidrógeno (H₂O₂); sin embargo, esta saponina no induce la lisis celular en las cepas del hongo *Fusarium oxysporum* sensibles a la tomatina *in vitro*. (Ito *et al.*, 2007).

Con relación al efecto citotóxico producido por algunas saponinas aisladas de especies vegetales, se han encontrado que algunos glucósidos de colestanos espirostanos producen efectos citotóxicos sobre líneas celulares de leucemia HL-60. Los colestanos glicosilados, obtenidos de *ornithogalum saundersiae* produjeron efectos citotóxicos sobre esta línea celular, comparables o superiores al etopósido, adriamicina y metotrexato (kuroda *et al.*, 2001). Las saponinas triterpénicas con esqueleto tipo oleanano obtenidas de *pulsatilla chinensis*, también impiden el crecimiento de las células leucémicas aunque con efectos menos potentes que las saponinas esteroidales. Las especies mexicanas *Agave americana* y *Viguiera decurrens* también contienen saponinas activas contra las células de leucemia. En el agave se encontró como principio activo el glucósido espirostánico, mientras que en *Viguiera decurrens* las saponinas citotóxicas son del tipo triterpénico (Yokosuka *et al.*, 2000). Otras células cancerígenas susceptibles a saponinas corresponden a las de carcinoma humano HSC-3 y HSC-2 cuyo crecimiento fue inhibido por las saponinas de *Fucraea foetida* y *Camassia leichtlini*, respectivamente. Las células cancerígenas de colon fueron susceptibles a las saponinas esteroidales chamalósido aislado de *Chlorophytum malayense* (Qiu, S. X, 2000) y las saponinas triterpénicas del tipo oleanano aisladas de *Kalopanax pictus*. También se han reportado efectos citotóxicos contra líneas celulares de cáncer de riñón (GLC4), fibrosarcoma (WEHI-164, hígado (HEK-293), estómago, próstata y de mama.

También se han descrito saponinas con actividad inmunomoduladora (adyuvante inmunológico), el cual se define como una sustancia que, al incorporarse a una vacuna, acelera, prolonga o incrementa la calidad de la respuesta inmune a los antígenos. Una de las principales características de estos adyuvantes es que deben carecer de actividad toxica, tener una fuerte estimulación, inducir una respuesta satisfactoria de memoria y ser estables. La saponina QS-21 obtenida de *Quijalla saponaria* presentó un efecto adyuvante potente en pruebas realizadas con una amplia variedad de antígenos (Sasaki *et al.*, 1998). La especie *Smilax medica* colectada en Veracruz, México, contiene tres saponinas de tipo espirostano activas contra *C. albicans* con un valor de CMI de 12.5 µg/ml. La especie *Dioscorea villosa*

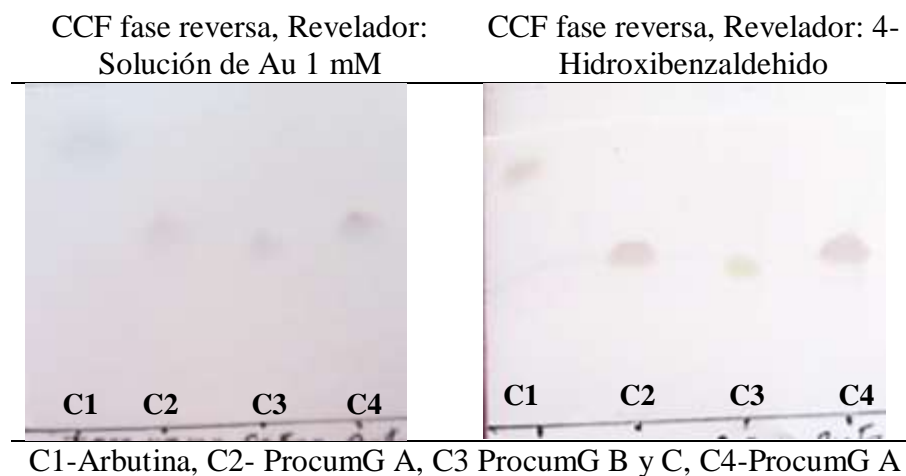
es otra planta colectada en México, que produce saponinas esteroidales con actividad antifúngica (Sautor *et al.*, 2005).

Entre los compuestos que han demostrado tener efecto quimiopreventivo se encuentra la soyasaponina I, aislada de la harina de soya (*Glycine max*). Este glucósido triterpénico actúa como inhibidor específico de la sialiltransferasa. El ginsenosido Rg₃ aislado de *Panax ginseng* produce un efecto radioprotector, así como la protección a la genotoxicidad inducida con EDTA. Otra saponina que presenta efectos quimiopreventivos es la α -heredina la cual se comporta como un compuesto antimutagénico contra aflatoxina B1. De la especie *Balbostemma panuculatum* se han aislado una serie de saponinas triterpénicas denominadas tubeimósidos, de los cuales el tubeimósido II presentó el efecto más potente en un modelo de promoción del efecto antitumoral por inducción química (Yu y Ma, 2001).

8.4 ETAPA IV Caracterización óptica y espectroscópica de las nanopartículas de oro y su actividad antimicrobiana

Mediante CCF se monitoreó la reducción de oro, en la Tabla 13 podemos observar del lado izquierdo el revelado con la solución de oro, donde se aprecia claramente que los compuestos efectivamente tienen la capacidad de biosintetizar nanopartículas de oro.

Tabla 13 CCF de los compuestos aislados, revalado con Oro y 4-Hidroxibenzaldehído



Los resultados obtenidos del análisis microscópico y espectroscópico de las NPsAu, sintetizadas a partir de los compuestos aislados, se muestran en las figuras 43, 44 y 45.

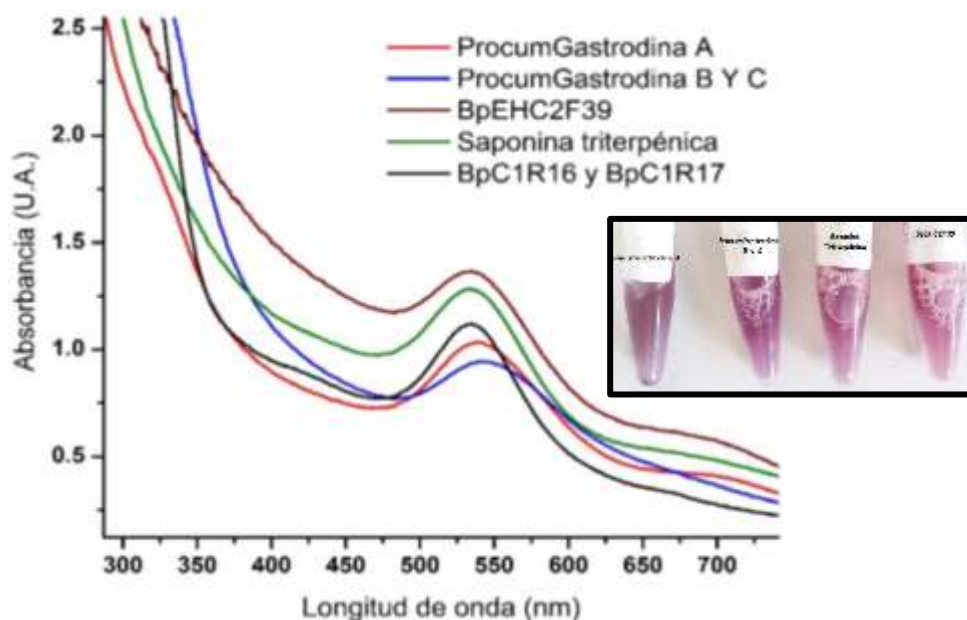


Figura 43 Espectro UV-Visible de las NPsAu con los compuestos aislados

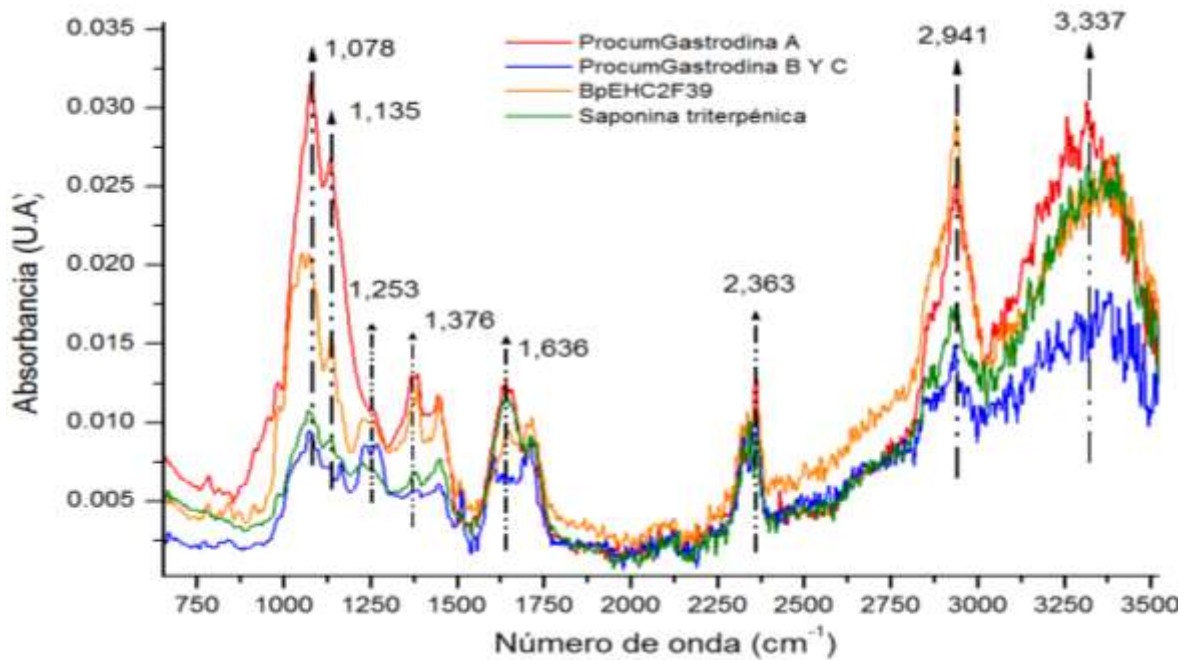
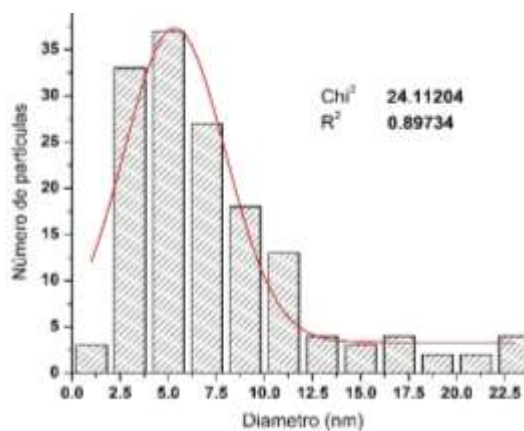
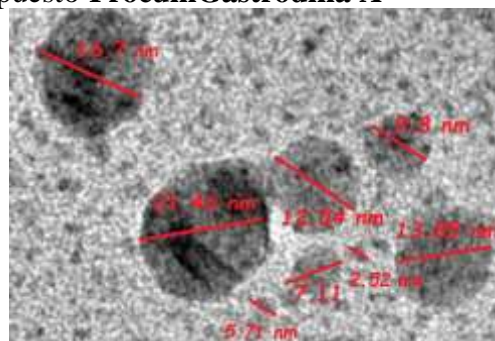
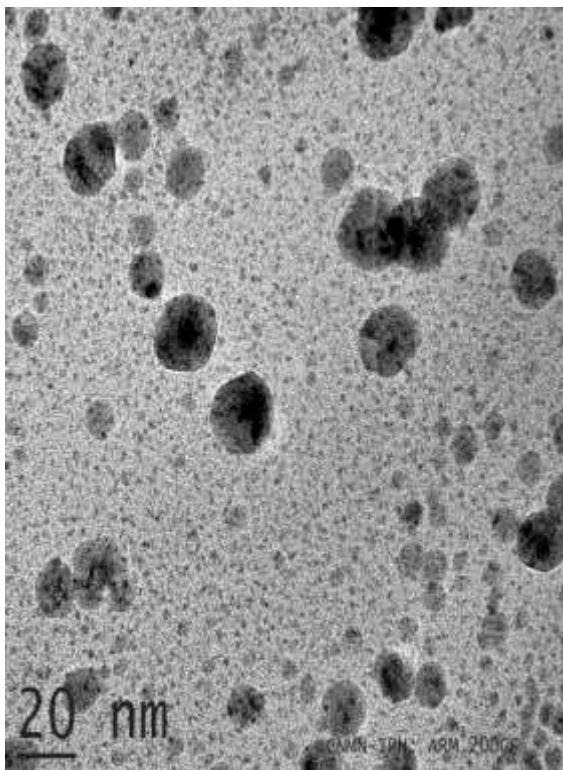


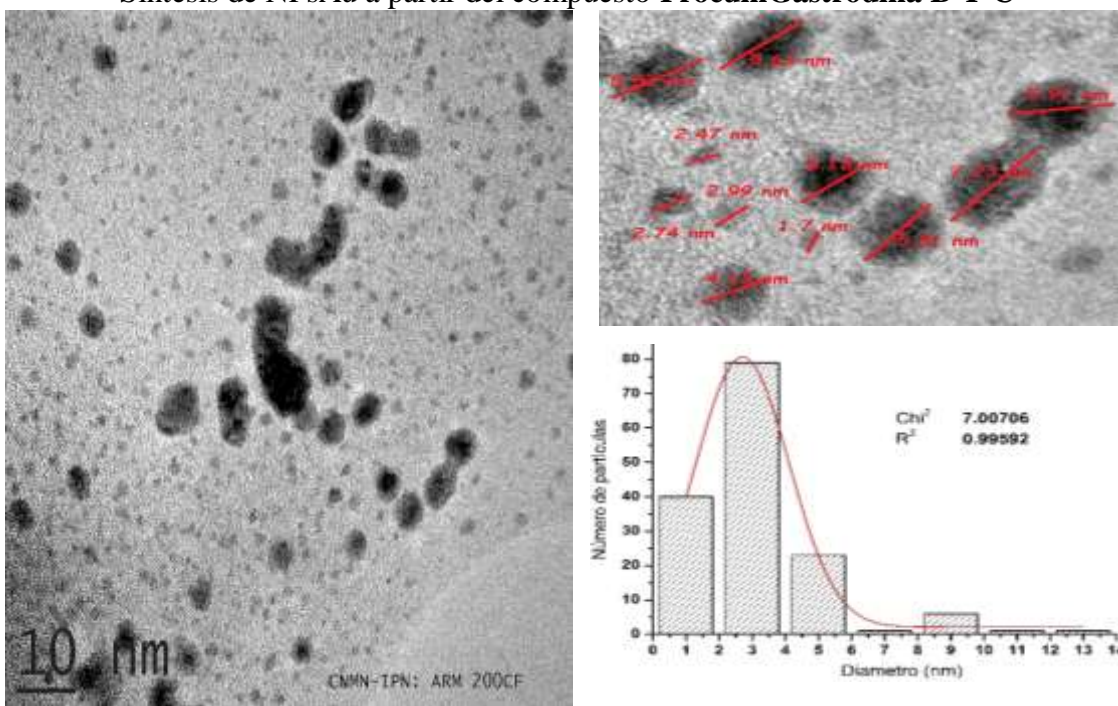
Figura 44 Espectro FT-IR de las NPsAu con los compuestos aislados

Síntesis de NPsAu a partir del compuesto **ProcumGastrodina A**



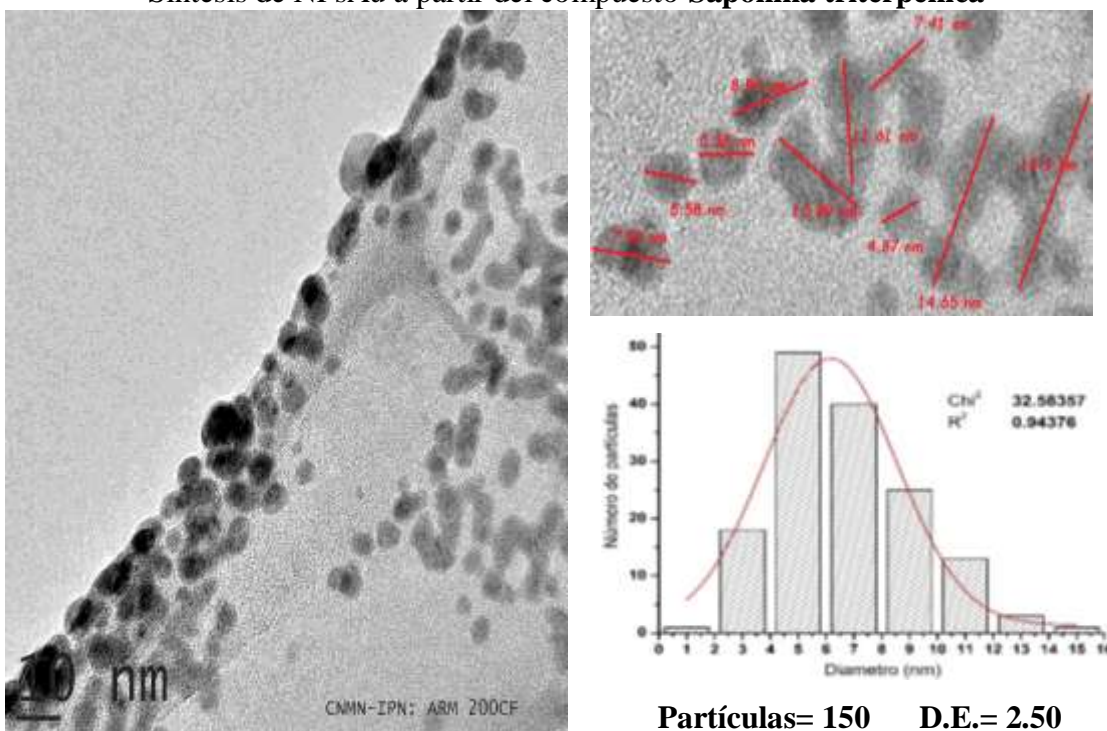
Partículas= 150 D.E.= 4.79
Máximo 23 nm Mínimo 1.47 nm

Síntesis de NPs_{Au} a partir del compuesto **ProcumGastrodina B Y C**



Partículas= 150 D.E.= 1.95
Máximo 13.2 nm Mínimo 0.69 nm

Síntesis de NPs_{Au} a partir del compuesto **Saponina triterpénica**



Partículas= 150 D.E.= 2.50
Máximo 15.23 nm Mínimo 1.370 nm

Figura 45 Distribución del diámetro de partícula sintetizada a partir de los compuestos aislados

Estos resultados demuestran que existe una fuerte correlación entre los compuestos aislados con las distribuciones de partícula, la forma y las bandas asociadas a grupos funcionales anclados a la superficie de las NPsAu. Las diferencias en el pico medio de absorción de la RPS se le atribuyen al cambio en la distribución de tamaño obtenido en el coloide (Haiss *et al.*, 2007). Dichos cambios se ven reflejados en los tamaños promedios obtenidos, en ese sentido el valor de χ^2 nos ayuda a observar la diferencia entre las frecuencias observadas de cada muestra. El menor valor de χ^2 fue de 7.00, en la síntesis de NPsAu con ProcumGastrodina B y C con una R^2 de 0.996, lo cual sugiere que la distribución de tamaño es homogénea o monodisperso. En contraste con la ProcumGastrodina A, el sistema coloidal varia, sin embargo, aún se considera monodisperso, esto por el rango de tamaños que van de 1.4 a 23 nm. En ambos sistemas las nanopartículas obtenidas son de forma cuasi-esférica, sin embargo, en relación a la saponina triterpénica, las variaciones en cuanto al tamaño y la forma son muy marcadas, obteniendo rodillos y cuasi-esferas principalmente (1.5 a 16 nm), lo cual sugiere que la diferencia estructural entre este tipo de compuestos, interviene en gran medida en el tipo de estructura obtenida, así como en el tamaño y estabilidad.

En el espectro FT-IR de las nanopartículas sintetizadas a partir de los diferentes compuestos, se pueden observar picos muy agudos como el de $3,371\text{ cm}^{-1}$ el cual es debido al estiramiento de grupos O-H, presentes en alcoholes y fenoles. El pico a $2,941\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento del enlace C-H. El pico a $2,363\text{ cm}^{-1}$ indica la presencia de enlaces C=O de ácidos carboxílicos. El pico a $1,636\text{ cm}^{-1}$ puede representar a las vibraciones de dobles enlaces C=C, por su parte el pico en $1,376\text{ cm}^{-1}$ es característico de enlaces C-C de anillos aromáticos y por último, el pico agudo en $1,135$ es característico de enlaces C-O. A partir del espectro de FT-IR podemos confirmar que los compuestos fenólicos, como los aislados en este trabajo, son los agentes responsables de la reducción y estabilización de las NPsAu, esto en concordancia con lo reportado por Ghoreishi *et al.*, 2011. Con estos análisis también demostramos que las NPsAu están funcionalizadas, esto en base a la presencia de los grupos funcionales adheridos en la superficie.

La formación de las NPsAu dependen del potencial y la disponibilidad de agentes biorreductores y estabilizantes, ya que de ello depende la proporción predominante de una forma particular, siendo en nuestro caso cuasi-esférica. Lin *et al.*, 2010 reportaron que la

prolongación en el tiempo de reacción, lo cual es dependiente del agente reductor y estabilizante, interviene en gran medida en la formación de otras estructuras como lo son los rodillos, esto debido a que las nanoestructuras de menor tamaño se van agregando en las cavidades de estructuras de mayor tamaño por capilaridad, hasta formar formas alargadas, lo cual podría explicar lo obtenido con las NPsAu a partir de la saponina triterpénicas. Gardea-Torresdey *et al.*, 1999 también demostraron que la formación de nanopartículas con diferente morfología es resultado de la coalescencia de partículas más pequeñas, las cuales tienden a reorganizarse para lograr que la forma sea más estable. Sin embargo, la diferente composición de las biomoléculas entre las plantas individuales y las condiciones de reacción utilizadas durante la biosíntesis podrían resultar en la formación de una forma común. En nuestro caso, podríamos decir que las nanopartículas menores de 5 nm, se están agrupando, formando a su vez estructuras alargadas, como las que observamos en las micrografías. Ghosh *et a.*, 2012 y Nadagouda *et al.*, 2009 por su parte, reportan que las saponinas presentes en algunas plantas fungen como agentes estabilizantes, esto debido a que son surfactantes naturales. Mismos autores reportan que los grupos hidroxilo presentes en los glucósidos de las saponinas, son los responsables de la reducción del Au(III), lo cual concuerda con las estructuras glicociladas que obtuvimos en este trabajo.

Actividad antimicrobiana de las NPsAu

Las pruebas antimicrobianas de las NPsAu se realizaron mediante el método de dilución en placa de 96 pozos, en base a la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetilthiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Para ello se emplearon 4 concentraciones del compuesto y de las NPsAu (100, 50, 25 y 12.5 µg/ml). En el caso de las NPsAu, se sometieron a un proceso de lavado, se centrifugaron a 3500 rpm hasta la obtención de un pellet, posteriormente se llevó a sequedad y se pesaron los µg de NPsAu correspondientes.

En la tabla 14 se muestran los resultados de las CMI de la ProcumGastrodina A y las NPsAu para 10 bacterias (Tabla 15). En la figura 46 se encierran en círculos las concentraciones mínimas inhibitorias para cada bacteria, cada placa se hizo por duplicado, únicamente se muestran los resultados obtenidos para ProcumGastrodina A y NPsAu sintetizadas a partir de este compuesto. Las NPsAu sintetizadas con la saponina triterpénica presentó CMI de 100 µg/ml para la bacteria 2, 3, 4 y 9.

Tabla 14 Concentración Mínima Inhibitoria de la ProcumGastrodina A y NPsAu +Pro.Gas

Compuesto	Bacterias (CMI µg/ml)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ProcumGas A	>100	50	50	50	>100	>100	>100	>100	25	100
NPsAu +Pro.Gas A	>100	12.5	12.5	12.5	100	100	>100	100	12.5	12.5

NPsAu +Pro.Gas A Nanopartículas sintetizadas a partir de ProcumGastrodina A

Tabla 15 Bacterias empleadas para la determinación de la CMI

Bacteria	
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 731 A.C. MRS
3	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 562 A.C. MRS
4	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 0198
5	<i>Staphylococcus aureus</i> 1031 CRS
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603 ATCC
7	<i>Escherichia coli</i> 25922 ATCC
8	<i>Escherichia coli</i> 25922 BLEE (+)
9	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1042 MRS
10	<i>Escherichia coli</i> 2194BLEE (+)

MRS (Meticilina resistente), CRS (Clindamicina resisitente), BLEE (Betalactamasas De Espectro Prolongado), A.C. (Aislado clínico)

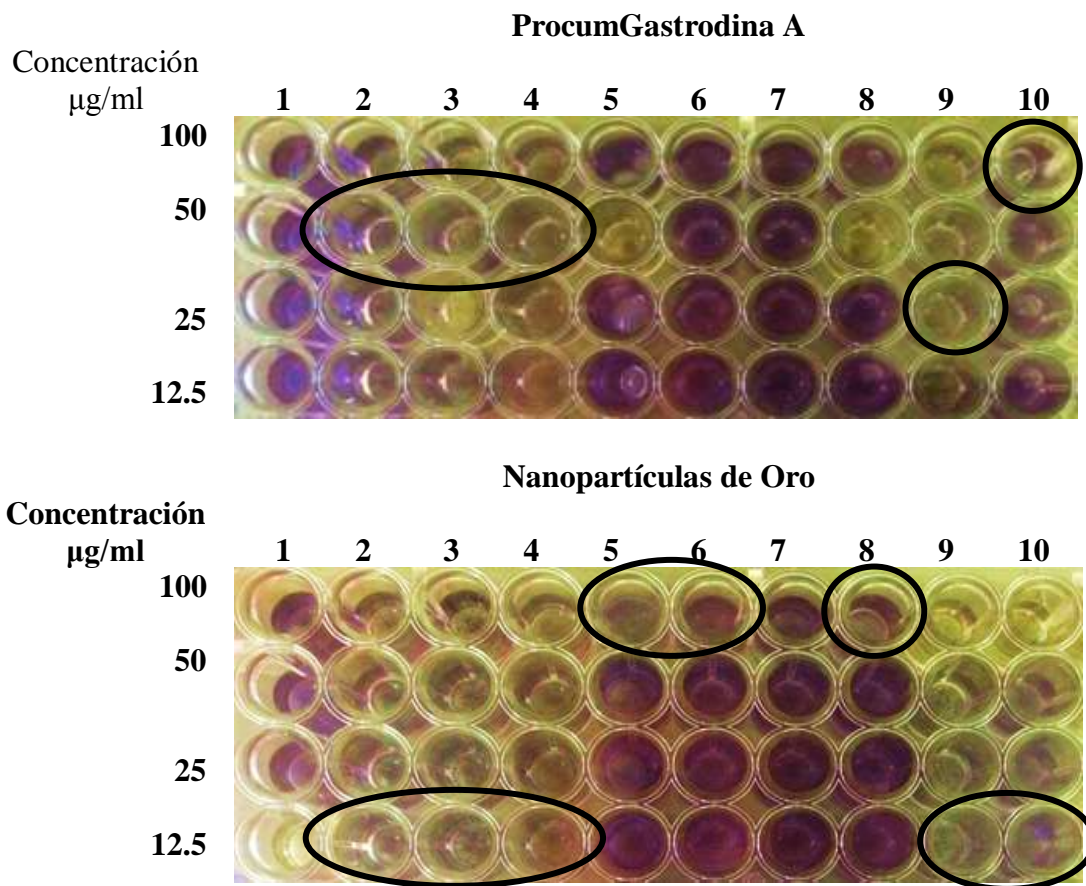


Figura 46 Determinación de la CMI mediante el método de dilución en placa

Las diferencias en cuanto a la CMI de cada compuesto es significativamente menor para las NPsAu, con respecto al producto natural. En algunos casos la concentración se reduce tres veces para que inhiba a la bacteria. También se observa que las NPsAu logran inhibir el crecimiento de bacterias Gram-, lo cual no se logró con ningún producto natural. Algunos de los resultados relevantes es la inhibición a bacterias meticilina resistente y bacterias BLEE (+) productoras de Betalactamasas de Espectro Prolongado, producida por algunas bacterias responsable de la resistencia que éstas exhiben ante la acción de antibióticos betalactámicos como las penicilinas, las cefalosporinas, monobactamicos y carbapenémicos (carbapenemasas).

La capacidad antimicrobiana de NPsAu podría ser dada por su tamaño (2.3 a 11 nm) que es 500 veces más pequeño que una bacteria. Esto hace que la transición por la pared celular o membrana citoplasmática de los microorganismos sea más fácil, lo cual podría causar su destrucción y por tanto la muerte celular (Chwalibog *et al.*, 2010). Otra propiedad importante de las NPsAu es la elevada área superficial, lo cual contribuye a que los grupo funcionales expuestos en la superficie, actúen en la superficie de la célula o directamente a los organelos celulares (Nirmala Grace y Pandian, 2007). Los mecanismos de acción no están bien descritos, la actividad se le ha atribuido al tamaño y a la elevada área superficial, sin embargo, son necesarios algunos otros estudios para aseverar el mecanismo de cada bacteria.

9 CONCLUSIONES

- Mediante el método de síntesis verde, se corroboró la capacidad de sintetizar nanopartículas de oro, a partir del extracto hidroalcoholico de *Bacopa procumbens*.
- Se lograron optimizar los parámetros en cuanto a la relación Sal metálica:Extracto y concentración del extracto o producto semipuro.
- Los compuestos de baja y mediana polaridad presentes en la FACOEt fueron los responsables de la actividad reductora y antimicrobiana
- En base a las técnicas cromatográficas empleadas y a los métodos antimicrobianos y de síntesis empleados, se logró el aislamiento de 7 compuestos activos
- Se lograron identificar 4 compuestos, 3 de estos no están reportados en la literatura, por lo cual consideramos de gran relevancia este hallazgo.

- Mediante las técnicas espectroscópicas empleadas, se corroboró la funcionalización de las nanopartículas y mediante los análisis microscópicos se observó la forma y tamaño de las NPsAu, siendo principalmente cuasi-esféricas con tamaño promedio de 5.3 nm.
- Las pruebas antimicrobianas de los productos naturales vs las NPsAu sintetizadas a partir de estos, mostraron que el efecto se potencializa sobre la mayoría de bacterias, bajando hasta tres veces la CMI, como lo fue para *Staphylococcus haemolyticus* 731 A.C. MRS, *Staphylococcus haemolyticus* 562 A.C. MRS y *Staphylococcus aureus* ATCC 0198 obteniendo CMIs de 12.5 µg/ml para cada uno, empleando las NPsAu+ProcumGastrodina A, mientras que para el compuesto ProcumGastrodina A las CMIs fue de 50 µg/ml.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh VN, Shamsi SF, Mehta BR, Fatma A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Colloids Surf B*. 2010, 81(1):81–86.
- Ashik, M., Andrew Flowers, M., Karagianis, G., & Waterman, P. G. (2006). New phenolic glycosides from the stems and leaves of *Casearia multinervosa*. *Natural product research*, 20(06), 641-647.
- Argueta VA., LM. Cano y Me. Rodarte. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Instituto Nacional Indigenista, México, 1994. 792.
- Bar H, Bhui DK, Sahoo GP, Sarkar P, De SP, Misra A. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids Surf A*, 2009, 339(1–3):134–139
- Chandran, S. P.; Chaudhary, M.; Pasricha, R.; Ahmad, A.; Sastry, M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. *Biotechnol. Prog.* 2006, 22 (2), 577–583.
- Chang, J., & Inui, T. (2005). Novel phenolic glycoside dimer and trimer from the whole herb of *Pyrola rotundifolia*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 53(8), 1051-1053.
- Chwalibog, A., Sawosz, E., Hotowy, A., Szeliga, J., Mitura, S., Mitura, K., Grodzik, M., Orłowski, P., Sokolowska, A., 2010. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *International Journal of Nanomedicine* 5, 1085–1094.

- Colegale, M.S. and Molyneux, J. R. (1993), *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination*. CRC Press 349-403.
- Dai, J. N., Zong, Y., Zhong, L. M., Li, Y. M., Zhang, W., Bian, L. G., y Lu, D. (2011). Gastrodin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS-stimulated microglia via MAPK pathways. *PloS one*, 6(7), e21891.
- Friedman, M. A. C. (2006). Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet, review *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8655- 8681.
- Gan P. Yau, S. F., Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications, *Environ Sci Biotechnol*, 2012 11:169–206.
- Gan P., Li S. Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2012, 11:169–206.
- Gardea-Torresdey J, Parsons J, Gomez E, Peralta-Videa J, Troiani H, Santiago P, Yacaman MJ, Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano Lett* 2002, 2:397–401.
- Ghoreishi, S. M., Behpour, M., & Khayatkashani, M. (2011). Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Rosa damascena* and its primary application in electrochemistry. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 44(1), 97-104.
- Ghosh, S., Patil, S., Ahire, M., Kitture, R., Kale, S., Pardesi, K., Cameotra, S.S., Bellare, J., Dhavale, D.D., Jabgunde, A., Chopade, B.A., 2012. Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *International Journal of Nanomedicine* 7, 483–496.
- Haiss, W., Thanh, N. T., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Analytical chemistry*, 79(11), 4215-4221.
- Herrera-Arellano, A., Martinez-Rivera, M. D., Hernandez-Cruz, M., Lopez-Villegas, E. O., Rodriguez-Tovar, A. V., Alvarez, L., Marquina-Bahena, S., Navarro-Garcia, V. M. and Tortoriello, J. (2007). Mycological and electron microscopic study of *Solanum chrysotrichum* saponin SC-2 antifungal activity on candida species of medical significance. *Planta Medica*, 73(15), 1568-1573.
- Hidalgo Alegria, Oriana (2010). Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuotánico de la planta *Bacopa procumbens* en la línea celular 3t3 de fibroblastos de ratón (Doctoral dissertation).
- Hostettmann, K. and Marston, A. (1995). *Saponins*, Cambridge, Press Syndicate of the University of Cambridge.

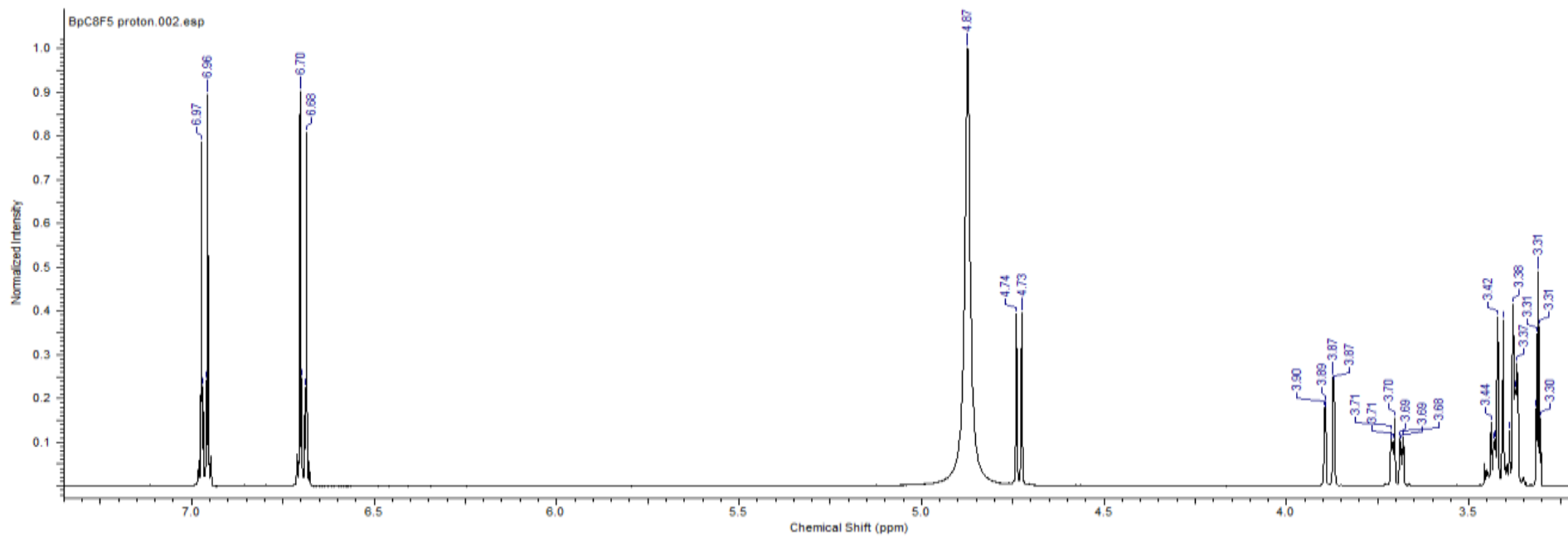
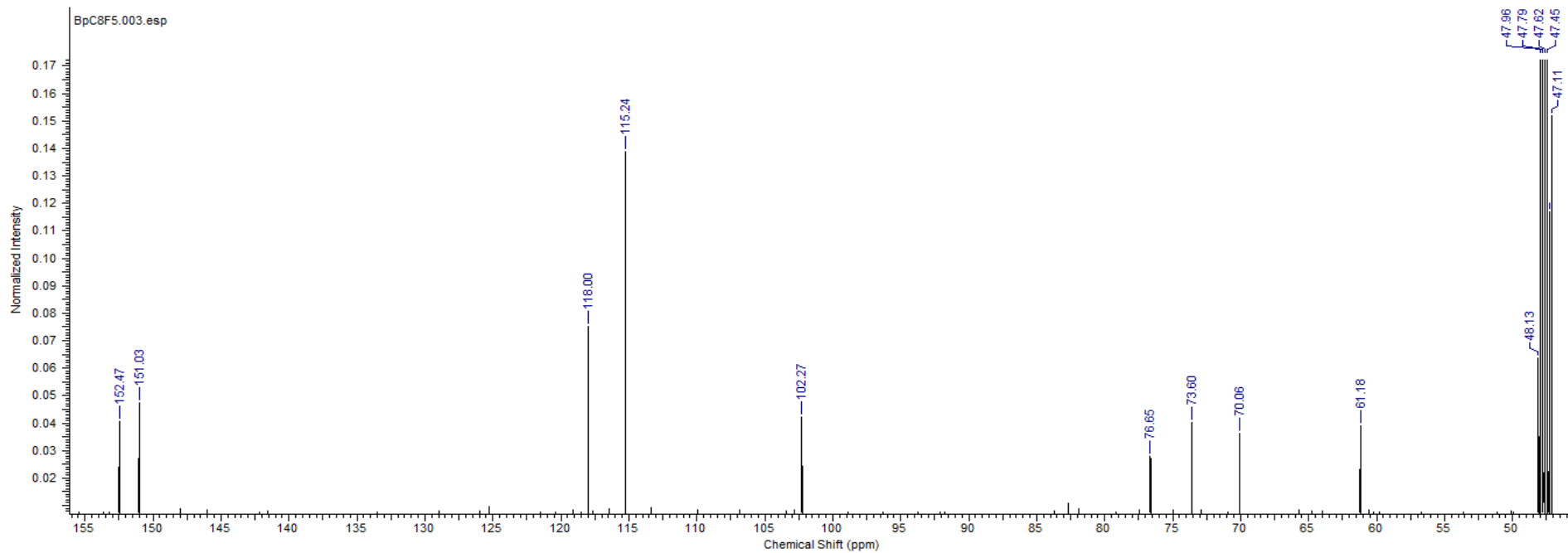
- Hostettmann, K. y Marston, A. (1995). Chemistry and pharmacology of natural products: Saponins. Cambridge University Press. p. 2-3
- Huang, J.; Qingbiao, L.; Sun, D.; Lu, Y.; Su, Y.; Yang, X.; Wang, H.; Wang, Y.; Shao, W.; He, N.; Hong, J.; Chen, C. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by noval sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* 2007, 18 (10), 105–106.
- Ito, S., Ihara, T., Tamura, H., Tanaka, S., Ikeda, T., Kajihara, H., Dissanayake, C., Abdel-Motaal, F. F. and ElSayed, M. A. (2007). Alpha-tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *Febs Letters*, 581(17), 3217-3222.
- Juibari MM, Abbasalizadeh S, Jouzani GS, Noruzi M Intensified biosynthesis of silver nanoparticles using a native extremophilic *Ureibacillus thermosphaericus* strain. *Mater Lett*. 2011, 65:1014–1017.
- Kuroda, M.; Mimaki, Y., Yokosuka, A., Sashida, Y., Beutler, J. A. Cytotoxic Cholestane Glycosides from the Bulbs of *Ornithogalum saundersiae* J. Nat. prod. 2001, 64, 88-91.
- Kumar, H., Kim, I. S., More, S. V., Kim, B. W., Bahk, Y. Y., & Choi, D. K. (2013). Gastrodin protects apoptotic dopaminergic neurons in a toxin-induced Parkinson's disease model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Kumar V, Yadav SK. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *J Chem Technol Biotechnol* 2009, 84:151–157.
- Li, Y., Li, F., Cai, H., Chen, X., Sun, W., & Shen, W. (2016). Structural characterization of inclusion complex of arbutin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(10), 2227-2233.
- Li X. Xu H. Chen G. Chen ZS. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *J Nanopart Res*, 2011, article 270974.
- Lin L, Wang W, Huang J, Li Q, Sun D, Yang X, Wang H, He N, Wang Y (2010) Nature factory of silver nanowires: plantmediated synthesis using broth of *Cassia fistula* leaf. *Chem Eng J* 162(2):852–858
- Liu, Z. H., Hu, H. T., Feng, G. F., Zhao, Z. Y., & Mao, N. Y. (2005). [Protective effects of gastrodin on the cellular model of Alzheimer's disease induced by A β 25-35]. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Sichuan University. Medical science edition*, 36(4), 537-540.
- Lu, A. H., Salabas, E. L., y Schuth, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and applications. *Angewandte Chemie Int.* 2007, Ed., 46, 1222-1244.
- Lukman AI, Gong B, Marjo CE, Roessner U, Harris AT. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *J Colloid Interface Sci.* 2011, 353(2):433–444.

- Macbeth, A. K., & Mackay, J. (1923). LXXXIV.—Studies of the glucosides. Part II. Arbutin. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 123, 717-724.
- MacLeod, J. K., Rasmussen, H. B., & Willis, A. C. (1997). A New Glycoside Antimicrobial Agent from *Persoonia linearis* × *pinifolia*. *Journal of natural products*, 60(6), 620-622.
- McNeil, S. E. Nanotechnology for the biologist. *J.Leukoc.Biol.* 2005, 78:585-594.
- Masuda, T., Mizuguchi, S., Tanaka, T., Iritani, K., Takeda, Y., & Yonemori, S. (2000). Isolation and Structure Determination of New Antioxidative Ferulic Acid Glucoside Esters from the Rhizome of *Alpinia speciosa*, a Zingiberaceae Plant Used in Okinawan Food Culture. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(5), 1479-1484.
- Nadagouda, M.N., Hoag, G., Collins, J., Varma, R.S., 2009. Green synthesis of Au nanostructures at room temperature using biodegradable plant surfactants. *Crystal Growth and Design* 9 (11), 4979–4983.
- Narayanan, K. B.; Sakthivel, N. Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. *Mater. Lett.* 2008, 62 (30), 4588–4590.
- Navarro, V., Rojas, G., Delgado, G., & Lozoya, X. (1997). Antimicrobial compounds detected in *Bocconia arborea* extracts by a direct bioautographic method. *Archives of medical research*, 29(2), 191-194.
- Nirmala Grace, A., Pandian, K., 2007. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles – a brief study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 297, 63–70.
- Nölting, B. (2006). *Methods in Modern Biophysics*. Berlin: Springer.
- Noruzi M, Zare D, Khoshnevisan K, Davoodi D (2011) Rapid green synthesis of gold nanoparticles using *Rosa hybrida* petal extract at room temperature. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 79:1461–1465.
- Noruzi M, Zare D, Davoodi D (2012) A rapid biosynthesis route for the preparation of gold nanoparticles by aqueous extract of cypress leaves at room temperature. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 94:84–88.
- Panigrahi S, Kundu S, Ghosh S, Nath S, Pal T. General method of synthesis for metal nanoparticles. *J Nanopart Res*, 2004, 6(4):411–414.
- Pathak, A., Kulshreshtha, D. K., & Maurya, R. (2005). Chemical constituents of *Bacopa procumbens*. *Natural product research*, 19(2), 131-136.
- Prabhu, K., Karar, P. K., Hemalatha, S., & Ponnudurai, K. (2011). Isolation and Spectral Identification of Arbutin from the Roots of *Viburnum erubescens*. *Int. J. of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2(3), 889-892.

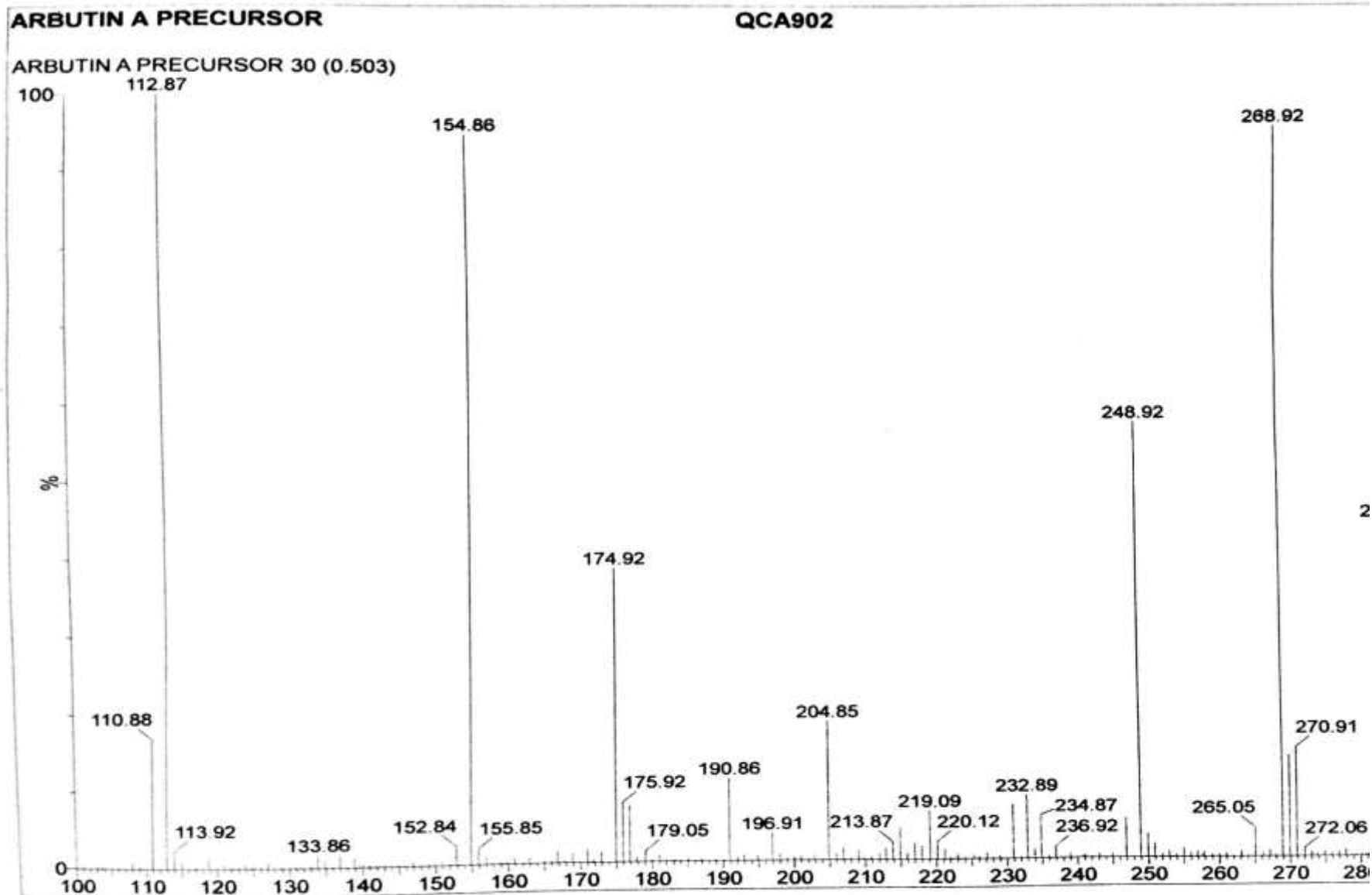
- Raveendran P, Fu J, Wallen SL Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2003, 125:13940–13941.
- Rzwendowski, C. G. y Rzwendowski, J. *Flora Fanerogámica del Valle de México.* 2ª edición. Instituto de Ecología A. C, y Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2001, 1406 pp.
- Sasaki, S.; Sumino, K.; Hamajima, K.; Fukushima, J.; Ishii, N.; Kawamoto, S.; Mohri, H.; Kensil, C.R.; Okuda, K. Introduction of systemic and mucosal immuneresponses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA vaccine formulated with QS-21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes *J. Virol.* 1998, 72, 4931-4939.
- Sautour, M.; Miyamoto, T., Lacaille-Dubois, M.A. Steroidal saponins from *Smilax medica* and their Antifungal Activity. *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 1489-1493.
- Sparg, S., Light, M., and van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94(2–3), 219–243.
- Sayed, M.; Panwar, J.; Sang Yun, Y. Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2013, 1, 591–602.
- Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *J Colloid Interface Sci.* 2004a, 275(2):496–502.
- Sheny D, Mathew J, Philip D Phytosynthesis of Au, Ag and Au–Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale*. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2011, 79:254–262.
- S. H. Wu and D. H. Chen. Synthesis and characterization of niquel nanoparticles by hydrazine reduction in ethylene glycol. *J. Colloid Interf. Sci.* 2003, 259, 282-286.
- Siavash I. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *GreenChem.* 2011, 13, 2638.
- Singh AK, Talat M, Singh DP, Srivastava ON (2010) Biosynthesis of gold and silver nanoparticles by natural precursor clove and their functionalization with amine group. *J Nanopart Res* 12(5):1667–1675.
- Song JY, Jang HK, Kim BS (2009) Biological synthesis of gold nanoparticles using magnolia kobus and diopyros kaki leaf extracts. *Process Biochem* 44(10):1133–1138.
- Soundarrajan C, Sankari A, Dhandapani P, Maruthamuthu S, Ravichandran S, Sozhan G, Palaniswamy N Rapid biological synthesis of platinum nanoparticles using *Ocimum sanctum* for water electrolysis applications. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012, 35:827-833.
- Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology. Biol Med.* 2010, 6:257–262.
- Thakkar, K. N.; Mhatre, S. S.; Parikh, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine* 2010, 6 (2), 257–262.

- Vijayaraghavan K, Nalini SPK Biotemplates in the green synthesis of silver nanoparticles. *Biotechnol J.* 2010, 5(10) 1098–1110.
- Vijayaraghavan K, Nalini SPK. Biotemplates in the green synthesis of silver nanoparticles. *Biotechnol J.* 2010, 5(10): 1098–1110.
- Vilchis-Nestor AR, Sánchez-Mendieta V, Camacho-López MA, Gómez-Espinosa RM, Camacho-Lopez MA, Arenas-Alatorre JA (2008) Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Mater Lett* 62:3103–3105
- Virkutyte J, Varma RS. Green synthesis of metal nanoparticles: biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization. *Chem Sci.* 2011, 2:837–846.
- Wang, Q., Chen, G., & Zeng, S. (2008). Distribution and metabolism of gastrodin in rat brain. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 46(2), 399-404.
- Xu, W. H., Liang, Q., Zhang, Y. J., & Zhao, P. (2015). Naturally Occurring Arbutin Derivatives and Their Bioactivities. *Chemistry & biodiversity*, 12(1), 54-81.
- Yokosuka, A.; Mimaki, Y.; Kuroda, M.; Sashida, Y. A new steroidal saponin from leaves of *Agave Americana*. *Planta Med.* 2000, 66, 393-396.
- Yu, Y. Y.; Ma, L. J. Structure-activity relationship of tubeimosides in anti-inflammatory, antitumor and antitumor-promoting effects, *Acta Pharmacol. Sin.* 2001, 22, 463-468.
- Zhokhov, S. S., Jastrebova, J. A., Kenne, L., & Broberg, A. (2009). Antioxidant hydroquinones substituted by β -1, 6-linked oligosaccharides in wheat germ. *Journal of natural products*, 72(4), 656-661.

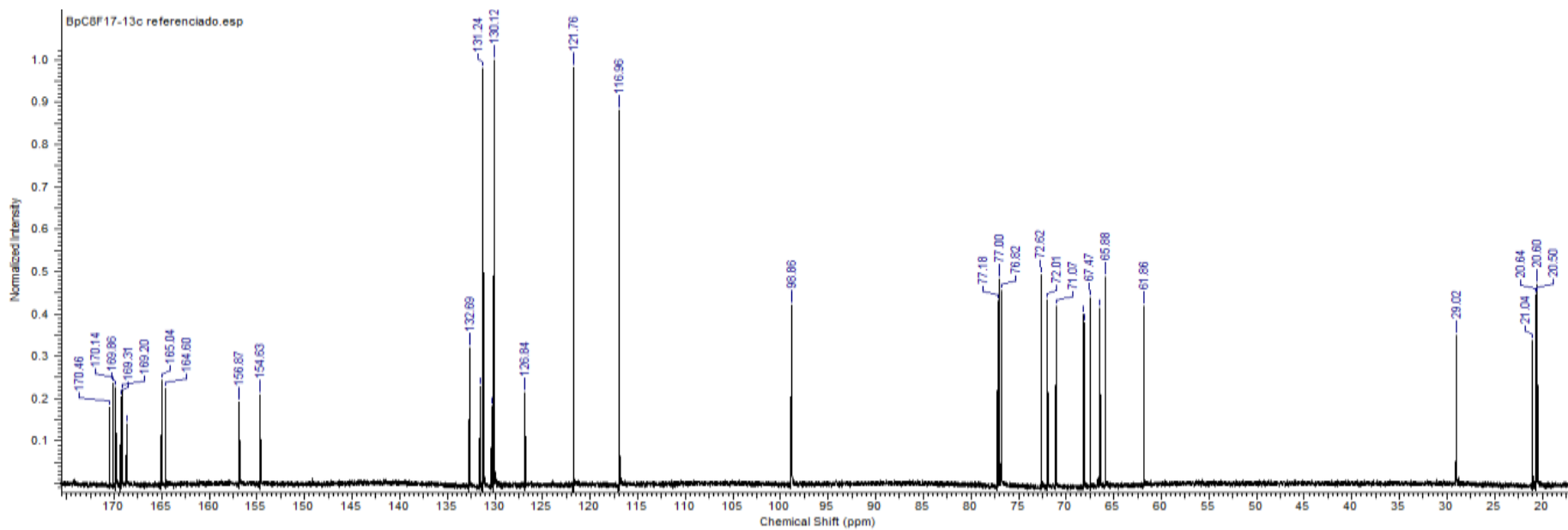
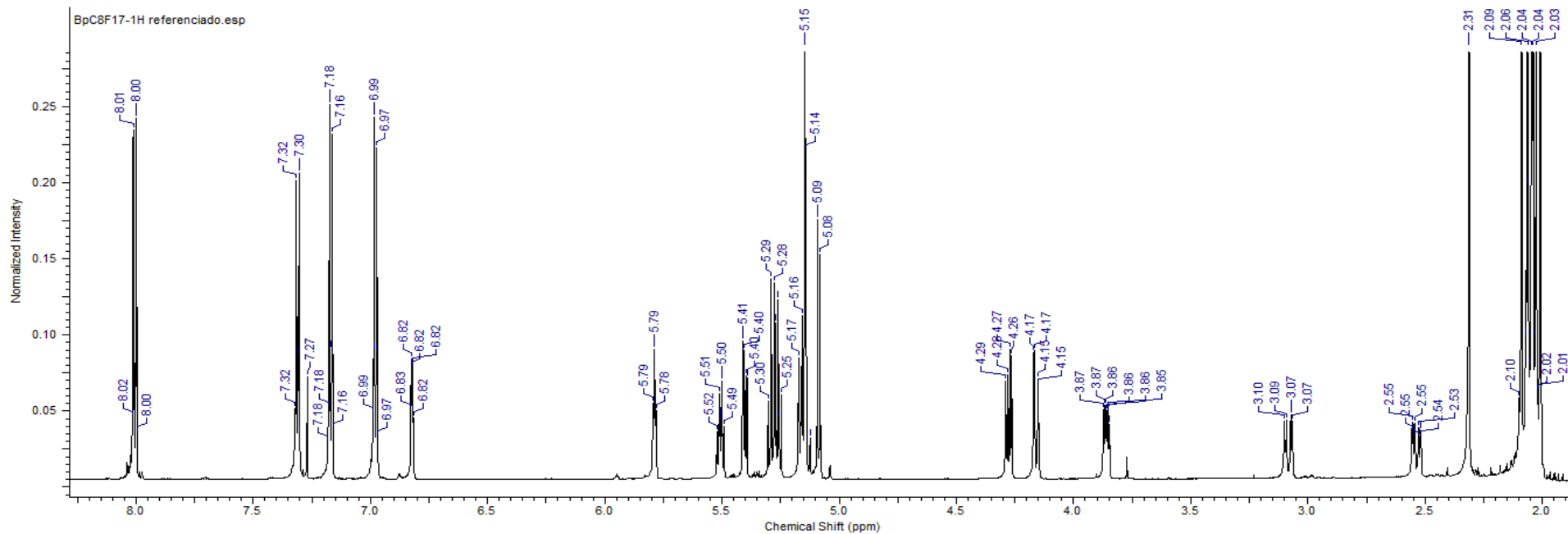
ANEXOS



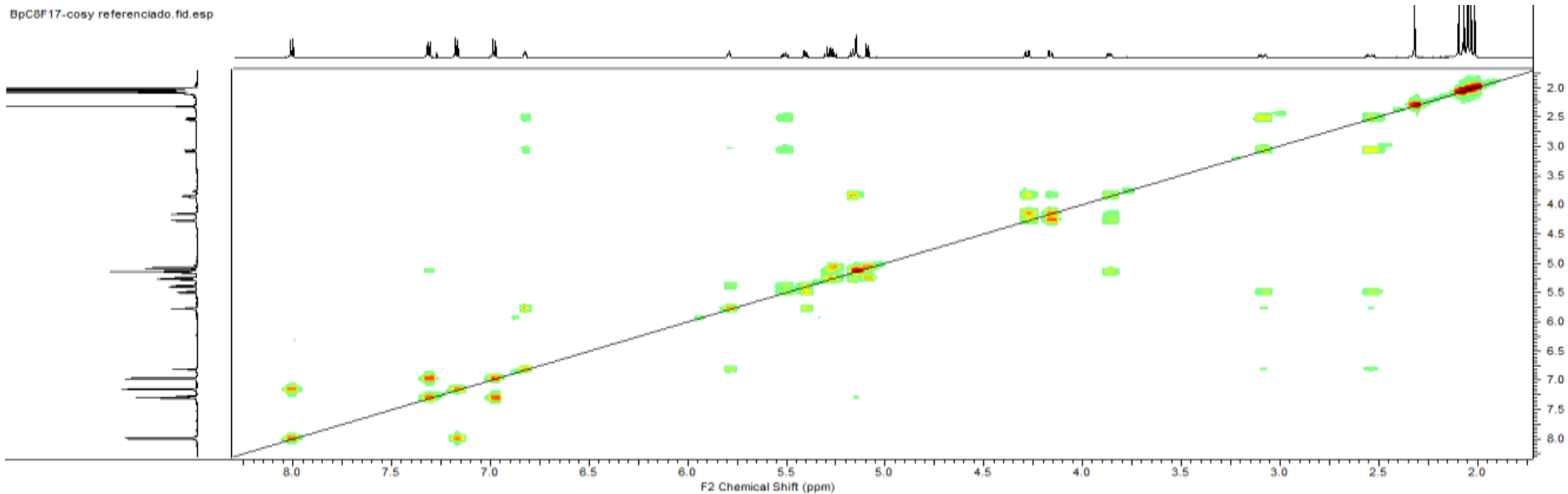
Anexo 1 Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C y ^1H de **BpEHC2F5**



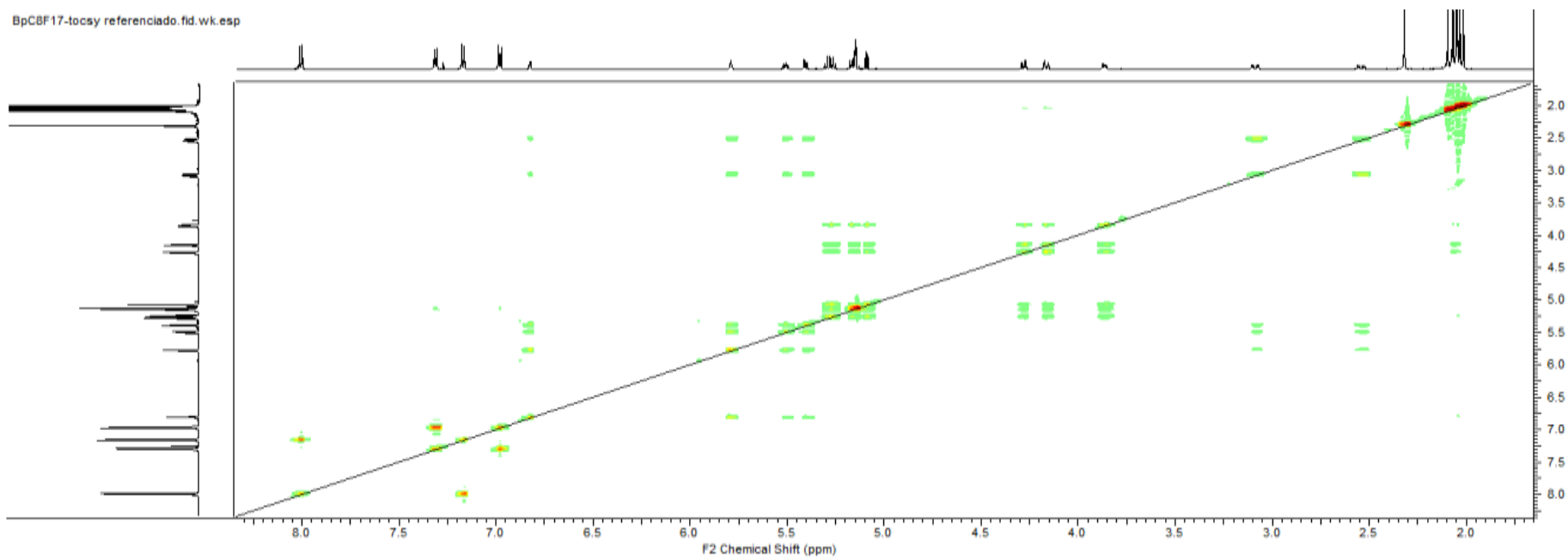
Anexo 2 Espectro de Masas de **BpEHC2F5**



Anexo 3 Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C y ^1H de **BpEHC2F17 Acetilado**

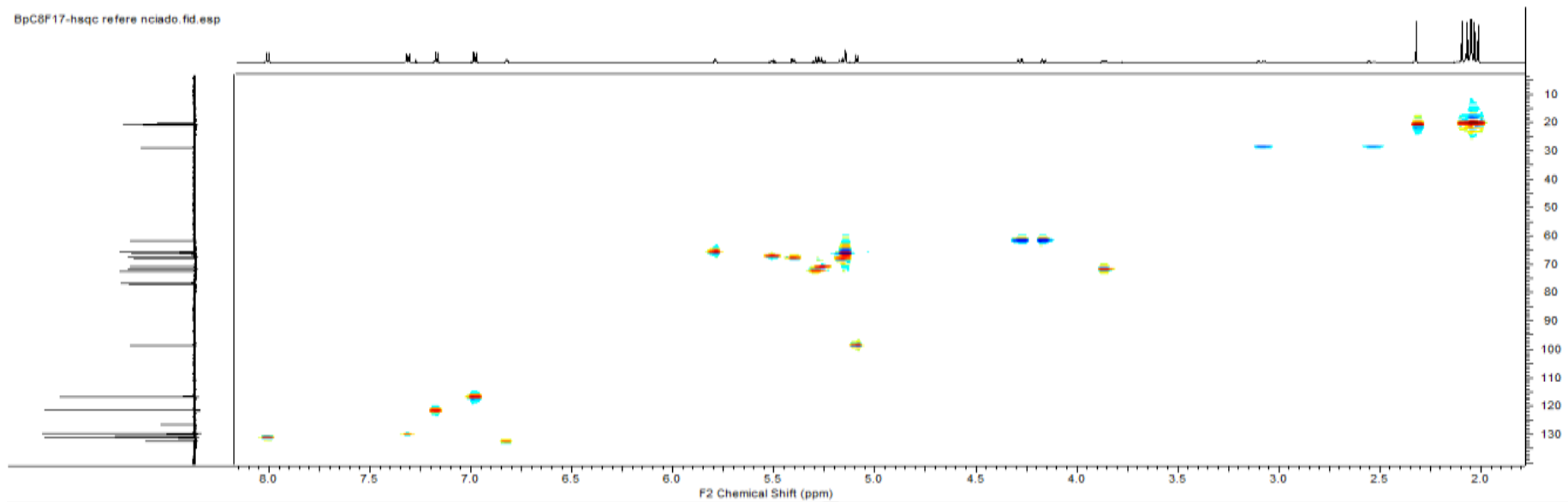


Anexo 4 Experimento de correlación homonuclear en dos dimensiones ^1H - ^1H COSY de **BpEHC2F17 Acetilado**



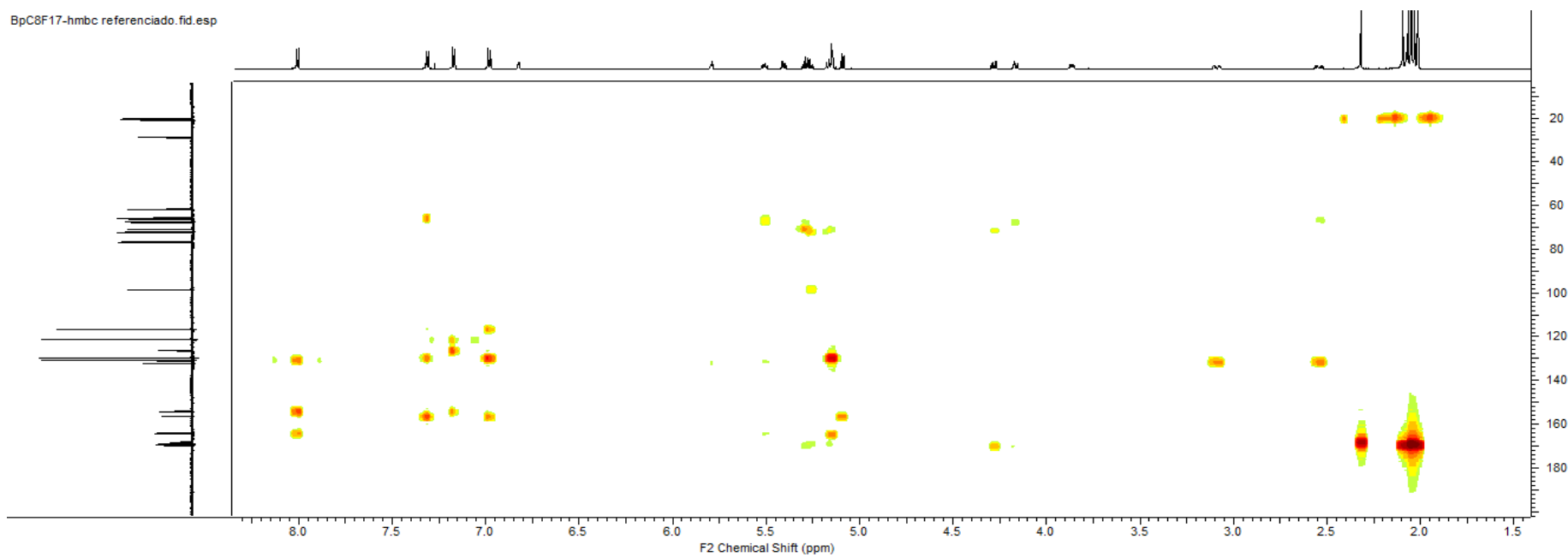
Anexo 5 Experimento TOCSY Total Correlation Spectroscopy homonuclear en dos dimensiones ^1H - ^1H de **BpEHC2F17 Acetilado**

BpC8F17-hsqc referenciado.fid.esp

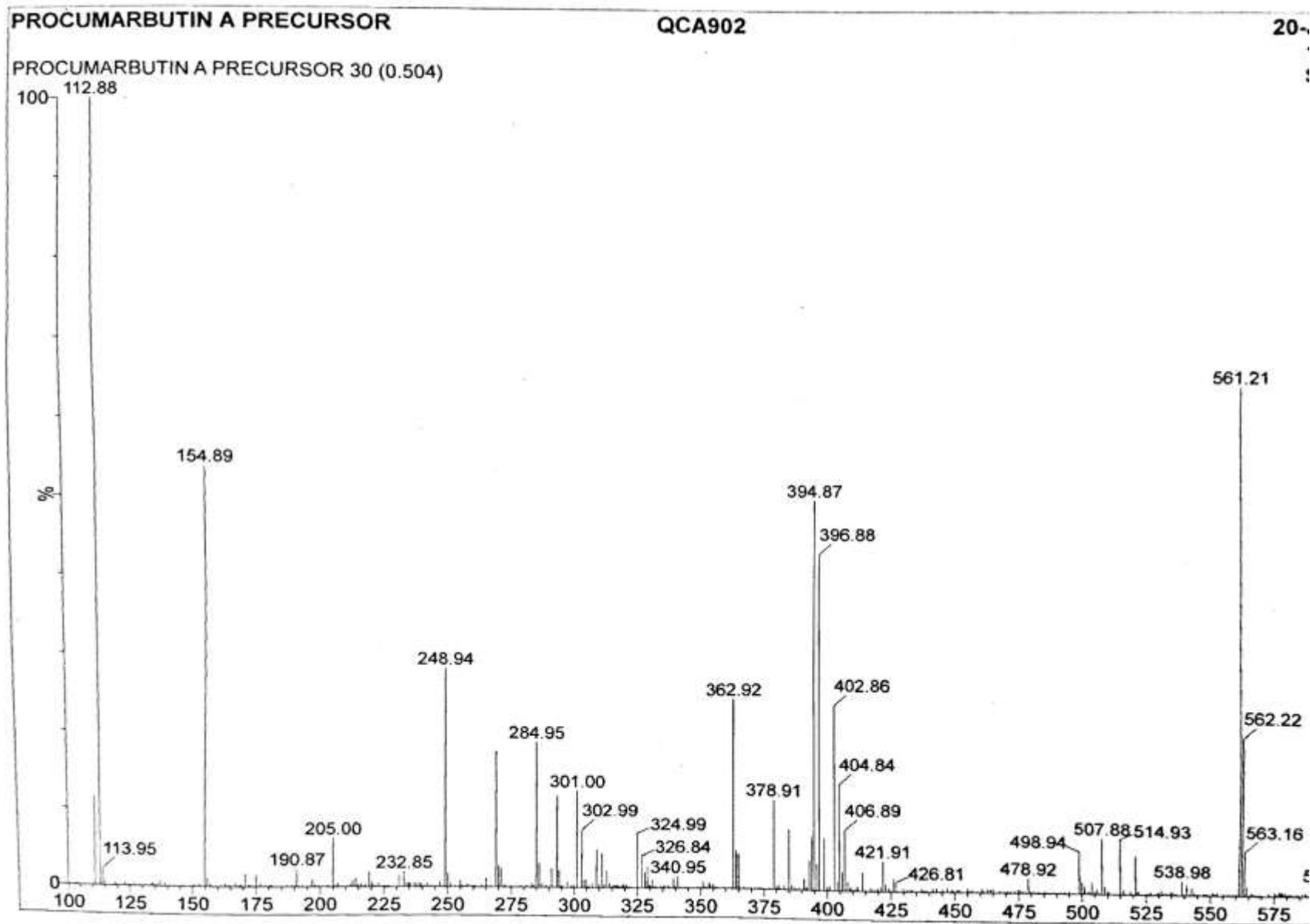


Anexo 6 Experimento HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence ^{13}C - ^1H de **BpEHC2F17 Acetilado**

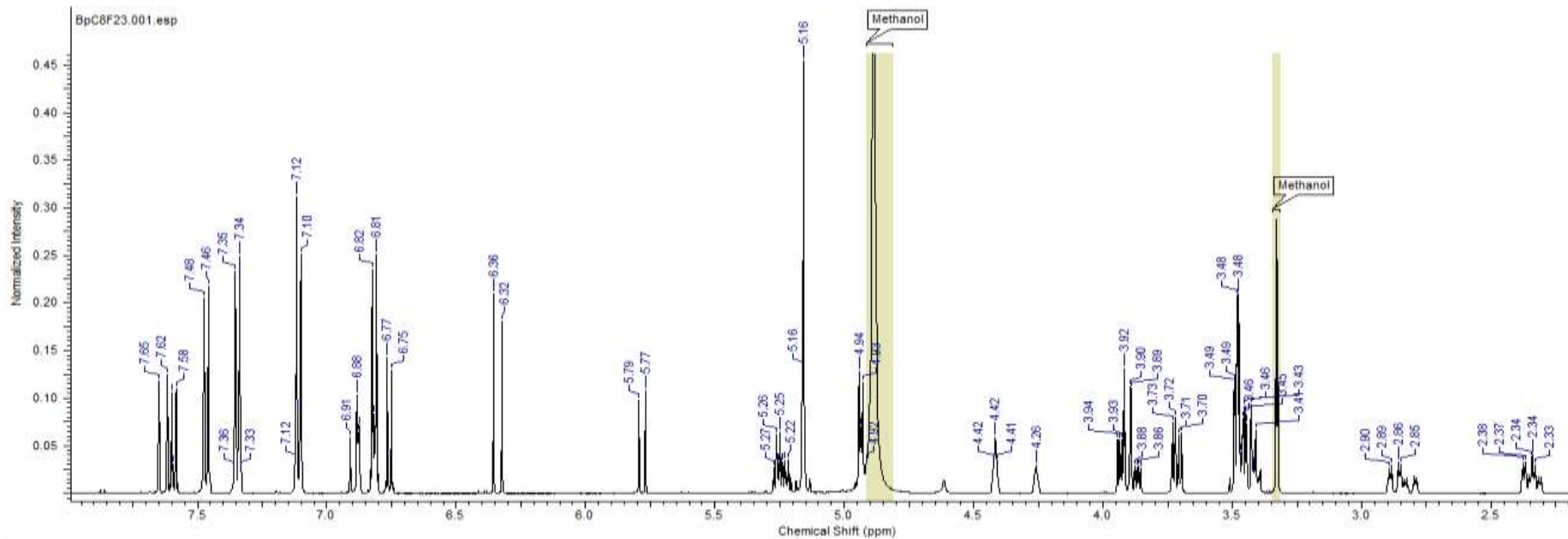
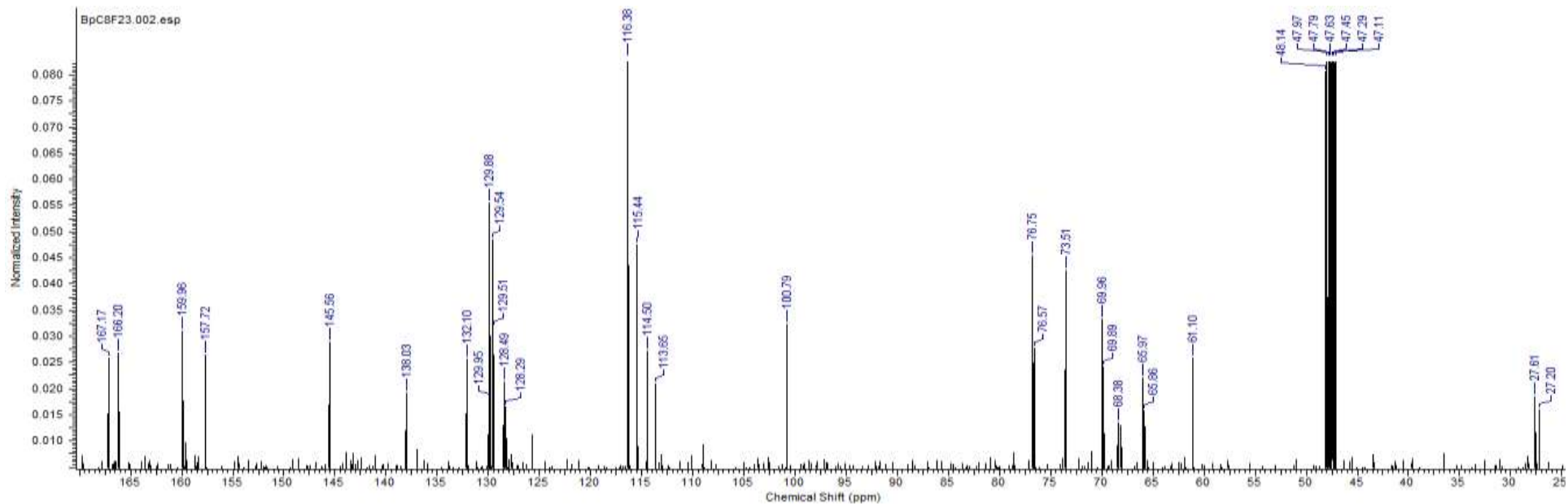
BpC8F17-hmbc referenciado.fid.esp



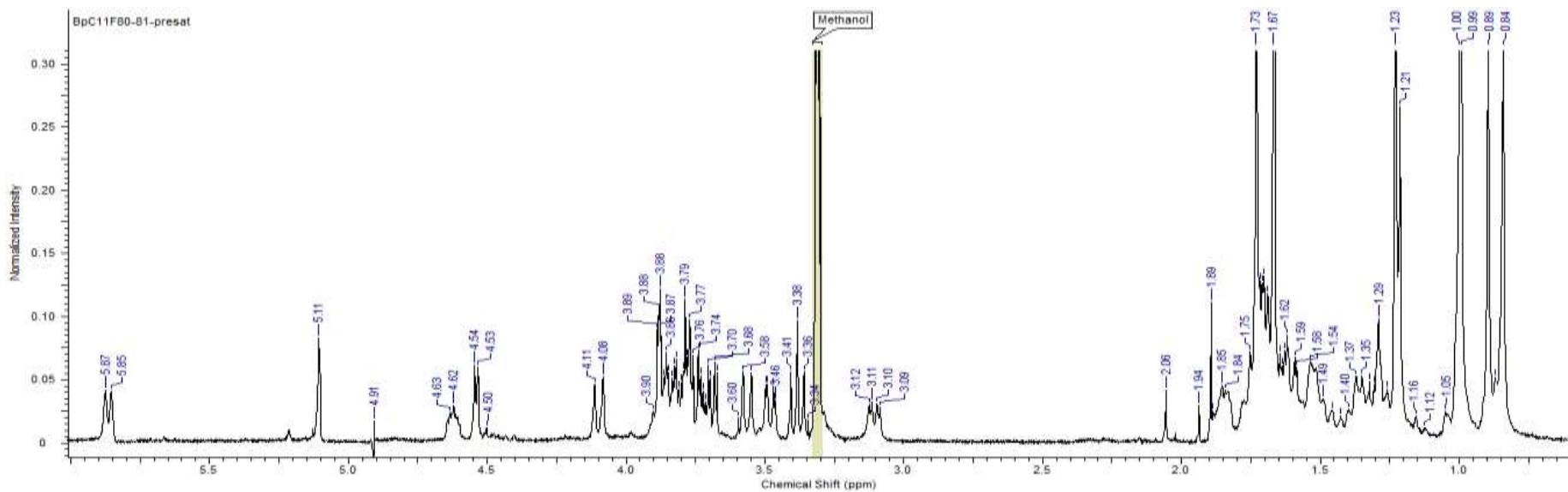
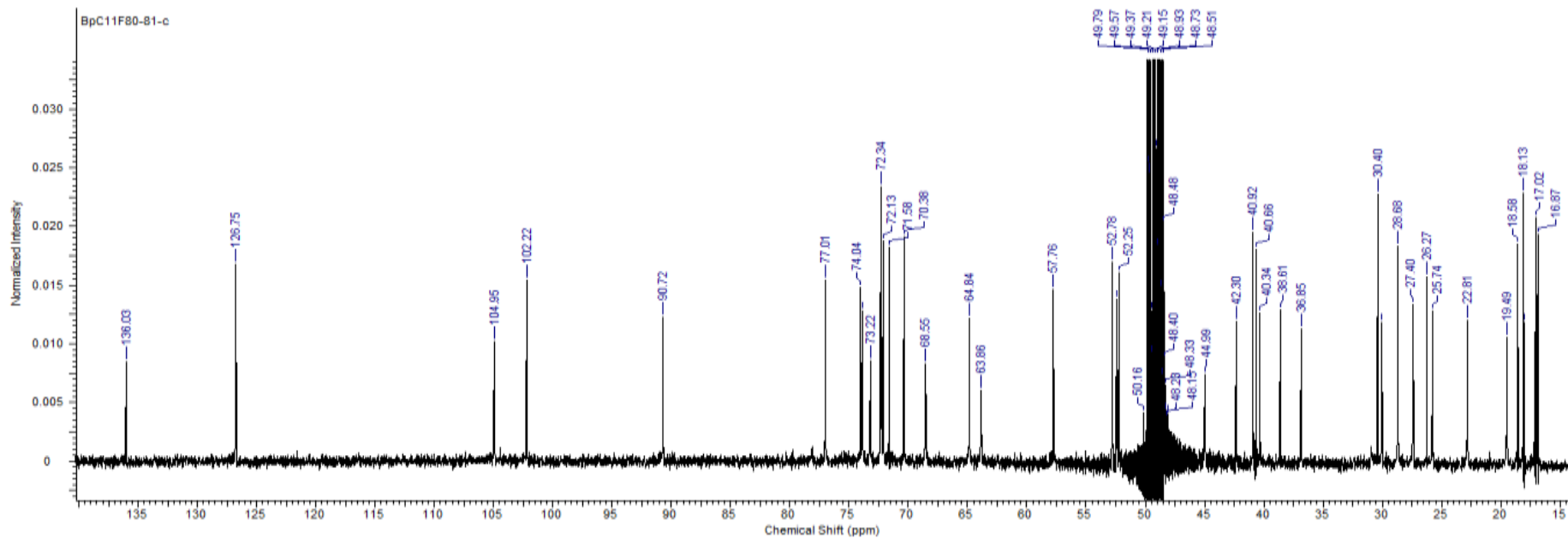
Anexo 7 Experimento HMBC Heteronuclear Multiple Bond Coherence ^{13}C - ^1H de **BpEHC2F17 Acetilado**



Anexo 8 Espectro de Masas de **BpEHC2F17** producto natural



Anexo 9 Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C y ¹H de **BpEHC2F23**



Anexo 10 Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C y ^1H de **BpEHC2F37**

