

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS

CARRERA DE FARMACIA

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA USANDO EXTRACTOS DE
DESECHOS NATURALES DE *NEPHELIUM LAPPACEUM* Y
*ZINGIBER OFFICINALE***

MODALIDAD DE TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN FARMACIA

ASTRID BRENES BRENES

TUTOR: DR. LUIS CASTILLO HENRÍQUEZ

**SAN JOSÉ
JULIO, 2021**

Contenido

Contenido de Figuras.....	6
Contenido de Tablas	10
CAPÍTULO I: PROBLEMA	14
Planteamiento de Problema	14
Objetivos.....	15
Objetivo General	15
<i>Objetivos específicos.</i>	<i>15</i>
Justificación.....	15
Antecedentes.....	16
Antecedente Histórico	16
Antecedentes Internacionales	17
Antecedentes Nacionales.....	18
Proyecciones.....	19
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	21
Diseño de Experimentos.....	21
<i>Tipos de diseños de experimentos.</i>	<i>24</i>
Nanotecnología.....	29
Nanopartículas.....	30
<i>Métodos de síntesis.</i>	<i>30</i>
<i>Métodos de caracterización.</i>	<i>32</i>
<i>Mecanismo de acción antimicrobiano.</i>	<i>38</i>
Química Verde.....	42
<i>Importancia ambiental.</i>	<i>43</i>
<i>Aplicaciones.</i>	<i>43</i>

Compuestos Fitoquímicos	44
<i>Nephelium lappaceum</i>	45
Bacterias	53
<i>Clasificación según tinción de Gram</i>	54
<i>Clasificación según morfología</i>	55
Concentración Mínima Inhibitoria	56
<i>Ensayos de sensibilidad en extractos</i>	56
Resistencia Bacteriana.....	62
<i>Mecanismos de resistencia</i>	63
Staphylococcus Aureus	67
<i>Resistencia antimicrobiana</i>	68
<i>Producción de toxinas</i>	69
<i>Patogenia</i>	70
<i>Cuadro clínico</i>	75
<i>Tratamiento</i>	78
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	80
Enfoque.....	80
Diseño.....	80
Fuentes de Información	80
Criterios de Inclusión	81
Criterios de Exclusión	81
Variables de la Investigación.....	82
Instrumentos y Técnicas	83
Materiales	83
Equipos y Condiciones	84

Reactivos	84
Procedimiento de Recolección y Análisis de Datos	85
Elaboración del Extracto de <i>Nephelium Lappaceum</i> y <i>Zingiber Officinale</i>	85
Estudio Preliminar de la Síntesis Verde de Nanopartículas de Plata	86
Diseño de Experimentos para <i>Zingiber Officinale</i>	87
Estudio Confirmatorio de la Síntesis Verde de Nanopartículas de Plata a Partir del Extracto de <i>Zingiber Officinale</i>	89
Caracterización Físicoquímica de las Nanopartículas	90
<i>Espectroscopía ultravioleta visible.</i>	90
<i>Espectroscopía infrarroja.</i>	90
Evaluación Antimicrobiana	91
<i>Materiales y equipo.</i>	91
<i>Solución buffer estéril 0.1M pH 8,0.</i>	92
<i>Solución salina estéril 0,9% p/v.</i>	92
<i>Preparación de las muestras.</i>	92
<i>Solución de trabajo de estándar.</i>	93
<i>Preparación del inóculo.</i>	93
<i>Desarrollo de la prueba.</i>	93
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS	95
Estudios Preliminares	95
Síntesis de Nanopartículas de Plata a Partir del Extracto de <i>Nephelium Lappaceum</i>	97
Estudio Preliminar de Formación de Nanopartículas de Plata a Partir del Extracto de <i>Zingiber Officinale</i>	103
Diseño de Experimentos	105
Interpretación de los Espectros Infrarrojos	112
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana	118

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	134
Conclusiones.....	134
Conclusión del primer objetivo específico	134
Conclusión del segundo objetivo específico	134
Conclusión del tercer objetivo específico.....	134
Conclusión del objetivo general	134
Recomendaciones	135
REFERENCIAS	136
ANEXOS.....	146

Contenido de Figuras

Figura 1. Diagrama de diseño de experimentos.	24
Figura 2. Clasificación de los diseños experimentales.	25
Figura 3. Esquema del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido.	34
Figura 4. Espectrofotómetro infrarrojo y las partes fundamentales.	35
Figura 5. Esquema de funcionamiento del espectrofotómetro UV-visible.	37
Figura 6. Lista de preparaciones con plata según la Farmacopea Británica.	38
Figura 7. Representación de las respuestas celulares a los mecanismos de toxicidad inducidos por nanopartículas de plata.	40
Figura 8. Árbol de <i>Nephelium lappaceum</i>	46
Figura 9. Fruto de <i>Nephelium lappaceum</i>	46
Figura 10. Clasificación taxonómica de <i>Nephelium lappaceum</i>	47
Figura 11. Estructuras químicas de los principales compuestos en la cáscara de rambután.	48
Figura 12. Morfología de la planta de <i>Zingiber officinale</i>	50
Figura 13. Rizoma de <i>Zingiber officinale</i>	50
Figura 14. Clasificación taxonómica de <i>Zingiber officinale</i>	51
Figura 15. Estructura química de gingeroles, zingibereno y shogaoles.	52
Figura 16. Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.	54
Figura 17. Antibiograma efectuado con el método de Kirby-Bauer.	59
Figura 18. Esquema sugerido para macrodilución en caldo por NCCLS.	61
Figura 19. Placa de microdilución de CIM.	62
Figura 20. Producción de enzimas inactivantes de antibióticos.	65
Figura 22. Pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas).	66
Figura 23. Sistema de expulsión activo del antimicrobiano por bombas expulsora.	66
Figura 24. Tinción de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	67
Figura 25. Fuente de infección endógena.	70
Figura 26. Mecanismos patogénicos de <i>Staphylococcus aureus</i>	71
Figura 27. Determinantes de patogenicidad de <i>S. aureus</i>	72
Figura 28. Naturaleza de la lesión.	75
Figura 29. Foliculitis.	76
Figura 30. Síndrome estafilocócico de piel escaldada en un neonato.	77

Figura 31. Macerado de <i>Nephelium lappaceum</i>	85
Figura 32. Macerado de <i>Zingiber officinale</i>	86
Figura 33. Tratamiento 1 <i>Zingiber officinale</i>	87
Figura 34. Tratamiento 2 <i>Zingiber officinale</i>	88
Figura 35. Tratamiento 3 <i>Zingiber officinale</i>	88
Figura 36. Tratamiento 4 <i>Zingiber officinale</i>	89
Figura 37. Agitación de 2,5mL de extracto de <i>Zingiber officinale</i> con nitrato de plata.	89
Figura 38. Muestra de nanopartículas de plata a partir del extracto de <i>Nephelium lappaceum</i> en le cubeta de cuarzo para su lectura en el espectroscopio UV-visible.	90
Figura 39. Espectro infrarrojo marca Agilent.	91
Figura 40. Distribución de las soluciones estándar en los penicilindros.....	94
Figura 41. Preparación de ensayos microbiológicos.....	94
Figura 42. Estudio preliminar del extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	95
Figura 43. Estudio preliminar del extracto de <i>Zingiber officinale</i>	96
Figura 44. Espectro de nanopartículas de plata con el extracto de la piel del rambután.....	97
Figura 45. Análisis por Espectroscopia UV-visible de la formación de nanopartículas a partir de una alícuota de 0,5mL del extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	98
Figura 46. Análisis por Espectroscopia UV-visible de la formación de nanopartículas a partir de una alícuota de 0,75mL del extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	98
Figura 47. Análisis por Espectroscopia UV-visible de la formación de nanopartículas a partir de una alícuota de 1mL del extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	99
Figura 48. Análisis por Espectroscopia UV-visible de la formación de nanopartículas a partir de una alícuota de 2mL del extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	99
Figura 49. Comparación de lectura de los cuatro tratamientos a 1h de síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	100
Figura 50. Comparación de lectura de los cuatro tratamientos a las 3h de síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	101
Figura 51. Comparación de lectura de tratamientos a las 24h de síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	102
Figura 52. Análisis preliminar de la formación de nanopartículas de plata con 0,5mL extracto de <i>Zingiber officinale</i> mediante espectroscopía UV-visible.	103

Figura 53. Análisis preliminar de la formación de nanopartículas de plata con 0,75mL extracto de <i>Zingiber officinale</i> mediante espectroscopía UV-visible.	104
Figura 54. Análisis preliminar de la formación de nanopartículas de plata con 1mL extracto de <i>Zingiber officinale</i> mediante espectroscopía UV-visible.	104
Figura 55. Análisis preliminar de la formación de nanopartículas de plata con 2mL extracto de <i>Zingiber officinale</i> mediante espectroscopía UV-visible.	105
Figura 56. Estudio Tukey.	109
Figura 57. Diagrama de efectos principales para la respuesta.	110
Figura 58. Gráfico de interacción para la respuesta.	111
Figura 59. Muestra a evaluar en el espectroscopio IR de <i>Nephelium lappaceum</i> y <i>Zingiber officinale</i>	113
Figura 60. Espectro IR del extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	113
Figura 61. Espectro IR del extracto de <i>Zingiber officinale</i>	114
Figura 62. Frecuencia de absorción de infrarrojo.	114
Figura 63. Espectro IR de un fenol.	115
Figura 64. Estructura de 6-gingerol.	116
Figura 65. Espectro IR de la síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	117
Figura 66. Espectro IR de la síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto de <i>Zingiber officinale</i>	117
Figura 67. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 0,5mL de extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	118
Figura 68. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 0,75mL de extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	119
Figura 69. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 1mL de extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	119
Figura 70. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 2mL de extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	120
Figura 71. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 0,5mL de extracto de <i>Zingiber officinale</i>	120

Figura 72. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 0,75mL de extracto de <i>Zingiber officinale</i>	121
Figura 73. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 1mL de extracto de <i>Zingiber officinale</i>	121
Figura 74. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 2mL de extracto de <i>Zingiber officinale</i>	122
Figura 75. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 0,5mL de extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	123
Figura 76. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 0,75mL de extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	124
Figura 77. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 1mL de extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	125
Figura 78. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata formada a partir de 2mL de extracto de <i>Nephelium lappaceum</i>	126
Figura 79. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 0,5mL de extracto de <i>Zingiber officinale</i>	128
Figura 80. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 0,75mL de extracto de <i>Zingiber officinale</i>	129
Figura 81. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 1mL de extracto de <i>Zingiber officinale</i>	130
Figura 82. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 2mL de extracto de <i>Zingiber officinale</i>	131
Figura 83. Ejemplo de sedimento confirmatorio de la presencia de las nanopartículas.	133

Contenido de Tablas

Tabla 1. Clasificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas.	55
Tabla 2. Antibióticos eficaces contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.	55
Tabla 3. Operacionalización de variables de la investigación.	82
Tabla 4. Condiciones para elaboración de extractos.	87
Tabla 5. Resumen del diseño de experimentos.	107
Tabla 6. Ejecución del diseño de experimentos.	107
Tabla 7. ANOVA de un factor para el diseño de experimentos.	108
Tabla 8. Ecuación de regresión.	108

Carta de Revisión Filológica

San José, 14 de julio, 2021

Sres.

Universidad Internacional de las Américas

Estimados Sres.:

Por medio de la presente me permito comunicar que la alumna **ASTRID VANESSA BRENES BRENES**, cédula de identidad número 3-0508-0615, estudiante de la Universidad Internacional de las Américas, ha solicitado la revisión filológica de la tesis para optar por el grado de Licenciatura en Farmacia denominada: **“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA USANDO EXTRACTOS DE DESECHOS NATURALES DE NEPHELIUM LAPPACEUM Y ZINGIBER OFFICINALE”**.

Para el efecto, he procedido a revisar aspectos de estructura gramatical, errores de construcción, acentuación, ortografía, puntuación, morfología, sintaxis, edición, estilo y formato, correcciones que se han recomendado incorporar en el presente documento. Además, se ha respetado, a lo largo del trabajo, el estilo propio del autor y su manejo de fuentes, así como el contenido del trabajo. Por ende, considero que está listo para su presentación.

Luis Fernando Montero Bonilla
Filólogo UCR - Carné ACFIL No. 263

Céd. 1-1533-0937

Tel. 8976-3536

e-mail: fseq28@gmail.com / crfilologo@gmail.com

Dedicatoria

Primordialmente, dedico esta investigación, así como la culminación de mi carrera, a Dios, porque me ha brindado las bendiciones y oportunidades, así como las fuerzas para luchar por ellas.

Le dedico este trabajo a mi mamá, quien es el timón de mi vida. Porque ha estado en cada momento apoyándome y dándome las alas para volar sola.

Agradecimientos

Le doy infinitas gracias a Dios por haber puesto en mi camino la oportunidad de estudiar Farmacia, dándome fuerzas y esperanza para seguir adelante cuando sentía que ya no podía más, para poder concluir con mi carrera y cumplir mi propósito de vida.

Agradezco a mi mamá, quien ha sido mi motor y mi inspiración de vida. Gracias por luchar por mí desde el día uno que supiste que estaba en tu vientre, porque sabías que íbamos a hacer un gran equipo que saldría adelante frente a todas las adversidades que se nos han presentado en la vida, y por hacernos cada vez más fuertes para estar listas para lo que nos depara el futuro. Gracias por compartir a mi lado los logros, pero también el llanto, y no dejarme caer, porque siempre vas a ser la mano que Dios tiene en la Tierra para sostenerme cuando esté a punto de caer.

A mi amiga Vale, quien me ha enseñado a creer en las segundas oportunidades; porque si no fuera así, no tendríamos este lazo de amistad que nos une ahora. Amiga, muchas gracias por ser mi apoyo incondicional tanto en cosas de la carrera, pero más importante mi hermana de vida. Me has enseñado que no nos debemos dejar derrotar por las adversidades de la vida, que tenemos que luchar incluso cuando no tengamos fuerzas, y que todos tenemos un valor único e incalculable que nos hace merecer lo mejor.

Agradezco a todas las personas que de una u otra manera me han brindado su apoyo y motivación a lo largo de mi carrera, quienes me han puesto en oración para que todo me saliera bien y me convirtiera en profesional. A una persona la cual llegó a ser muy importante en mi vida universitaria, que por situaciones de la vida, ambas tomamos rumbos separados, pero a la cual deseo muchos éxitos en su vida.

Mi agradecimiento especial a mi tutor Luis Castillo, quien me ha guiado desde el primer momento con esta investigación, por haber confiado en mí y por ha tenido la paciencia y la perseverancia para brindarme su apoyo como profesional y como amigo.

CAPÍTULO I: PROBLEMA

Planteamiento de Problema

Según la OMS, la resistencia bacteriana es uno de los tres problemas que se enfrentan a nivel de salud que amenaza la salud mundial. Se conoce que la industria farmacéutica no ha mostrado gran interés por desarrollar nuevos antibióticos en las últimas décadas debido a su baja rentabilidad, en comparación con los tratamientos para patologías crónicas, por lo que una de las pautas recomendadas por la OMS es fomentar la iniciativa de investigación para el desarrollo de nuevas opciones antimicrobianas (Quiñones, 2017).

La tendencia en síntesis de nanopartículas de plata ha tenido un enfoque en emplear la “química verde”, por lo que los extractos naturales han sido utilizados para sintetizar nanopartículas tanto de plata como de oro, las cuales han demostrado tener un gran potencial antimicrobiano contra bacterias y patógenos fúngicos, donde el principio de la investigación se centra en usar extractos de desechos de frutas como las cáscaras para aprovechar los recursos (Díaz, 2020).

Las aplicaciones en el campo médico de los nanomateriales han revolucionado la preservación de la salud, ya que se han brindado herramientas tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de una serie de patologías. Las líneas investigativas sobre sus aplicaciones se centran en su actividad antimicrobiana, como moduladores de la angiogénesis, el uso en la fabricación de vacunas, por su actividad antiinflamatoria, el uso en biosensores, la regeneración ósea y dental, así como en terapia tumoral (Gómez, 2019).

El interés en el uso de las nanopartículas se deriva de las propiedades físicas de su núcleo magnético, la alta relación entre superficie y tamaño, y la capacidad de unión molecular. Su pequeño tamaño facilita la interacción con las estructuras celulares, lo que ofrece una herramienta útil para la manipulación de distintas funciones y para interaccionar con estructuras subcelulares y moleculares. Por esto, son investigadas como agentes de contraste en imagen de resonancia magnética, como agentes terapéuticos que se encargan del transporte de fármacos a zonas específicas del organismo (Ramos y Castillo, 2011).

Con base en lo expuesto anteriormente, se plantea en este trabajo la siguiente pregunta en función del problema de la investigación, ¿pueden las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extractos de desechos de *Nephelium lappaceum* y *Zingiber officinale* tener actividad antimicrobiana para uso a nivel tópico?

Objetivos

Objetivo General

Crear nanopartículas de plata por un método de química verde empleando extractos de desechos naturales de *Nephelium lappaceum* y *Zingiber officinale* para el desarrollo de alternativas antimicrobianas de uso tópico.

Objetivos específicos.

- a) Definir la metodología de extracción mediante el diseño de experimentos para la obtención de los compuestos fitoquímicos que actuarán como agentes reductores en la formación de las nanopartículas de plata.
- b) Identificar las nanopartículas de plata mediante la ejecución de diversas pruebas fisicoquímicas.
- c) Evaluar la efectividad antimicrobiana de las nanopartículas formadas a través de estudios microbiológicos para la identificación de aquellas bacterias susceptibles a su acción.

Justificación

La presente investigación resulta conveniente debido al auge que ha tenido en las últimas décadas la aplicación de la nanotecnología en múltiples áreas como agricultura, medioambiente y farmacología. Sin embargo, la síntesis tradicional de las nanopartículas emplea productos químicos tóxicos y es un proceso costoso; por lo tanto, se ha buscado un enfoque que resulte sostenible, eco-amigable y económico para sus desarrolladores (Saravanan *et al.*, 2020).

Los beneficios que se busca obtener con este trabajo son las propiedades antibacterianas que presentan las nanopartículas, esto debido al incremento de la resistencia bacteriana, por lo que su uso biomédico podría representar una alternativa de tratamiento. Además, se han empleado en terapias antitumorales por su alta permeabilidad y porque su volumen de distribución permite concentraciones elevadas de fármacos en el tejido tumoral (Villamor, 2020).

El uso de las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas es trascendente, ya que se pueden aplicar por vía tópica en bajas concentraciones para tener el efecto antimicrobiano (Villa, Becerril y Soriano, 2019). En la biosíntesis de nanopartículas metálicas se emplean metabolitos de extractos naturales como alcaloides, fenoles, azúcares y proteínas, que las llegan a estabilizar,

además de depender de factores como el tipo de extracto, pH, temperatura y disolvente empleado (Al-Otibi *et al.*, 2021).

Tomando en cuenta lo anterior, el valor teórico de la investigación es el hecho de se pueden desarrollar agentes antimicrobianos a partir de nanopartículas metálicas y óxidos de metales, ya que presentan mayor estabilidad y bioseguridad en relación con los compuestos orgánicos, esto dependiendo del tamaño de las partículas, su morfología y propiedades tanto físicas como químicas. Además, se requieren concentraciones más bajas para obtener su efecto antibacteriano. (Betancur, Hernández y Buitargo, 2016).

Esta investigación tiene como utilidad metodológica contribuir a la definición del uso de nanopartículas de plata obtenidas por medio de extractos acuosos en el campo biomédico, debido a que constituyen una alternativa antimicrobiana frente a la resistencia bacteriana que ha aumentado con el paso de los años, como resultado del uso inadecuado de los antibióticos o por mutaciones de los microorganismos que los hace ser más resistentes (Betancur *et al.*, 2016).

Antecedentes

Antecedente Histórico

A lo largo de la historia, se ha señalado a la industria química como la mayor fuente de liberación tanto en variedad como en cantidad de sustancias con alta toxicidad. Por esta razón, se han destinado estrategias con el fin de controlar su contaminación, por lo que fue considerada la dilución de los químicos en los residuos con el objetivo de alcanzar las concentraciones permitidas por la ley. Sin embargo, el continuo crecimiento en la liberación de estos contaminantes en el ambiente provoca que aumente la necesidad de un mejor control en su tratamiento (Varsavsky, 2002).

Se ha pensado en la alternativa de una ciencia que a mediano y largo plazo pueda solucionar esta problemática ambiental, partiendo de una práctica de procesos que sean amigables con el medio ambiente y además tengan rentabilidad económica para sus desarrolladores. El principio anterior se conoce como química verde. El término surge con la finalidad de prevenir la contaminación en lugar de limpiar los residuos formados, ya sea reduciendo al máximo o eliminando en su totalidad la causa de la contaminación (Reyes, 2012).

El nacimiento de la química verde se dio en la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por su acrónimo en inglés), en Estados Unidos, a inicios de 1990, para constituirlo como una

herramienta que proteja al medio ambiente de la contaminación química. Para lograr este fin, las industrias se deben adueñar del término tanto por implicaciones éticas como económicas. Su aplicación se vuelve rentable debido a la reducción en el uso de las sustancias que son nocivas tanto en temas de salud como ambientales, pero sin disminuir las ventajas sociales que se obtienen de la actividad industrial (Mestres, 2013).

La química verde va a comprender la modificación en la naturaleza intrínseca tanto de los productos como de los procesos, con el fin de reducir los riesgos que estos representan para la salud y el medio ambiente, además de beneficiar a la industria en el ámbito económico; así como fomentar la interdisciplinariedad, incorporando la ingeniería, la biología, la economía y la ética para presentar un enfoque en el desarrollo del aprendizaje científico (González, 2015).

El término nanotecnología fue empleado por primera vez en 1974 por Norio Taniguchi para definir una técnica de producción en escala nanométrica, en la cual se involucran procesos de separación, consolidación y deformación de los materiales por medio de un solo átomo o molécula. Se da la producción de nanopartículas a partir de algún material metálico como plata, hierro, oro y óxidos metálicos; sin embargo, las más usadas son las que se sintetizan a partir de iones de plata, por sus propiedades fisicoquímicas y biológicas (Gómez, 2018).

Antecedentes Internacionales

Los autores Robles, Rodríguez y Pataquiva (2019) describen en su publicación “Síntesis de nanopartículas de magnetita a partir del extracto de cáscara de papaya para la degradación de colorantes azoicos en soluciones acuosas” el interés que se le ha dado a las nanopartículas metálicas por sus propiedades fisicoquímicas y la posibilidad de emplear estas en pro de la salud. Se realizó una reacción simple y ecológica con el extracto de la cáscara de papaya para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas, donde el agente reductor fue la glucosa de las cáscaras. Los resultados se evaluaron por medio de microscopia infrarroja y la prueba SEM determinó el tamaño nanométrico y su morfología. Por lo que se determinó que la cantidad de glucosa en la cáscara de papaya sí permite la obtención de las nanopartículas.

Castro (2018), en su trabajo de tesis titulado *Elaboración de nanopartículas de plata vía síntesis y compuestos orgánicos de Púnica Granatum y catálisis bacteriana de Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Aspergillus niger*, evalúa la efectividad antibacteriana por medio de la síntesis de nanopartículas de plata con un extracto de cáscara de granada como agente reductor de los componentes orgánicos. Se emplea la granada como extracto orgánico, debido a que en Ecuador

(país donde se llevó a cabo la investigación) no se da una producción sostenible, por lo que se busca un cultivo razonable a causa del proyecto. La identificación de las nanopartículas se realizó por medio de espectrofotometría UV-Vis, y su tamaño entre 10-20nm de forma esférica se dedujo por microscopia electrónica de barrido. Las nanopartículas obtenidas demostraron tener actividad catalítica antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*.

En el año 2017, Travieso, Rubio y Pino, en el artículo titulado “Las nanopartículas a partir de plantas como base para el diseño de nuevos antimicrobianos”, desarrollaron una revisión en bases de datos abordando el conocimiento del tratamiento de problemas de salud, que son tratados con nanopartículas, clasificación, morfología, estructura, métodos de obtención y caracterización. Se da relevancia a las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas que han sido sintetizadas a partir de fuentes botánicas y sus aplicaciones biomédicas con la síntesis verde, por las ventajas de ser un proceso simple, de un costo bajo, biocompatible, reproducible y de fácil empleo de prácticas que son amigables con el medio ambiente; lo que a su vez representa una posible solución en temas de salud debido a la alta resistencia de los microorganismos. Se buscan nuevos enfoques para el descubrimiento de alternativas que sean empleadas con fines terapéuticos.

En 2016, Mercado menciona en su investigación “Uso de residuos orgánicos domiciliarios en la obtención de materiales útiles de interés ambiental y nanotecnológico”, que en los residuos domiciliarios se encuentra gran número de biomoléculas, las cuales son aprovechadas para la producción de energía térmica o eléctrica. Sin embargo, los métodos tradicionales empleados para la producción de nanomateriales tienden a generar subproductos tóxicos, por lo que se están aprovechando las biomasas vegetales con la utilización de extractos acuosos para obtener los productos que se desean. Al utilizar el extracto hidrosoluble de la Yerba Mate como agente reductor y estabilizante superficial, se logró obtener las nanopartículas de plata con geometría semiesférica, las cuales se identificaron por medio de espectrometría de masas y espectroscopia UV-Vis.

Antecedentes Nacionales

El Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC), en conjunto con la Universidad Privada del Norte de Perú, titulan su investigación “Proyecto Costa Rica-Perú contra el virus SARS-CoV-2” (2021), la cual está centrada en el uso de nanopartículas metálicas para mejorar las mascarillas, porque son capaces de inhibir la replicación de ciertos virus, entre ellos el SARS-CoV-2, para lo cual toman cuenta la síntesis verde por el alto costo y la contaminación que implica el

uso de reactivos para la fabricación de las nanopartículas por métodos tradicionales (no se dispone de más información de la parte experimental).

Barrantes y Ortega (2020) recalcan en su artículo de revisión “Nanopartículas y antibióticos: respuesta a la resistencia global bacteriana” que la resistencia bacteriana es una problemática de salud pública que se ha dado por un uso inadecuado y excesivo de los antibióticos; por lo que la nanociencia ha permitido desarrollar nanopartículas que posean características farmacocinéticas y fisicoquímicas únicas, como su facilidad para atravesar barreras anatómicas, además de sus propiedades antimicrobianas, que tienen una expectativa prometedora de superar los mecanismos de resistencia de los microorganismos presentando una alternativa al problema. Por lo que se concluye que en el campo farmacológico poseen un gran potencial antibacteriano contra algunos de los patógenos con mayor prevalencia mundial.

La autora Montes de Oca participó en dos investigaciones en los años 2017 y 2018 sobre biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de extractos de *Mentha piperita* e *Ilex paraguariensis* (yerba mate) respectivamente, en las cuales se destacó la importancia de llevar a cabo la síntesis verde de nanopartículas de plata por su interés biomédico, ya que presentan efecto inhibitorio contra cepas de bacterias resistentes en su aplicación en cremas y pomadas tópicas para evitar infecciones. Su síntesis se dio por medio del uso de los respectivos extractos: menta y yerba mate; con una solución de nitrato de plata para luego realizar su caracterización. Con las investigaciones se logró determinar que las nanopartículas formadas sí poseen propiedades antimicrobianas contra bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Proyecciones

- Se pretende generar un diseño de experimentos para optimizar la obtención de los compuestos fitoquímicos para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de plata.
- Se desea sintetizar nanopartículas de plata usando una alternativa de química verde, que consiste en el uso de extractos acuosos a partir de desechos naturales, en este caso, las cáscaras de frutas como el rambután o restos de jengibre, para evitar el uso de solventes químicos que puedan resultar tóxicos en su uso en el campo farmacológico.
- El propósito de esta síntesis es la posibilidad de llegar a formular una forma farmacéutica tópica a base de las nanopartículas de plata, como tratamiento de

infecciones bacterianas cutáneas y evitar el uso de los antibióticos tradicionales, partiendo del hecho de que las nanopartículas de plata sintetizadas con los extractos de los desechos naturales de *Nephelium lappaceum* y *Zingiber officinale* presenten actividad antimicrobiana.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

Diseño de Experimentos

El diseño de experimentos (DoE, por su acrónimo en inglés) consiste en una técnica en la cual se realiza una serie de experimentos en los que se inducen cambios en las variables de un proceso, lo que permite observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida. Esta técnica podría mejorar el rendimiento de un proceso y una reducción en la variabilidad o los costos de producción. Se aplicó por primera vez el diseño de experimentos en Inglaterra por R.A. Fisher en el campo de la agricultura en los años veinte, lo que llevó a la publicación de su libro *Design of Experiments* en 1953 (Iizarbe, Tanco, Viles y Álvarez, 2007).

Los posteriores desarrollos fueron encabezados por George E. P. Box, quien desarrolló la metodología de superficie de respuestas, donde se incluye una nueva familia de diseños y una estrategia para la experimentación secuencial. Entre 1950 y 1980, DOE se convirtió en una herramienta de aplicación en las áreas de investigación y desarrollo. Hasta la década de los 70, su aplicación en procesos de manufactura no era generalizada por la falta de recursos computacionales, y el hecho de que los ingenieros y especialistas en manufactura carecían de formación en el área estadística (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

En la década de 1980, se dio un impulso al conocimiento y aplicación del DoE por su éxito en calidad de la industria japonesa. El movimiento por la calidad encabezado por Deming e Ishikawa llegó a implementar el uso de la estadística en la calidad, por lo que el diseño de experimentos demostró su funcionalidad para la resolución de problemas como para el diseño de productos mejores y procesos. El trabajo de Genichi Taguchi destaca en Japón, donde sus conceptos del diseño robusto causaron un impacto significativo en el mundo occidental, y como respuesta al movimiento por la calidad y mejora en procesos, la industria empezó a entrenar a los ingenieros en la aplicación de DOE (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

Se considera esencial el diseño de experimentos como una estrategia para planificar experimentos, de forma que las conclusiones con mayor relevancia se puedan alcanzar de manera económica y eficiente. Para la elección de un plan experimental específico, va a depender del tipo de preguntas a las cuales se busca darles respuesta, el grado que se vincula con las conclusiones y los recursos disponibles (como el material experimental, el personal y el tiempo); por lo que, si un

experimento que ha sido diseñado y ejecutado apropiadamente permite que se dé un análisis estadístico e interpretación de resultados de forma simple (Napolitano, 2006).

Los estudios experimentales de efectos fijos son empleados para el estudio del efecto de las variables que sean controladas por el investigador, ya sea sobre una o varias variables respuesta que representen un fenómeno de interés. La metodología que se emplea para probar la causalidad al fijar los niveles de las variables explicativas, se denominan factores y evaluar los cambios que se generan sobre las variables respuesta. Una de las ventajas que representa este tipo de estudios es el hecho de no requerir de muchas unidades muestrales (conocidas como unidades experimentales) o réplicas, por el hecho de que la fuente de variabilidad se controla, ya que se garantiza igualdad de condiciones en cada corrida o ejecución del experimento (Salazar y Baena, 2009).

Según Napolitano (2006), un adecuado diseño de experimentos debe:

- Incorporar la experiencia y el conocimiento previo para la selección de los factores, niveles y la descripción de las suposiciones.
- Pulir la información importante implicando la menor demanda de esfuerzo.
- Asegurar, previo al inicio del experimento, que el diseño es capaz de alcanzar el objetivo planteado con la precisión deseada.
- Especificar el arreglo y la secuencia de la parte experimental para evitar que haya disconformidades durante el progreso del experimento.

Por su parte, Gutiérrez y De la Vara (2012) afirman que con el uso de DoE se pueden realizar los siguientes análisis:

- Comparación entre materiales con el propósito de elegir al que mejor cumpla con los requisitos.
- Comparación de instrumentos de medición para conocer si trabajan en igualdad de condiciones de precisión y exactitud.
- Determinación de los factores que impactan el proceso del producto final.
- Reducción del tiempo de ciclo del proceso.
- Creación de un proceso en el cual las oscilaciones de variables ambientales no generen afectación.

- Conocimiento de las condiciones de operación como el caso de la temperatura, velocidad, humedad, entre otras; que reduzcan los defectos y se logre un mejor desempeño del proceso.
- Apoyo de la estrategia de rediseño o diseño de nuevos productos o procesos.

Asimismo, Gutiérrez y De la Vara (2012) sostienen que en todo proceso intervienen diversos tipos de factores o variables:

- Variable(s) de respuesta: que permite conocer el efecto o los resultados que se obtendrán con cada prueba experimental, por lo que puede representar una característica de la calidad del producto o alguna variable que mida el desempeño un proceso. Se pueden denotar con la letra y .
- Factores controlables: representan variables de proceso o características de los materiales experimentales que se fijan a un nivel dado, usualmente son controlados durante la operación. Se pueden distinguir por el hecho de que cada uno tiene una manera o mecanismos que permiten manipular o cambiar su nivel de operación. Algunos de estos factores son temperatura, velocidad, presión, tiempo de residencia, cantidad de cierto reactivo, tipo del reactivo, modo de operación, entre otros. También se les conoce como las x de un proceso, variables de diseño, condiciones de proceso, parámetros del proceso, o simplemente factores.
- Factores no controlables o de ruido: son variables o características de materiales y métodos que no se logran controlar durante el proceso. Dentro de ellos se encuentran las variables ambientales (como la luz, humedad, temperatura, partículas, ruido), el ánimo de los operadores, la calidad del material que brinda el proveedor. Un factor considerado no controlable, se puede convertir en uno controlable, siempre y cuando se cuente con el mecanismo o la tecnología para este fin.
- Factores estudiados: son variables en las que se investiga su influencia o afectación a las variables de respuesta. Para que un factor pueda ser estudiado se debe haber probado en, al menos, dos niveles o condiciones durante el experimento.
- Niveles y tratamientos: los niveles son los diferentes valores que se le asignan a los factores estudiados en un diseño experimental. La combinación de niveles de los factores estudiados se conoce como tratamiento o punto de diseño. En el caso que se desee experimentar con un solo factor, cada nivel corresponde a un tratamiento.

- Error aleatorio y experimental: en un estudio experimental, el error aleatorio es la variabilidad que se observa en la respuesta y no se puede explicar por los factores estudiados, ya que se debe a causas comunes o aleatorias que van a generar variabilidad natural en el proceso. El error experimental está dado por el hecho de que el error aleatorio absorberá todos los errores que el experimentador cometa durante el experimento y si tiene mayor gravedad que el primero.

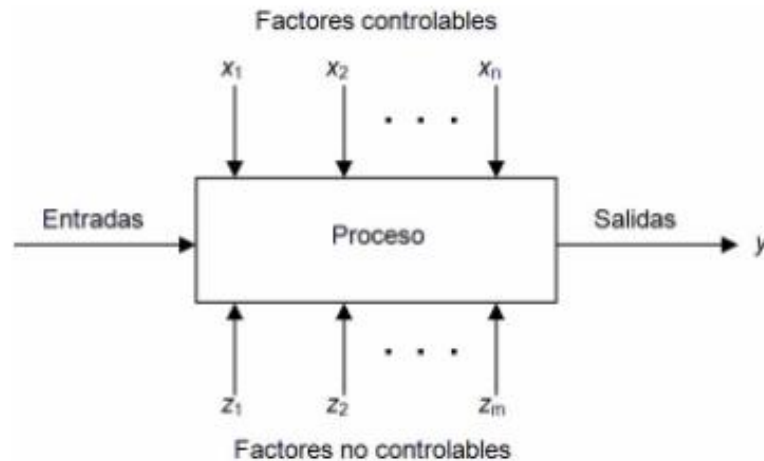


Figura 1. Diagrama de diseño de experimentos.

Fuente: Yepes, 2013.

Tipos de diseños de experimentos.

La clasificación general de los diseños de experimentos se realiza con base en su objetivo. Se pueden clasificar dependiendo del número de factores, el tipo de efectos que se pretende analizar y las restricciones existentes (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

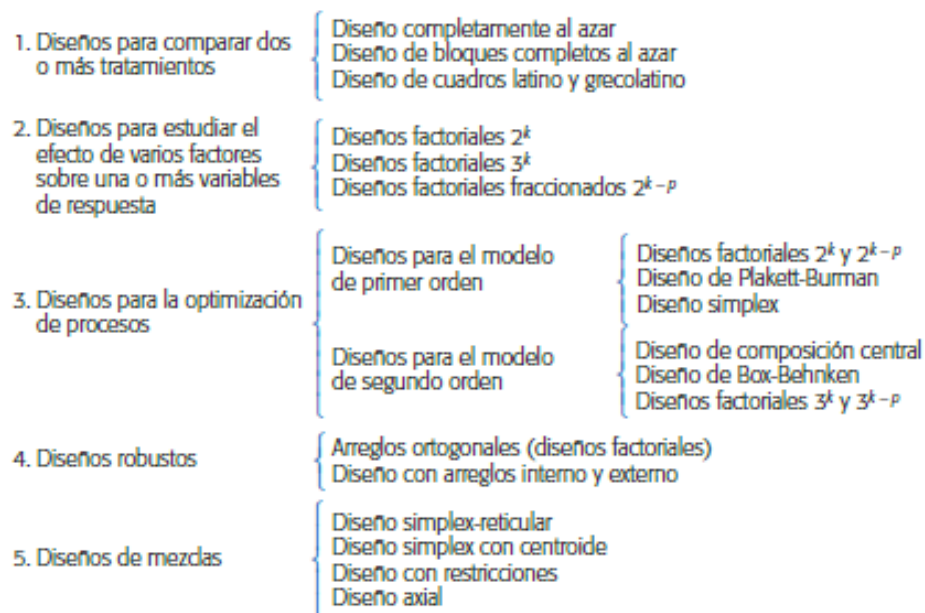


Figura 2. Clasificación de los diseños experimentales.

Fuente: Gutiérrez y De la Vara, 2012.

Diseño factorial.

Es un diseño experimental empleado para el estudio del efecto individual y de la interacción de varios factores sobre una o varias respuestas cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores. Su objetivo es determinar una combinación de niveles de los factores en los que el desempeño del proceso mejore. Los factores pueden ser cualitativos, como máquinas, tipos de material, presencia o ausencia de una operación previa o los operadores, y de tipo cuantitativo como humedad, velocidad, presión o temperatura (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

Al estudiar la influencia de cada factor sobre la variable de respuesta, se debe elegir al menos dos niveles de prueba para cada uno. Con el diseño factorial completo, se corren de manera aleatoria todas las combinaciones posibles que se pueden formar con los niveles de los factores a investigar (Gutiérrez y De la Vara, 2012). Sin embargo, cuando la cantidad de factores o sus niveles permiten que el tamaño del experimento sea grande, se opta por un diseño factorial completo y se deben realizar corridas adicionales para investigar cuál es la variación en la respuesta para cada combinación, y poder estimar el ruido experimental (Napolitano, 2006).

El diseño factorial completo ensaya todas las posibles combinaciones de tratamientos que se produzcan con los diversos niveles de los factores que se estén estudiando. Por ejemplo, si se analizan dos factores, siendo a y b , el primero con dos niveles y el segundo con tres niveles, resulta

ser un diseño factorial completo de 2×3 , dando como resultado seis combinaciones de tratamientos. Por otra parte, el diseño factorial incompleto se encarga de realizar ensayos con algunas de las posibilidades de combinaciones que se pueden generar (Gutiérrez, 2017).

Diseño de bloques.

Si se desea comparar algunos tratamientos o realizar un estudio de un factor, se desea que las posibles diferencias se deban principalmente al factor de interés y no a otros factores que no son contemplados en el estudio, pero cuando esto no ocurre y hay otros factores que no son controlados o que se vuelven nulos para hacer la comparación, se podrían ver afectadas las conclusiones de manera relevante (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

A los factores adicionales al de interés y que son incorporados explícitamente en un experimento comparativo se les denomina “factores de bloque”. Tienen la particularidad de no ser incluidos en el experimento por el interés de analizar su efecto, sino como un medio para estudiar el factor de interés con mayor eficacia. Los factores de bloque se incorporan al estudio con un nivel de relevancia secundaria en relación con el factor de interés (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

Diseño factorial fraccionado.

Consiste en un diseño en el cual se elige de manera adecuada una fracción de los tratamientos de un diseño factorial completo, con el propósito de estudiar el efecto de los factores usando menos corridas experimentales. La teoría de los diseños fraccionados está basada en la jerarquización de los efectos: la importancia de los efectos principales, luego las interacciones dobles, luego las triples, y así sucesivamente (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

Cuando se analizan muchos factores en los diseños factoriales completos, tiende a haber un exceso de información, por lo que se puede “sacrificar” información con menor relevancia en aras de un diseño manejable con respecto al número de análisis experimentales. El aumento en la cantidad de factores es directamente proporcional al incremento del número de tratamientos en los diseños factoriales completos 2^k , sin embargo, en la práctica no es posible realizar tantas corridas experimentales, y con esto, entre mayor sea el valor de k , mayor es el grado de fraccionamiento que se puede aplicar a la corrida. (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

La notación 2^{k-1} representa una fracción del diseño factorial completo 2^k , cuyo propósito es fraccionar cuando el valor de k es mayor a 2. Este tipo de diseño es empleado cuando la opción de recursos es reducida, o en el caso de que el número de factores incluidos en el diseño sea grande.

En su aplicación práctica, en lugar de la creación de un diseño factorial completo en el cual luego se deban eliminar factores hasta llegar a una fracción deseada, lo que se crea es un diseño completo con el número de corridas que se eligen, y posteriormente, se añaden los factores adicionales al diseño (Torres *et al.*, 2020).

Cabe destacar que, según Gutiérrez y De la Vara (2012), al reducir el número de corridas experimentales por ser una fracción del diseño factorial completo, pueden ocurrir dos hechos inevitables:

- La pérdida de información debido a que habrá efectos que no se podrán estimar y hay menor grado de libertad para el error. Se espera que los efectos que se pierden sean interacciones de alto orden, las cuales se pueden ignorar con bajo riesgo de antemano.
- Los efectos que sí son estimables tienen al menos un alias. Un “efecto alias” representa que son el mismo efecto, pero con nombres distintos, por lo que, al estimar a uno de ellos, se estima el otro al mismo tiempo.

Diseño Taguchi.

El diseño robusto tiene como origen las ideas de Genichi Taguchi, un ingeniero japonés que desarrolló su propia filosofía y métodos de ingeniería de la calidad desde 1950. En esta filosofía se establece que la calidad de un producto se debe medir en términos de abatir al mínimo las pérdidas que el producto le trae a la sociedad, desde el inicio de su fabricación hasta que concluye el ciclo de vida.

El diseño consiste en la determinación de los niveles de los parámetros o factores de proceso, de tal manera que cada característica del producto tenga la variación mínima alrededor del valor meta. El objetivo del diseño Taguchi es lograr procesos y productos robustos frente a las causas de la variabilidad (ruidos), que ocasionan que las características funcionales de los productos se desvíen de los valores óptimos, causando así costos de calidad (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

Según la ideología de Taguchi, se puede incorporar la calidad en los productos desde su diseño sin realizar ningún incremento en su costo. Los inconvenientes se deben solucionar en el laboratorio de diseño, no en la fábrica. Tomando en cuenta esta perspectiva, se necesitan desarrollar productos robustos que sean capaces de tolerar las variaciones a lo largo del proceso de producción y durante el servicio de mantenimiento (Yacuzzi *et al.*, 2004).

La ingeniería de la calidad de Taguchi busca combinar métodos estadísticos y de ingeniería con el fin de optimizar los procesos de diseño y fabricación para que se incremente la calidad y se reduzcan los costos. A su vez, el diseño de experimentos tiene un papel esencial en el diseño Taguchi, ya que logra identificar los factores que mayor intervención tienen en la aparición de problemas de calidad o los factores que contribuyen a obtener resultados positivos (Yacuzzi *et al.*, 2004).

Diseño compuesto de respuesta de superficie.

Con el trabajo de Box y Wilson en 1951, la técnica para superficies de respuestas ha sido aplicada con gran éxito en áreas como la agricultura, investigaciones biológicas, desarrollo de productos alimenticios y la ingeniería química. Para poder estimar una superficie de respuesta, los modelos lineales de orden menor o igual a tres se emplean con frecuencia por ser fáciles de interpretar. Las bases metodológicas para superficies de respuesta están derivadas de la teoría del modelo lineal general, suponiendo que existe una variable de respuesta que va a depender de variables cuantitativas independientes por medio de una función que es complicada o desconocida (Briones y Martínez, 2002).

Este diseño es empleado para el desarrollo de respuestas de superficie, para poder encontrar las combinaciones óptimas de los factores de nivel, aunque haya presencia de interacciones y no linealidad, y en los casos en los que se considera la no linealidad de primer orden y dos interacciones. Estos diseños consisten en tres tipos de puntos: factoriales 2^k , axiales $2k$ y n puntos centrales, siendo k el número de factores de ensayos necesarios para el diseño central completo, el cual es: $2^k + 2k + n$. (Napolitano, 2006)

Diseño mezcla.

Consiste en una clase especial de experimento en el cual la respuesta va a depender únicamente de las proporciones relativas de los factores o ingredientes y no de las cantidades absolutas. Son aplicadas a productos que comprenden una mezcla de dos o más factores que optimizan el desempeño de varias combinaciones y mezclas. Este diseño está en la forma Simplex. Para dos componentes, el espacio de la mezcla da en línea recta, para una mezcla de tres componentes el espacio corresponde a un triángulo equilátero, y para una mezcla de cuatro componentes es un tetraedro (Napolitano, 2006).

Según Gutiérrez, y De la Vara (2012), los objetivos de un experimento de mezclas son:

- Determinar los ingredientes de la mezcla o las interacciones entre ellos que poseen más influencia sobre una o varias respuestas de interés.
- Modelar las respuestas que son de interés, esto en función de las proporciones de los componentes de la mezcla.
- Emplear los modelos para determinar el porcentaje de participación de cada ingrediente, para lograr que la fórmula cuente con las propiedades deseadas.

En resumen, la finalidad del diseño de experimentos con mezclas es la cuantificación de la influencia que presentan los diversos componentes sobre la respuesta, tanto individual como en su acción conjunta con los demás componentes. El fin es modelar la respuesta con tal de predecirla en cualquier formulación posible, y usar los modelos con el objetivo de encontrar la composición de la mezcla que mejor genere resultados (optimizar). Se deben tomar en cuenta las particularidades de los experimentos con mezclas, ya que no son aplicables los diseños factoriales tradicionales, así como los polinomios estándar, debido a que algunos parámetros carecerán de sentido y las pruebas estadísticas tradicionales pueden generar confusiones (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

Nanotecnología

La nanotecnología se define como la rama de la ciencia referente a temas de tecnología que se encarga del diseño y manejo de las materias como átomos o moléculas, que son empleados para la fabricación de productos a microescala que serán utilizados con fines industriales, médicos, entre otros. Por lo que los nanomateriales son sustancias que se caracterizan por encontrarse entre 1 y 100nm, y que a su vez muestran propiedades químicas, físicas y biológicas que no se encuentran en muestras de mayor volumen, incluso del mismo material (Urquilla, 2019).

A su vez, es considerada el “*boom*” de la nueva tecnología que podría llegar a ser revolucionaria y que posee un crecimiento vertiginoso, por lo que ha sido vigilada desde varias perspectivas para que sea cumplido el principio de precaución, siendo considerada incluso como la protagonista de la próxima revolución científica. Se puede pensar que sectores como las telecomunicaciones, electrónica, energías renovables, medicina, cosmética, alimentación, farmacología, entre otros, van a obtener beneficios del desarrollo de las nanotecnologías (Bacallado, 2018).

La nanotecnología es el primer paso hacia la nanomedicina, y se puede definir como la ciencia que se encarga de monitorizar, reparar, construir y controlar tanto componentes como funciones biológicas en seres humanos con el uso de sistemas en nanoescala. La nanomedicina es

considerada una rama que permite realizar un abordaje en patologías, ya sea en el ámbito diagnóstico, preventivo o para dar tratamiento desde el interior del organismo. Se podría mejorar el conocimiento de las vías de señalización y regulación del comportamiento de las células normales y transformadas (Guerrero, Caicedo y Guerrero, 2017).

En los últimos años, la nanotecnología ha tenido un amplio desarrollo tanto en aplicaciones como en alcances. Las propiedades únicas de los nanomateriales (nanopartículas, nanobarras, nanocristales, nanocápsulas, dendrímeros) han brindado particular atención en su uso en distintas áreas como en fármacos, bioingeniería, suelos contaminados y remediación de agua (Martínez, Carrillo y González, 2017). La nanotecnología se ha empleado en la fabricación de vehículos para poder aplicar principios activos en la piel, esto debido a que se puede alcanzar capas profundas de esta, incluso es posible sintetizar sistemas de liberación sostenida o modificada (Blázquez, 2018).

De las aplicaciones más extendidas de la nanotecnología en medicina está el área de la farmacología, principalmente en los sistemas de transporte y liberación de fármacos. En este ámbito se emplean nanopartículas que se encuentran cargadas con principios activos que necesitan ser transportados por el organismo y que sean liberados en sitios específicos para ejercer su acción terapéutica (Frutos, 2017).

A su vez, los sistemas de liberación de medicamentos surgen como consecuencia de la poca posibilidad de trasladar directamente los principios activos. Por esta razón, estos sistemas son diseñados para lograr que la liberación de los fármacos se dé en el sitio adecuado y en la cantidad correcta. Estos vehículos deben cumplir con características como baja toxicidad, óptimas propiedades de transporte y de liberación, así como una vida media larga. Los principales nanosistemas usados con este fin son las micelas, los liposomas, los dendrímeros, las nanopartículas, los nanotubos y los conjugados poliméricos (Ortiz *et al.*, 2015).

Nanopartículas

Métodos de síntesis.

Son entidades ultrafinas cuyo tamaño es nanométrico, donde el prefijo “nano” describe la potencia 10^{-9} m. La definición de nanopartículas puede variar según la morfología y dimensión de los materiales y sus aplicaciones. Los nanomateriales se pueden sintetizar por varios métodos, los cuales se clasifican en dos grandes categorías: de arriba hacia abajo y de abajo hacia arriba. La primera consiste en la extracción del material a partir de un objeto de mayor escala para la creación

de las nanoestructuras. La categoría de abajo hacia arriba hace referencia a que a partir de bloques de construcción (moléculas, átomos) que son ensamblados, se hacen estructuras más grandes, hasta alcanzar la nanoescala (Aguilar y Rosas, 2016).

Top-down.

En la técnica de “arriba hacia abajo” se emplean formas mecánicas, químicas y otras formas energéticas con el fin de descomponer los materiales macroestructurados en componentes que sean más pequeños. Sin embargo, el mayor inconveniente de esta categoría es la imperfección de la estructura superficial que podrían tener un impacto significativo en las propiedades fisicoquímicas superficiales por su relación con superficie-volumen (Arenas, 2017).

Según Fu *et al.* (2018), los métodos de fabricación de “arriba hacia abajo” que son usados para la fabricación de nanopartículas para aplicaciones biomédicas son:

- Fotolitografía: emplea luz transfiriendo un patrón geométrico de una fotomáscara a una capa protectora fotosensible sobre el sustrato; luego, por una serie de tratamientos químicos, se graba el patrón en el material debajo del fotorresistente.
- Litografía de interferencia: es un método de fotolitografía en el cual no se usa máscara y hay una sola exposición corta de fotorresistente a las ondas de luz que crean patrones a nanoescala de alta densidad en un área mayor.
- Litografía por haz de electrones: los electrones son enfocados y se aceleran hacia una capa delgada del material que es fotorresistente que cubre el sustrato. Con la colisión de los electrones en el volumen de interacción de los electrones incidentes se inducen las propiedades químicas modificadas.
- Litografía con “nanoestencil”: se usan plantillas (máscaras de sombras) con aperturas de tamaño nanométrico, donde el proceso es simple, paralelo y sin resistencia, pero no implica que no haya tratamiento térmico o químico de los sustratos.
- Litografía de nanoimpresión: se presiona un molde duro que tiene los patrones en relieve de la superficie en una capa de polímero calentándolo sobre su temperatura de transición vítrea. Cuando se enfría, el polímero se solidifica y se puede separar de la plantilla, dejando el patrón impreso.

- Litografía de nanoesferas: técnica de alto rendimiento, paralela y económica, que es fácil de implementar que es capaz de producir gran variedad de estructuras de nanopartículas y matrices de nanopartículas 2D.

Bottom-up.

Esta técnica se centra en la construcción de estructuras a partir de componentes moleculares y atómicos. Esta metodología es empleada como un enfoque principal en nanotecnología, porque permite el control preciso de la materia. Se ensamblan estructuras pequeñas con el fin de desarrollar estructuras mayores, por lo cual se emplea cuando se desea trabajar con materiales complejos (Aguayo, Zarzuela y Lama, 2012).

Como menciona Arenas (2017), los principales procesos de esta técnica son:

- Autoensamblaje: corresponde a la asociación espontánea del conjunto de moléculas en una o más estructuras supramoleculares que son impulsadas por interacciones no covalentes como enlaces de hidrógeno, atracción electrostática y fuerzas de Van der Waals que son controladas por el efecto hidrófobo.
- Síntesis química húmeda: se involucra el uso de disoluciones, ya que es un método químico barato, no tóxico, con una inversión de tiempo relativamente baja, simple por contener pocas sustancias químicas, y no se requieren instrumentos costosos.
- Microemulsión: técnica que permite controlar las propiedades de las partículas como el tamaño, la morfología, la homogeneidad, la geometría y la superficie.
- Sol-gel: método empleado para la fabricación de materiales a partir de una solución química que va a actuar como precursor de una red integrada de partículas discretas.
- Deposición de vapor: herramienta fundamental en la producción de la mayoría de la electrónica actual. Esta técnica está sujeta a refinamiento y expansión constante, lo que conduce a nuevas investigaciones en nuevas direcciones.

Métodos de caracterización.

Una vez sintetizadas las nanopartículas, se debe llevar a cabo la caracterización de estas por medio de diversas técnicas, dentro de las cuales se destacan: TEM (Microscopio Electrónico de Transmisión), HRTEM (Microscopio Electrónico de Alta Resolución), SEM (Microscopio Electrónico de Barrido), AFM (Microscopía de Fuerza Atómica), XRD (Difracción de Rayos X), UV-Visible (Espectroscopía ultravioleta visible) y FT-IR. Con estas técnicas se da el

reconocimiento del tamaño de las nanopartículas, así como su dispersión y estructura de los átomos que se unen para formarlas (Chamé, 2013).

Microscopio electrónico de transmisión.

Los microscopios que han sido construidos con radiación de electrones tienen gran utilidad en el estudio de materiales en la actualidad, ya que los electrones por su carga y energía tienen fuerte interacción con los átomos que conforman la muestra en estudio. Los electrones inciden sobre la muestra interactuando a nivel atómico con los elementos químicos que los conforman, y los resultados obtenidos muestran únicamente la zona de interacción y sus cercanías. Su interés en el uso con nanomateriales es por el hecho de que se puede obtener información de una sola nanopartícula o solo de la zona de esta (Paraguay, 2020).

Microscopio electrónico de barrido.

El microscopio electrónico de barrido emplea un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar la imagen. Se encarga de producir imágenes de alta resolución que permiten que las características espacialmente cercanas en la muestra se puedan examinar en alta magnitud. El microscopio cuenta con una sonda de composición semicuantitativa, la cual, por medio de energía dispersiva de rayos X, puede determinar los elementos que se encuentran en la muestra y su cantidad en el peso molecular (Duque, 2017).

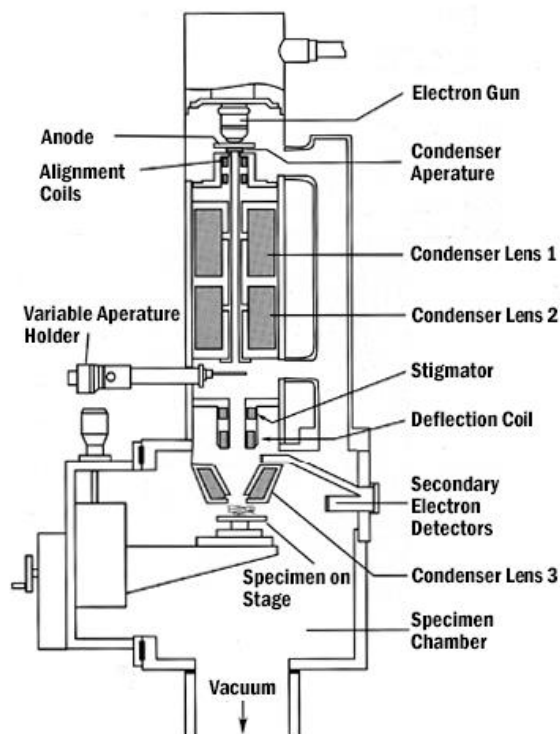


Figura 3. Esquema del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido.

Fuente: Duque, 2017.

Su propósito es el estudio de la superficie de los materiales. La ventaja que representa en comparación con el microscopio óptico es la utilización de un mayor número de señales que provienen de la interacción de los electrones con la muestra, y con esto se brinda información sobre la topografía, la composición química, la orientación cristalina y su potencial eléctrico (Rivera y Arenas, 2019).

Microscopía de fuerza atómica.

Su principal aplicación es crear imágenes de superficies en alta resolución, además de proporcionar información de las propiedades mecánicas del material en estudio con una resolución atómica. Dentro de las propiedades que se pueden determinar se encuentran la adhesión, la dureza, la rigidez, la fuerza máxima, el módulo de elasticidad, la disipación de energía, el tiempo de contacto y las fuerzas de largo enlace. Su función es realizar un barrido sobre la superficie de la muestra para ser evaluada, tomando datos para determinar las características topográficas y de fase del material (García y Kikut, 2020).

Difracción de Rayos X.

La difracción de rayos X representa una de las técnicas más eficaces para análisis cuali-cuantitativos de fases cristalinas de cualquier tipo de material, ya sea natural o sintético. Los rayos X tienen longitudes de ondas semejantes a las distancias interatómicas en los materiales cristalinos, por lo que se emplea esta técnica para explorar las estructuras a escala molecular. Se emplea para conocer con exactitud la estructura molecular de cualquier material, ya sea un mineral, un compuesto inorgánico, una proteína o un virus (Duque, 2017).

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas de la misma naturaleza de la luz, pero con una longitud de onda más corta. A su vez, la interacción de los rayos X con la muestra se da por medio de dos procesos: uno en el cual los fotones del haz incidente se desvían sin pérdida de energía, estableciendo una radiación dispersada con una longitud de onda igual a la radiación incidente; y otro en el cual fotones se dispersan con una pequeña pérdida de energía, constituyendo una radiación incidente ligeramente mayor (Torrontegui, 2018).

Espectroscopía infrarroja.

La espectroscopía infrarroja (IR) consiste en una técnica rápida y no destructiva que se emplea en el análisis de muestras, en la cual se utiliza la región de infrarrojo para conocer la información acerca los enlaces moleculares para dar detalles sobre el tipo de moléculas. La absorción molecular genera excitación de los modos vibracionales fundamentales, así como los cambios en la energía rotacional (Téllez, 2019).

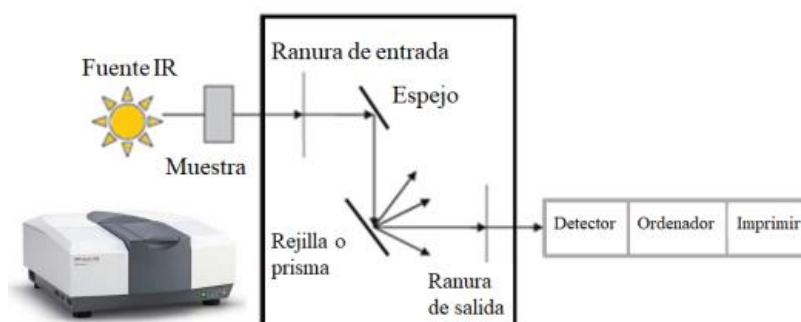


Figura 4. Espectrofotómetro infrarrojo y las partes fundamentales.

Fuente: Téllez, 2019.

Este método es empleado con el fin de estudiar la absorción o emisión de energía radiante que es producida por la interacción entre la radiación electromagnética y la muestra que se está

analizando. El IR se basa en la posibilidad de rotación de las moléculas y las vibraciones a diferentes frecuencias (modos normales vibracionales). Las moléculas absorben la energía de los fotones en el rango energético del IR en el caso de que haya una diferencia en el momento bipolar de la molécula cuando ocurre un movimiento vibracional rotacional y cuando la frecuencia se encuentra asociada a la radiación resuena con el movimiento vibracional (Piqué y Vásquez, 2012).

Existen modos vibracionales que se encargan de inducir las oscilaciones para entrar en resonancia con un haz de IR, lo que genera un intercambio de energía entre el haz y las moléculas de la muestra. Se presenta un movimiento característico para un enlace con un tipo atómico, un entorno químico y una concentración determinada de enlaces. En el espectro infrarrojo se manifiestan bandas asociadas a los compuestos moleculares, y cada una de estas bandas corresponden a un movimiento vibracional de uno de los enlaces que se encuentran en la molécula, por lo que se puede decir que su conjunto representa la “huella dactilar” del compuesto (Piqué y Vásquez, 2012).

Espectroscopía ultravioleta visible.

El espectro ultravioleta visible se asocia con la transición electrónica entre los diferentes niveles energéticos de los diferentes grupos de átomos o moléculas. El principio en el que se basa la espectroscopía ultravioleta visible es involucrar la absorción de radiación ultravioleta, que corresponde a la región visible del espectro electromagnético por una molécula, lo que causa una transición de un electrón de su estado base a un estado energético denominado estado excitado. El fundamento consiste en la medición de la intensidad del color o de la radiación absorbida a una longitud de onda específica que se compara con otras soluciones de concentración conocidas, las cuales se conocen como soluciones estándar, y contienen la misma especie absorbente (Duque, 2017).

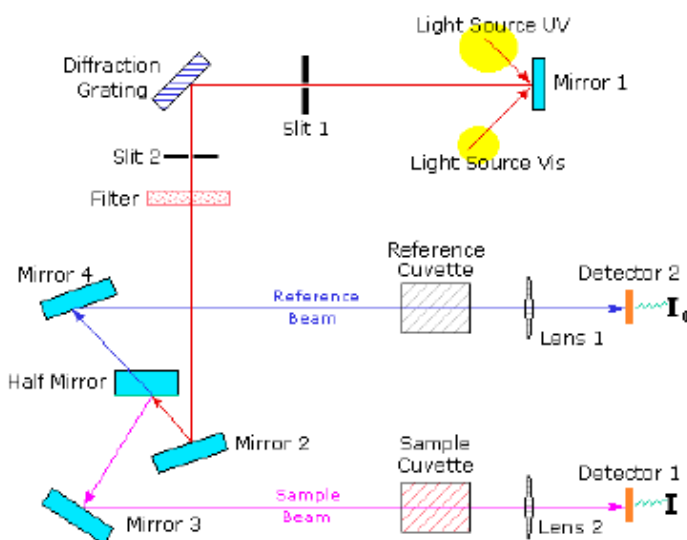


Figura 5. Esquema de funcionamiento del espectrofotómetro UV-visible.

Fuente: Duque, 2017.

Uso de las nanopartículas.

Desde la antigüedad se ha empleado la plata como un agente para el tratamiento de enfermedades, incluso desde antes del desarrollo de los antibióticos era conocida su actividad antiséptica en el tratamiento de heridas y quemaduras. La potente acción antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, su baja toxicidad para las células y la posibilidad de crear una nueva generación de antibióticos, convierten a las nanopartículas de plata en una alternativa que contribuye a superar la resistencia a antibióticos (Fernández, 2017).

Las nanopartículas de plata destacan por su versatilidad y potencial para poder ser aplicadas en optoelectrónica, catálisis y procesos de remediación ambiental. Para las aplicaciones biomédicas, se saca provecho de sus propiedades eléctricas, ópticas, estructurales y mecánicas. De la familia de las nanopartículas metálicas, las de mayor interés son las de plata, por su alta actividad antimicrobiana (Sánchez, 2017).

En los siglos XVII y XVIII se usaba el nitrato de plata como tratamiento de úlceras, y en 1960 se introduce su uso como tratamiento de quemaduras. Alrededor de 1940 se produce una disminución de su uso, sin embargo, la creciente resistencia bacteriana ha optado por una mejora en la tecnología aplicada en el uso de polímeros que ha implementado su uso nuevamente. La plata se ha empleado por cientos de años como agente antimicrobiano para el cuidado de heridas,

prevenir o manejar infecciones en estado sólido y recientemente en cremas o ungüentos. Según Cardoso (2016), algunas de las formulaciones con plata para uso externo según el vademécum del Reino Unido son:

Preparaciones	Usos
Acetato de plata, Borato de plata, alantoinato de plata, Alantoinato de plata y Zinc, Carbonato de plata, Cloruro de plata, Cromato de plata, Glicerolato de plata, Ioduro de plata coloidal, Lactato de plata, Manganita de plata, Polímeros de nylon con plata	Antiséptico (uso similar al nitrato de plata).
Nitrato de plata (1%)	Profilaxis de oftalmía gonocócica neonatal (conjuntivitis neonatal) verrugas, granulomas umbilicales, tejido de sobregranulación y cauterización.
Proteína de plata Plata coloidal	Antiseptia; gotas para los ojos y membranas mucosas.
Sulfadiazina de plata (1%)	Profilaxis y tratamiento de heridas por quemadura, su utilización como un adyuvante en el tratamiento de corto plazo de las infecciones de úlceras en piernas y úlceras de decúbito, y también como adjunto en la profilaxis de las infecciones en sitios donantes de injertos de piel y en abrasiones extensivas. Prevención y tratamiento de infecciones en quemaduras severas Tratamiento ocular de infecciones por <i>Aspergillus</i>

Figura 6. Lista de preparaciones con plata según la Farmacopea Británica.

Fuente: Cardoso, 2016.

Mecanismo de acción antimicrobiano.

Se ha informado que las nanopartículas de plata pueden llegar a dañar las membranas celulares y provocar así cambios estructurales que aumentan la permeabilidad de las bacterias. Este efecto se ve influenciado por la forma, el tamaño y la concentración de las nanopartículas. Se confirma que la acumulación de nanopartículas en la célula de la membrana puede crear “huecos” en la integridad de la bicapa, lo que predispone al incremento de la permeabilidad y causa la muerte celular de la bacteria (Franci *et al.*, 2015).

Se menciona en estudios que la actividad de las nanopartículas de plata está relacionada con el tamaño de estas, por lo que las interacciones con las membranas y cualquier daño resultante que

conduzca a la muerte celular, es más notorio en casos donde el diámetro de las nanopartículas es menor y su potencial zeta positivo. Las fuerzas electrostáticas desarrolladas cuando las nanopartículas tienen un potencial zeta positivo logran encontrar bacterias con carga superficial negativa, lo que promueve una interacción y atracción más cercanas entre dos entidades y es posible que penetre las membranas bacterianas (Franci *et al.*, 2015).

Las nanopartículas poseen mayor actividad antibacteriana que los iones libres de plata, por lo que le atribuyen las propiedades antibacterianas tanto a las características físicas de las nanopartículas como a la elución de los iones de plata. Es posible que el efecto combinado de la actividad de las nanopartículas y los iones libres favorezca una fuerte actividad antibacteriana de amplio espectro (Franci *et al.*, 2015).

Los iones de plata se unen a la proteína como al ácido nucleico cargado negativamente, lo que provoca cambios estructurales y deformaciones en la pared, en las membranas y en los ácidos nucleicos de la célula bacteriana. Los iones de plata interactúan con grupos funcionales como tioles, hidroxilos, indoles, imidazoles y fosfatos, los cuales son donadores de electrones. Las nanopartículas de plata dañan las membranas, lo que induce la liberación de especies reactivas de oxígeno y se forman radicales libres con potente acción bactericida (Franci *et al.*, 2015).

Las nanopartículas de plata o los iones de plata tienen la capacidad de entrar con facilidad al cuerpo microbiano y con esto dañar las estructuras intracelulares. La consecuencia de esto es la desnaturalización de los ribosomas debido a la inhibición de la síntesis de proteínas, así como el bloqueo de la traducción y la transcripción por medio de la unión con el material genético de la célula bacteriana (Franci *et al.*, 2015).

Según Bazán, Monjarás, Balderas y Molina (2020), se han descrito cuatro posibles mecanismos de acción bactericida de las nanopartículas de plata, los cuales son:

- El primer mecanismo es el cual los iones de plata inhiben las enzimas de la célula bacteriana, en el citocromo b y en el citocromo d específicamente; entre el sitio de entrada del sustrato en la cadena respiratoria y la flavoproteína, en las regiones NADH y succinato deshidrogenasa, y la plata se une al aminoácido cisteína causando la muerte bacteriana.
- En el segundo mecanismo se produce una ruptura de la pared celular causada por la plata iónica, lo que inhibe el movimiento de la bacteria y el paso de nutrientes a esta, por lo que causa su muerte.

- El tercer mecanismo es la interacción del ADN de la bacteria con la plata iónica, lo que resulta en una mutación de su ADN y produce la muerte celular.
- El cuarto mecanismo es la unión de la plata con los radicales libres que se forman por el metabolismo aeróbico celular, y al acumularse los radicales libres dentro de la bacteria, se rompe la membrana celular y la bacteria muere.

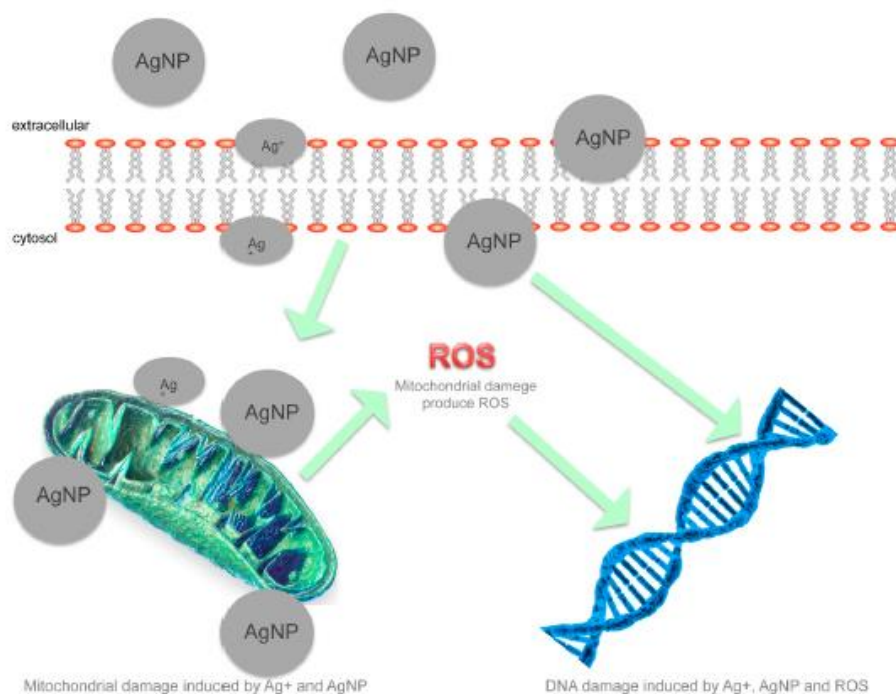


Figura 7. Representación de las respuestas celulares a los mecanismos de toxicidad inducidos por nanopartículas de plata.

Fuente: Franci *et al.*, 2015.

Toxicidad.

La creciente prevalencia de las nanopartículas de plata en productos para consumo desencadena un desafío internacional por garantizar la seguridad de estas y comprender el mecanismo de acción antimicrobiano. Ciertos estudios han demostrado que los efectos sobre las células y microbios se deben al bajo nivel de liberación de los iones de plata de la nanopartícula superficie; y a su vez la tasa de liberación va en función del tamaño de las nanopartículas, la temperatura, la exposición al oxígeno y la luz (Portillo, 2015).

Sin embargo, no se cuenta con gran cantidad de información sobre la toxicidad. El hecho de que cuenten con pequeñas dimensiones y propiedades específicas se pueden relacionar con un

riesgo potencial para organismos mayores. Los nanomateriales que se encuentren en dimensiones entre 50 y 70nm pueden llegar a penetrar las células y pulmones, así como las que corresponden a 30nm podrían llegar hasta el cerebro (Portillo, 2015).

Se desconoce el mecanismo preciso de entrada, el lugar de bioacumulación, el metabolismo y la vía de eliminación, por lo que se han realizado estudios en ratones y ratas en los cuales se expone que, independientemente de la vía de exposición y absorción, logran acceder a circulación sanguínea, acumularse en macrófagos y distribuirse sistémicamente, accediendo a órganos como hígado, riñón, piel, corazón, bazo e incluso cerebro. En humanos, las fuentes de exposición de nanopartículas de plata son los alimentos, el aire y sustancias en contacto con la piel, principalmente; así que los efectos tóxicos van a depender de la exposición y de la vía de entrada (Coutiño, Ávila y Arrollo, 2017).

La vía de exposición dérmica causa controversia. A pesar de que el estrato de la capa córnea de la epidermis consiste en una barrera que limita la penetración de partículas, los apósitos que contienen derivados de nanopartículas de plata permiten el contacto directo con la piel y se puede presentar argiria (Coutiño, Ávila y Arrollo, 2017). La argiria se define como cambios pigmentarios que se producen por exposición directa a sales de plata o a la proteína coloidal del metal por fuentes industriales o médicas. Se caracteriza por manchas color gris-azulado en piel, mucosas y la forma sistémica cualquier órgano. Debe haber una exposición total de 6g por vía oral o 6.3g por vía intravenosa (Arenas, 2019).

Se cita que la concentración tóxica de la plata metálica es de 1 a 10mg/L, pero se indican administraciones en forma de nanopartículas con concentraciones entre 10 y 100mg/L sin presentar efectos tóxicos. El uso en forma de nanopartículas tiene como ventaja que se puede administrar una concentración mayor por dosis. La toxicidad intrínseca es menor si son de mayor tamaño, ya que penetran menos en el organismo. Al estar más compactas es menor el área superficial que presentan para interaccionar, así como una forma esférica hace que sean menos reactivas al presentar menos caras y deben ser insolubles (González, 2018).

Los indicadores toxicológicos de las nanopartículas de plata se clasifican según la exposición que sufra el organismo. La exposición aguda se caracteriza por presentar en un periodo corto a dosis altas, lo que puede causar la muerte o una incapacidad grave. La exposición subcrónica se presenta al estar en contacto con un xenobiótico en varias ocasiones a lo largo de su vida (alrededor de un 10%), y en la exposición crónica se presentan efectos adversos como

resultado de dosis repetidas de la sustancia química o por contacto la mayor parte de la vida (generalmente un 50%) (Torres, 2017).

A pesar de la toxicidad que presenta la plata, se puede encontrar en la dieta diaria entre 0.4 a 27 μ g/día, y el ser humano en condiciones normales presenta de 1 a 5mg de plata en el cuerpo. El efecto bactericida de la plata es superior al efecto citotóxico, el daño que produce a nivel celular es menor al que ocasiona en las bacterias, ya que las células humanas presentan un núcleo que protege el ADN de la acción de la plata y enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa, que neutralizan las especies reactivas de oxígeno (González, 2018).

Química Verde

A inicios de los años setenta se comenzó a asociar la palabra verde con el ambiente, creando un antecedente de filosofía ambiental, el cual llegó a cuestionar si había posibilidad de que la química fuera verde, ya que se asocia química con toxicidad, contaminación y riesgo; por otro lado, se cree que será la ciencia que pueda llegar a resolver la crisis ambiental. Previo al concepto de química verde se valoraba como el éxito de una reacción o proceso, usando casi exclusivamente el concepto de rendimiento (Sierra *et al.*, 2014).

El término de “química verde” está relacionado con el diseño de procesos y productos químicos que vayan a reducir o eliminar el uso y la creación de sustancias peligrosas. El concepto fue introducido por Paul Anastas junto a John Warner, los cuales, en su libro titulado *Green Chemistry: Theory and Practice* en 1998, postulan los doce principios de la química verde, los cuales son criterios que buscan valor a una reacción, proceso o producto químico con el medio ambiente Sierra *et al.*, 2014).

Los doce principios de la química verde, según Mascarell y Vilches (2016), son los siguientes:

- Evitar los residuos como insumos no empleados o fluidos reactivos gastados.
- Maximizar la incorporación de todos los materiales del proceso en el producto terminado.
- Usar y generar sustancias que tengan poca o nula toxicidad.
- Preservar la eficacia funcional mientras hay reducción de la toxicidad.
- Minimizar las sustancias auxiliares como solventes y agentes de separación.
- Minimizar los insumos de energía.
- Preferir el uso de materiales que sean renovables frente a los que no lo son.

- Evitar las derivaciones innecesarias como grupos de bloqueo, pasos de protección y desprotección.
- Preferir el uso de reactivos catalíticos en vez de reactivos estequiométricos.
- Diseñar productos que se descompongan de manera natural después de su uso.
- Vigilar y controlar todo el proceso para evitar la formación de sustancias peligrosas.
- Seleccionar procesos y sustancias con el fin de minimizar el potencial de siniestralidad.

Importancia ambiental.

La sustentabilidad de la civilización se encuentra en dependencia del hecho de si se pueden suministrar fuentes de energía, alimentos y productos químicos en el incremento poblacional, que no comprometan la salud a largo plazo. Por lo que el desarrollo de nuevas herramientas que logren este objetivo es un reto científico, tecnológico y social (Doria, 2009).

La química verde se centra en el uso de la química para prevenir la contaminación por medio del diseño de productos y procesos químicos que resulten benignos para el ambiente, la cual ha crecido de manera sustancial desde su aparición a principios de los años 90. Se parte del principio de diseñar productos nuevos que resulten útiles y viables para su comercio, pero que a su vez la toxicidad que representen sea mínima; o del diseño de pasos sintéticos alternativos para productos preexistentes, los cuales no requieran de solventes ni generen productos tóxicos (Varsavsky, 2002).

Aplicaciones.

El gran desafío que presenta la química es la mejora en procesos que reduzcan el consumo de energía y la generación de dióxido de carbono, así como la emisión de metales tóxicos a la atmósfera. El impulso de la química verde se debe al conocimiento progresivo de la toxicidad de las sustancias y de los efectos que tienen estas sobre en medio ambiente. A pesar de que la química verde se encuentra en una etapa inicial de descubrimiento y aplicación a nivel industrial, se encuentran iniciativas de investigación y desarrollo, donde la estrategia empresarial es aplicar y desarrollar productos que sean ambientalmente seguros (Velázquez, 2016).

Más del 50% de los materiales que se usan en los procesos farmacéuticos son solventes orgánicos, de los cuales la mayoría son incinerados como método para su disposición final, lo que causa un impacto ambiental y económico. Por otro lado, el desarrollo de nuevos medicamentos y la síntesis de moléculas bioactivas implican procesos muy costosos, así que la industria

farmacéutica necesita de rutas de síntesis eco amigables con el fin de seguir cumpliendo con la demanda económica, las especificaciones del producto, reducir el tiempo de producción y disminuir la cantidad de residuos peligrosos (Pájaro y Olivero, 2011).

Compuestos Fitoquímicos

Desde tiempos remotos, las plantas medicinales han representado un recurso de gran importancia, con el propósito de cubrir las necesidades terapéuticas. Las propiedades curativas que se le atribuyen a las plantas se deben a la presencia de un principio activo, el cual se encarga de producir el efecto fisiológico. A pesar del avance en la medicina moderna, las plantas medicinales no han perdido su importancia, por el contrario, se han aprovechado de manera más compleja como materia para los medicamentos modernos (Blas, 2017).

Se considera que, en el mundo, la vegetación contempla medio millón de especies. Se ha reconocido recientemente que la región occidental es la que posee la mayor biodiversidad y complejidad de estas.

La disciplina que se encarga del estudio de las materias primas y de las sustancias con fines terapéuticos cuyo origen es biológico es la Farmacognosia. Con esta disciplina se logra definir la identidad de la planta, donde se describe su morfología, anatomía, origen, forma de producción y composición química (Enríquez y Prieto, 2007).

La farmacognosia se dedica a estudiar los fitomedicamentos. Este término se introdujo por primera vez en 1815, por Seydler. El término está compuesto por dos palabras: “*pharmakon*”, cuyo significado es droga, y “*gnosis*”, que tiene referencia con conocimiento. El estudio farmacognóstico se constituye de una serie de procesos, los cuales permiten la descripción botánica, así como la clasificación taxonómica de las plantas, que tiene como principal utilidad la identificación de la actividad farmacológica para su uso en la farmacología (Cedeño y Ganchozo, 2018).

Los componentes de una planta se pueden subdividir en dos grandes grupos: los metabolitos primarios y los metabolitos secundarios o productos naturales. Los primarios corresponden a carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales se encuentran distribuidos de manera universal y participan en la actividad celular de todo ser vivo. Los metabolitos secundarios, por su parte, comprenden los principios activos, los cuales son compuestos químicos con una estructura relativamente compleja, su distribución es más restringida y su predominio se da en fuentes botánicas (Enríquez y Prieto, 2007).

Se considera que los metabolitos secundarios son “artículos de lujo” en las plantas, ya que no se consideran indispensables, debido a que aún no se conoce que intervengan en alguna función metabólica. Sin embargo, su aislamiento y conocimiento estructural han permitido el diseño de reacciones que produzcan derivados semisintéticos con gran utilidad terapéutica (Enríquez y Prieto, 2007).

***Nephelium lappaceum*.**

El rambután es una fruta exótica que proviene del continente asiático. Debido a su escasa producción no tiene alta comercialización, pero según estudios realizados, posee un potencial nutritivo y contenido sustancial para avances científicos medicinales. *Nephelium lappaceum* es originario del archipiélago malasio, y se cultiva en climas tropicales como los predominantes en Latinoamérica y el Caribe, por ser zonas húmedas (Cedeño y Ganchozo, 2018).

El rambután se describe como una fruta tropical con un sabor dulce agradable al paladar. Se caracteriza por tener un aspecto de erizo con coloración variable entre amarillo hasta rojo, el cual se consume en su forma fresca. El fruto proviene de un árbol perenne y con ciclo corto. Dentro de los nombres comunes de como se le conoce al *Nephelium lappaceum* alrededor del mundo se encuentra el rambután, achotillo o mamón chino (Cedeño y Ganchozo, 2018).

El árbol de rambután tiene una altura promedio entre 10 y 12 metros. Los frutos que produce son del género hembra durante la etapa adulta, la cual se da a partir de los cuatro años en adelante. Las hojas son alternas y pinnadas, cuyas flores son pequeñas, de 2 a 3mm con coloración rosada, blanca o verdosa, de los cuales brotan racimos de 10 a 20 frutos característicos (Cedeño y Ganchozo, 2018).



Figura 8. Árbol de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Cedeño y Ganchozo, 2018.



Figura 9. Fruto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Cedeño y Ganchozo, 2018.

El fruto posee espinas suaves en la cáscara cuyo color es marrón rojizo con una pulpa blanquecina translúcida, tiene similitud con la consistencia de la uva y una semilla color café con un tamaño de 1 a 2 cm que no se consume. Es posible su desarrollo hasta los 1200 metros sobre el nivel de mar; sin embargo, la altura óptima para su crecimiento es entre 300 y 600 msnm. La humedad relativa debe ser mayor al 80%, una temperatura promedio de 25 a 32°C. Los suelos

adecuados para su desarrollo son los profundos, areno-limosos, francos con tendencia ácida y muy ricos en materia orgánica (Cedeño y Ganchozo, 2018).

Clasificación taxonómica.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Sapindaceae
Género	<i>Nephelium</i>
Especie	<i>lappaceum</i>

Figura 10. Clasificación taxonómica de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Farías y Olaya, 2018.

En Costa Rica, el desarrollo de rambután ha sido bueno debido al clima tropical húmedo similar a su sitio de origen. Una de las áreas más sembradas es el cantón de Corredores, donde se da una distribución de las lluvias, que no muestran cuatro meses secos con precipitaciones que no superan los 10 mm mensuales, lo que contribuye a una buena floración y que se dé una buena cosecha (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2007).

Actividad farmacológica.

El rambután tiene una composición nutritiva y nutricional, representada por una composición de minerales y vitaminas. Dentro de los nutrientes que se presentan están la vitamina A, B1, B2 y B3, además de calcio, hierro, sodio y potasio, cuya acción favorece la eliminación de radicales libres por sus propiedades antioxidantes, antisépticas, antivíricas, tener efecto calmante y mejorar el sistema nervioso (Cedeño y Ganchozo, 2018).

De manera tradicional, se suele emplear la pulpa para el tratamiento de la fiebre; por su parte, la fruta es empleada para aliviar la disentería, la dispepsia y la diarrea. Las hojas se han empleado como cataplasma para el alivio del dolor de cabeza o en caso de migraña, así como para el cuidado del cabello. La decocción de la corteza es utilizada para el tratamiento de la candidiasis bucal (Macías, 2019).

La cáscara del rambután es considerada una fuente potencial de antioxidantes debido principalmente a los compuestos polifenólicos como la geranina, corilagina y ácido eláxico. Estos poseen gran variedad de propiedades biológicas, incluyendo actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígenas y anti-hiperglucémicas (Palomino y Salazar, 2020).

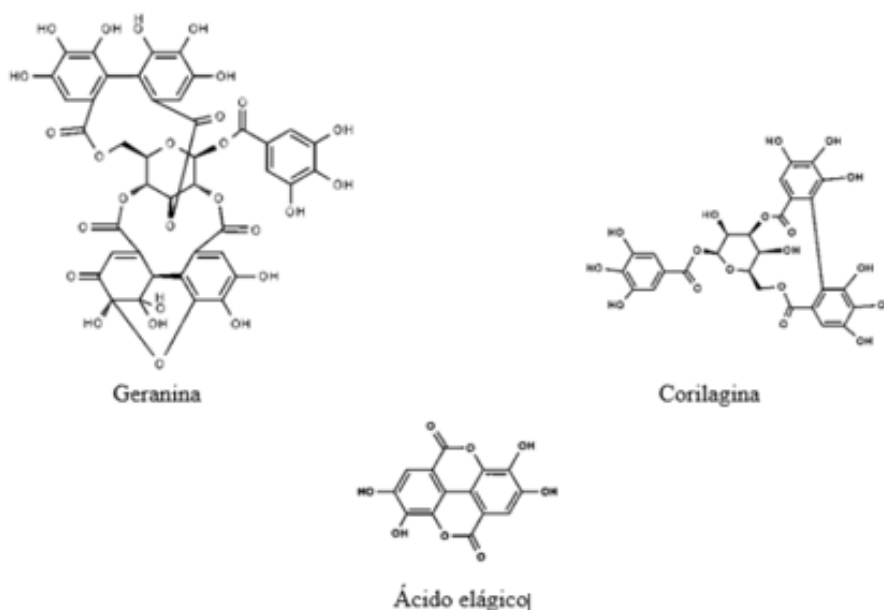


Figura 11. Estructuras químicas de los principales compuestos en la cáscara de rambután.

Fuente: Hernández *et al.*, 2019.

A su vez, son empleados los desechos del rambután para la síntesis de nanocristales de óxido de zinc y níquel, con el fin de probarlos contra bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, con la finalidad de conocer su actividad antibacteriana. La industria cosmética busca innovar en el desarrollo de nuevas formulaciones para poder reemplazar las materias primas de origen sintético, con el fin de aprovechar las grasas provenientes de las semillas de rambután y transformarlas en material ecológico sostenible, particularmente en productos para la higiene personal como cremas, champú o jabones (Farías y Olaya, 2018).

Se ha informado que la cáscara de rambután es una fuente potencial de antioxidantes en los productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos, y esto se debe al contenido de compuestos bioactivos y la capacidad no tóxica para las células normales. A diferencia de la pupa y la semilla, la cáscara de rambután posee mayor proporción de antioxidantes, debido a sus compuestos

polifenólicos (geranina, corilagina y ácido elálgico), que son conocidos por sus actividades biológicas (Hernández *et al.*, 2019).

Zingiber officinale.

El jengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) es una planta medicinal originaria de las zonas tropicales del sureste de Asia. Se puede encontrar en zonas tropicales de África, Australia, India occidental, Nigeria, Indonesia, Jamaica, México, Brasil, Ecuador y Perú. Es una hierba perenne que puede llegar a medir un metro de altura, con rizomas horizontales gruesos y tuberosos, los cuales son muy aromáticos, con sabor picante y de coloración amarillo-verdoso. Sus hojas son alternas, sésiles, envainadas de color verde pálido, lanceoladas, de 15 a 30 cm de longitud y 2 a 3 cm de ancho (Vera, 2018).

Las flores son asimétricas, sus inflorescencias apretadas, basales en el extremo de cortos escapos, presentan una coloración verdosa y manchas púrpuras en espigas radicales de 7 cm de largo. Poseen pedúnculos de 30 cm de largo, un cáliz tubuloso y una corola con color amarillo anaranjado. Aunque rara vez fructifica, posee una forma capsular. Su reproducción se da mediante fragmentos que son obtenidos de los rizomas de 2 a 5 cm que contengan una yema (Vera, 2018). Los suelos óptimos para su siembra deben estar bien drenados y ligeros, no deben ser arcillosos; se requiere que tengan gran cantidad de materia orgánica (Morcillo y Peñafiel, 2017).

Es un tubérculo cuya forma es de mano articulada, lo cual le otorga el nombre de rizoma, por lo que esta parte se considera la más importante de la planta; además de que contiene almidón, fósforo, hierro y ácido ascórbico en cantidades apreciables.

El jengibre posee una reproducción asexual, por lo que no hay gran cantidad de variedades. Se conoce la existencia de dos clases, el jengibre común, o científicamente conocido como *Zingiber officinale*, y el jengibre silvestre o *Zingiber serumber*, cuya característica es ser más amargo y oscuro que el común, y se puede encontrar en el Sudeste de Asia y en la India (Morcillo y Peñafiel, 2017).

El rizoma contiene el aceite esencial, el cual está compuesto por monoterpenos como canfeno, neral, citronelol, 1,8-cineol, β -felandreno, alcanfor, geranial, borneol y linalol; así como por sesquiterpenos, los cuales son los responsables del aroma, como zingibereno, zingiberol, β -eudesmol, α -curcumeno, β -bisaboleno, (EE)- α -farneseno, elemol, β -sesquifelandreno y furanogermenona. Los compuestos no volátiles como gingeroles y shogaoles, los cuales son

componentes de las oleorresinas, son los que le otorgan propiedades picantes a la droga (Morcillo y Peñafiel, 2017).



Figura 12. Morfología de la planta de *Zingiber officinale*.

Fuente: Vera, 2018.



Figura 13. Rizoma de *Zingiber officinale*.

Fuente: Siedentopp, 2008.

Clasificación taxonómica.

A continuación, se presenta la clasificación taxonómica del *Zingiber officinale*.

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Zingiberales*

Familia: *Zingiberaceae*

Subfamilia: *Zingiberoideae*

Tribu: *Zingibereae*

Género: *Zingiber*

Especie: *Zingiber officinale* R.

Figura 14. Clasificación taxonómica de *Zingiber officinale*.

Fuente: Vera, 2018.

En Costa Rica, el cultivo de jengibre es conocido principalmente en la Zona Norte, aunque a partir del 2004 se inició la siembra en áreas pequeñas de la Región Brunca. Para el año 2006 se empezó con el cultivo en mayor volumen en el cantón de Pérez Zeledón, en la provincia de San José, y en Buenos Aires, en la provincia de Puntarenas. Al ser de origen tropical, se logra adaptar a temperaturas de entre 25 y 30°C, con precipitaciones anuales que alcancen un mínimo de 2000 a 4000mm (Morales, 2007).

Actividad farmacológica.

La importancia nutricional de la planta se debe a su amplio espectro de aceites esenciales (entre 2,5-3%) y las sustancias picantes no volátiles. Los componentes principales de las sustancias picantes son los gingeroles en un 25%. La señal de frescura y calidad se debe al alto contenido de gingeroles, los cuales, por su estructura química y acción, tienen semejanza con el ácido acetilsalicílico, presentando un efecto analgésico (Siedentopp, 2008).

Junto a los gingeroles, los shogaoles son las sustancias picantes que, incluso durante la cocción experimentada, presentan poca evaporación. Estimulan la secreción de jugos gástricos y del flujo de saliva, esto porque estimulan los receptores térmicos del estómago, generando una sensación ardiente. Los componentes de los aceites esenciales son los sesquiterpenos, como el

alfafarneseno y curcumeno. El aroma distintivo se debe a la mezcla de isómeros cis y trans del betaeudesmol y a los alcoholes sesquiterpénicos zingiberol y betasesquifelandrol (Siedentopp, 2008).

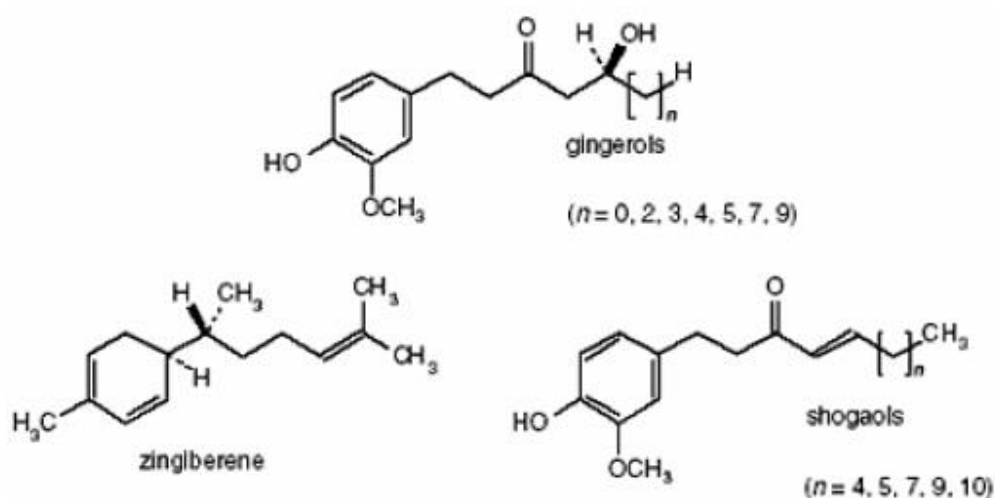


Figura 15. Estructura química de gingeroles, zingibereno y shogaoles.

Fuente: Bergesio y Ligorria, 2016.

Los gingeroles son antioxidantes, e inhiben la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, lo que le atribuye propiedades antiinflamatorias. Además, algunos de los componentes de la oleoresina de jengibre han logrado mostrar un potente efecto inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, así como una inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Bergesio y Ligorria, 2016).

Dentro de los principales fitoquímicos que se han encontrado gingeroles, shogaoles, diarilheptanoides, mono-terpenoides y compuestos fenólicos que presentan propiedades antioxidantes. Estos compuestos volátiles son los que le atribuyen el aroma característico y el sabor al jengibre. Los gingeroles son cetoalcoholes que se diferencian por la longitud de sus cadenas alquilo no ramificados, los cuales se identificaron como los principales componentes activos en el rizoma fresco. Así como los shogaoles, los cuales representan la forma deshidratada de los gingeroles, son los constituyentes picantes que predominan en el jengibre seco (Blas, 2017).

El rizoma es la parte que se emplea de manera tradicional, porque es la que presenta propiedades carminativas, antiulcerosa, colagoga, de protección hepática, antiespasmódica, antitusiva, laxante y expectorante. Además, se ha logrado demostrar que tiene propiedad cardioprotectora, antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana y anticancerígena. Los efectos

antitumorales y antiproliferativos se deben a dos componentes picantes, el 6-gingerol y el 6-paradol (Blas, 2017).

Se ha descrito actividad antimicrobiana en ensayos experimentales para los extractos de rizoma. El extracto etanólico ha demostrado tener actividad frente *E. coli* y *Salmonella typhi* con una concentración de 1000mg/mL, presentando halos de inhibición de 9mm. Por otro lado, se ha demostrado inhibición a una concentración de 25ug/mL frente *Staphylococcus aureus*. La potencia antimicrobiana se debe principalmente a la presencia de terpenos monooxigenados, sesquiterpenos y compuestos fenólicos como shogaol y gingerol (Navarro, 2017).

En estudios científicos que se han realizado, se documenta información sobre el uso de jengibre para tratar las náuseas y vómitos durante el primer trimestre de gestación. Su uso es eficaz y seguro cuando se emplea en las dosis recomendadas. Según el Instituto Nacional para la Salud y la Excelencia Clínica de Reino Unido, el jengibre es considerado como una terapia aceptable para el tratamiento de las náuseas y vómitos durante el embarazo (García, 2016).

Se debe tener precaución en su uso para pacientes que tengan tratamiento con anticoagulantes orales o antiagregantes plaquetarios, ya que la administración de preparados a base de jengibre podría representar un incremento en el riesgo de hemorragias. Es importante que realicen la consulta con su médico. Las personas que presentan cálculos biliares deben realizar la consulta médica antes de ingerir algún producto preparado con jengibre. Se contraindica el uso en pacientes que presentan úlceras pépticas (Córdor, 2014).

Bacterias

Las bacterias más antiguas se registran gracias a la evidencia de restos fósiles, que se remontan a hace 3500 millones de años. Durante la evolución de la Tierra, las bacterias no fueron la excepción a sufrir cambios y adaptaciones que requerían las nuevas condiciones del planeta. Gran cantidad de esos cambios se mantienen hoy día, lo que genera hipótesis sobre las razones que pudieron dar origen a estos. Se encuentra la presencia de una doble membrana en algunas bacterias, mencionando una característica predominante, la cual ha sido útil para la clasificación de las bacterias y ha generado interés sobre su formación (Castillo, 2016).

Las células con vida independiente son las bacterias, las cuales se encuentran entre 0-1 a 10µm. Poseen una membrana citoplasmática que se encuentra rodeada por una pared celular; el peptidoglucano es el polímero que hace que la pared sea rígida. Las bacterias no poseen núcleo, pero tienen los elementos químicos para los ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas. Su

citoplasma contiene únicamente ribosomas y un solo cromosoma de DNA de doble hebra. Los requisitos nutricionales son variados, aunque casi todas viven de manera libre si cuentan con una fuente de energía adecuada (Ryan y Ray, 2017).

La reproducción de las bacterias se da mediante fisión binaria, siendo un proceso de división celular que da como resultado dos células hijas de igual tamaño y la replicación del ADN, donde cada célula hija tendrá el mismo genoma (Hernández, 2017). Las bacterias se presentan en tres formas básicas: esféricas o cocos, alargadas o bacilos y curvadas o espirilos. Para determinar la forma de las bacterias, el factor de mayor importancia es la rigidez de la pared celular (Vargas y Kuno, 2014).

Clasificación según tinción de Gram.

En la década de 1880, se desarrolló la técnica de tinción, la cual observaba las bacterias en tejido pulmonar en pacientes que morían a causa de la neumonía, por parte del médico Hans Christian Gram. Con la tinción de Gram se logra diferenciar las bacterias Gram positivas a las que presentan una retención de tinción azul-violeta, y las reconocidas como Gram negativas a las que se decoloran y luego se tiñen con safranina. Esta variación de tinciones se debe a la estructura que presentan las paredes celulares de ambos tipos de bacterias (Rodríguez y Arenas, 2018).

Es de gran utilidad para la microbiología clínica, ya que se parte de muestras clínicas directas que provienen de sitios estériles, y se logra conocer las características de la muestra y lograr realizar una diferencia entre los potenciales microorganismos que puedan ser causantes de la infección. Los principios de la tinción de Gram se basan en las características de la pared celular, ya que le da propiedades determinantes a cada bacteria en específico (López *et al.*, 2014).

	BACTERIAS GRAM POSITIVAS	BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
Color con la tinción de Gram	Violeta	Rojo
Pared celular	Gruesa	Delgada
Presencia de lipopolisacáridos en pared celular	Ausente	Presente
Presencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos en pared celular	Presente	Ausente

Figura 16. Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Fuente: Rodríguez y Arenas, 2018.

Tabla 1.

Clasificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Bacterias Gram positivas	Bacterias Gram negativas	
Bacillus	Haemophilus	Enterobacter
Listeria	Klebsiella	Salmonella
Staphylococcus	Legionella	Pasteurella
Streptococcus	Pseudomonas	Bordetella
Enterococcus	Escherichia coli	Riemerella
Clostridium	Proteus	

Fuente: Elaboración propia, 2021, con base en Mora, 2012.

Tabla 2.

Antibióticos eficaces contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Antibióticos contra Gram positivos	Antibióticos contra Gram negativos
Penicilinas, amoxicilina, ampicilina, cefalosporinas	Neomicina, gentamicina, estreptomina
Bacitracina	Enrofloxacina
Enrofloxacina	Sulfamidas
Sulfamidas	Tetraciclinas
Tetraciclinas	Colistina

Fuente: Elaboración propia, con base en Mora, 2012.

Clasificación según morfología.

Según Vargas y Kuno (2014), las bacterias, al ser vistas al microscopio, se presentan en las siguientes formas:

- Cocos: presentan forma esférica y se agrupan de forma homogénea. Pueden tomar forma dependiendo de la tendencia que tienen las células por mantenerse unidas luego de la división. Se pueden agrupar en diplococos, tétradas, sarcinas y estreptococos.
- Bacilos: se agrupan de forma heterogénea por la variedad de subtipos morfológicos que pueden ser cilíndricos, en bastones largos y delgados, pequeños y gruesos, ser afilados, rectos o redondeados. Se pueden presentar en varias formas según su tendencia a tener células hijas para mantenerse unidas en agrupaciones como diplobacilos, estreptobacilos, empalizado y formas filamentosas.

- Espirilos: se presentan con una o más curvaturas y otras pueden tener hélices. Se encuentran dentro de este grupo los vibriones, espirilos y espiroquetas.

Concentración Mínima Inhibitoria

El uso de medicamentos a dosis subterapéuticas o mayores a las requeridas representa un desafío a nivel hospitalario, ya que, al prescribirlos, en la mayoría de las ocasiones no se cuenta los parámetros relacionados o la función renal del paciente. Estas características son determinantes para que el tratamiento sea viable y se pueda garantizar que las concentraciones que alcanza el fármaco son las idóneas para cumplir su acción farmacológica, lo que evitaría la disminución de opciones terapéuticas, aumentos de toxicidad y el incremento de la resistencia bacteriana (Martínez, Pacheco y Rada, 2013).

Se evalúa la actividad *in vitro* de los antimicrobianos por medio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual se define como la mínima concentración de un antimicrobiano en $\mu\text{g/mL}$ que es capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo luego de 24 horas de incubación a 37°C . Se establece a la CMI como “*gold Standard*” en comparación con otros métodos que puedan evaluar la susceptibilidad antimicrobiana, porque además de confirmar las resistencias inusuales, brinda respuestas definitivas cuando se tiene otro resultado por otros métodos con menor determinación (Horna *et al.*, 2005).

Se interpreta la sensibilidad para cada antibiótico analizado por medio de tres resultados, “sensible” cuando se inhibe el crecimiento microbiano con la concentración sérica del fármaco con la dosis habitual; “sensibilidad intermedia” representa una inhibición del crecimiento usando la dosis máxima recomendada, y “resistente” significa que el microorganismo es resistente a los niveles séricos que alcanza normalmente el medicamento (IDEXX Laboratories, 2018).

Ensayos de sensibilidad en extractos.

Se encuentran diversos métodos de laboratorio que se emplean *in vitro* para determinar la susceptibilidad de los organismos a los agentes antimicrobianos; sin embargo, las sensibilidades son diferentes o no se basan en los mismos principios, por lo que el resultado que se va a obtener se ve influenciado directamente por el método que se elija, los microorganismos empleados y el grado de solubilidad de cada compuesto que es evaluado (Navarro, 2017).

Métodos de difusión.

La técnica se encuentra fundamentada en el método que fue descrito por Bauer y está basada en la relación que hay entre la concentración de la sustancia que es analizada, y el halo de inhibición de crecimiento que se da en la superficie de una placa de agar. Esta placa se encuentra en un reservorio, el cual contiene el extracto de la planta que se va a estudiar y se pone en contacto con el medio inoculado; posteriormente, se incuba y se mide el diámetro del halo de inhibición que se logra ver alrededor de los reservorios. Los medios más empleados en esta técnica son el agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, porque sus componentes favorecen el crecimiento de algunas cepas bacterianas (Navarro, 2017).

Este método tiene como ventaja ser cualitativo, lo que representa mayor facilidad de estandarización, y se indica en casos de microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Se parte de una muestra a la cual se le desea realizar un cultivo para iniciar el estudio de sensibilidad antimicrobiana. En sí, el fundamento se basa en el depósito, en la superficie de una placa de agar Mueller Hinton la cual está inoculada con el microorganismo, de discos de papel de filtro impregnados con el agente antimicrobiano, los cuales se colocan en la superficie húmeda del agar infundiéndolo en el agar, formando un gradiente de concentración. Al cabo de 18 a 24 horas de incubación, puede haber una zona de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de los discos (Taroco, Seija y Vignoli, 2006).

Para estandarizar la densidad del inóculo, se emplea una suspensión de sulfato de bario como un estándar de turbidez, el cual corresponde a un 0.5 del nefelómetro de Mc Farkand. Preparado el patrón de turbidez se distribuyen en tubos de ensayo (aproximadamente 5mL por tubo) y se almacenan a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Esta turbidez representa 1.5×10^8 UFC/mL.

Según Taroco, Seija y Vignoli (2006), para preparar el inóculo se puede realizar por medio de dos formas, las cuales son:

- Método del medio de cultivo líquido o de Kirby-Bauer: se tocan cuatro o cinco colonias aisladas de igual morfología con un asa bacteriológica, se inocula en 4 a 5mL de caldo apropiado. Los cultivos de caldo se incuban a 35°C hasta que aparezca una turbidez ligeramente visible (entre dos a cinco horas). La turbidez se ajusta con suero fisiológico estéril o caldo para lograr una turbidez que se pueda comparar visualmente con un estándar

preparado previamente (llamado 0.5 de Mc Farland). Este método se recomienda en casos de cultivos que tienen más de 24 horas de incubación.

- Método de suspensión directa de colonias o Kirby-Bauer modificado: se coloca 4-5mL de suero fisiológico estéril en un tubo de ensayo. Se toma con un asa bacteriológica tres o cuatro colonias similares en morfología y se suspenden en el tubo hasta alcanzar la turbidez comparable con la solución de Mc Farland 0.5. Preparado el inóculo bacteriano con la cepa en análisis, se siguen los siguientes pasos:
 1. Se introduce el hisopo estéril al inóculo bacteriano preparado. Antes de retirarlo, se escurre sobre las paredes del tubo con el fin de retirar el exceso de líquido de este.
 2. Se siembra la placa de Mueller Hinton para obtener un crecimiento confluyente. Para esto se usa el hisopo, para estriar de forma paralela y compacta, de forma que se abarque toda la superficie. Se repite el proceso rotando la placa 60° dos veces más. Se extrema el cuidado de sembrar las placas de borde a borde, ya que de lo contrario puede haber dificultad para hacer las lecturas.
 3. Se deja secar de tres a cinco minutos antes de colocar los discos.
 4. Los discos se colocan con un dispensador o pinza estéril. Al estar en el agar, se presionan los discos levemente para que se adhieran. Deben estar a más de 15mm del borde de la placa y estar distribuidos de forma que no se superpongan los halos de inhibición.
 5. Ya colocados los discos, se incuban las placas a 35-37°C en grupos de no más de cinco placas por 18h. Las placas se deben colocar de forma invertida para que la condensación del agua no caiga encima del agar, lo que podría ocasionar un cambio en las condiciones del medio e invalidaría la lectura de los halos.



Figura 17. Antibiograma efectuado con el método de Kirby-Bauer.

Fuente: Cona, 2002.

Método de dilución en agar.

La dilución en agar es el método cualitativo establecido para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos. Se incorpora el antimicrobiano dentro del medio con agar, de manera que cada placa tenga una concentración de extracto distinto para evaluar. Así se examina si el microorganismo presenta crecimiento o no en la placa. Sin embargo, una desventaja del método es la cantidad de muestra necesaria para el análisis (Navarro, 2017).

En esta técnica se preparan los tubos con una concentración definida del antimicrobiano y se le adiciona a cada tubo una cantidad que es conocida de agar Mueller Hinton, el tubo se homogeniza y se vierte en la placa de Petri vacía, con lo que se logra obtener una placa de agar Mueller Hinton con el antimicrobiano diluido a una concentración conocida. Se inicia, generalmente, con una concentración de $129\mu\text{g/mL}$, y se realizan diluciones dobles hasta lograr un gradiente decreciente de la concentración de antimicrobiano (Herrera, 1999).

Macrodilución en caldo.

En este método se emplean tubos de hemólisis estériles, en los cuales se preparan diluciones sucesivas al medio del extracto en caldo. Para cada tubo se requiere un volumen mínimo de 1mL. La concentración mínima inhibitoria se logra determinar posterior a la incubación, ya que es la menor concentración de extracto que es capaz de inhibir de manera completa el crecimiento bacteriano en el tubo. El punto final se define a simple vista, por la falta de turbidez en el caldo (Navarro, 2017).

En los procedimientos iniciales se empleaban tubos de ensayo grandes con volúmenes de caldo de mínimo 1mL. En la década de los 70, el método fue estandarizado por el Estudio Cooperativo Internacional, y luego se publicó un método estándar diseñado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Su fundamento se basa en exponer a las cepas a diversas concentraciones de antimicrobianos, para observar si hay crecimiento bacteriano y así definir la CIM (Taroco, Seija y Vignoli, 2006).

Para su cálculo, se va a partir de tubos sin crecimiento del organismo al cual se le analiza su CMI, y de estos se parte a una escala doble de menor a mayor concentración del agente antimicrobiano. Según Picazo (2001), se siguen los siguientes pasos para desarrollarlo:

1. Determinar la CMI y tomar los tubos sembrados.
2. Agitar los tubos sin crecimiento, ya sea usando Vortex u homogenizando con la micropipeta o vaciando de 6 a 10 veces.
3. Depositar 100 μ L de cada tubo en el medio de cultivo y extenderlo con un sembrador. Así se diluye la concentración del antimicrobiano vehiculado, neutralizando el efecto, lo que favorece el recuento.
4. Incubar a una temperatura de 35°C y realizar lecturas a las 24, 48 y 72 horas.
5. Realizar el recuento de las colonias que han crecido en las placas en las cuales se sembró el inóculo original.
6. Recontar las colonias que crecieron en los tubos sin crecimiento.
7. Para el control de calidad se emplean las mismas cepas que las que fueron referidas en la técnica del cálculo de la concentración mínima inhibitoria por dilución de caldo.

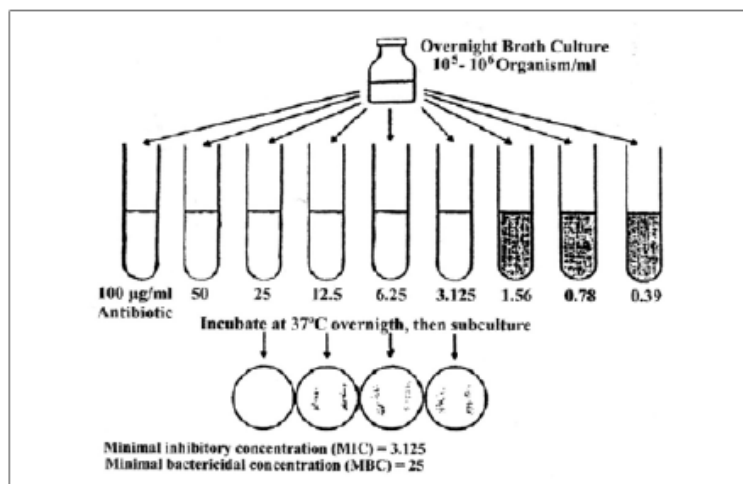


Figura 18. Esquema sugerido para macrodilución en caldo por NCCLS.

Fuente: Navarro, 2017.

Microdilución en caldo.

Se emplean microplacas que contienen concentraciones en forma creciente del extracto vegetal. El microorganismo el cual se está analizando es inoculado en diversos pozos de las microplacas, y la concentración mínima inhibitoria se logra determinar posterior a la incubación (Navarro, 2017).

Para el método, así como el criterio de control de calidad, se sigue el descrito en la macrodilución en caldo, a diferencia de que no se emplea el Vortex, y que una vez que se lee la concentración mínima inhibitoria, se procede a homogenizar el contenido de los pocillos, ya sea con agitador, micropipeta o manualmente, y se siembran 100µL de los pocillos donde no hubo crecimiento (Picazo, 2001).

La prueba se realiza en una placa de poliestireno que contiene 96 celdillas aproximadamente. La placa puede tener entre siete y ocho diluciones de 12 agentes antimicrobianos diferentes. Una de las celdillas tiene como función ser el control positivo (caldo más inóculo) y otra celdilla es el control negativo (solo caldo). Generalmente, cada pocillo tiene capacidad para 0.1mL. El caldo de Mueller Hinton es el medio recomendado para pruebas de susceptibilidad de microorganismo que se aíslan comúnmente. El caldo debe contener el contenido apropiado de cationes que son suministrados por el fabricante como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Cavaliere *et al.*, 2005).

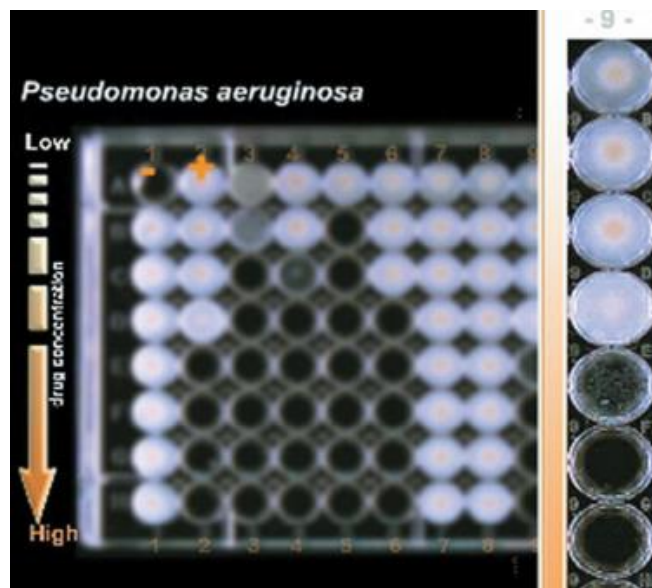


Figura 19. Placa de microdilución de CIM.

Fuente: Cavalieri *et al.*, 2005.

Resistencia Bacteriana

A partir de 1928, cuando se dio el descubrimiento de la penicilina por Fleming, inició la denominada época de los antibióticos. En décadas siguientes, se dio un crecimiento exponencial en la creación de nuevas clases de antibióticos. Sin embargo, en los últimos años el desarrollo de nuevos antibióticos ha disminuido, por lo que ha surgido una impredecible resistencia por el surgimiento de virus, bacterias, hongos y protozoarios con mecanismos de defensa que evaden la acción destructiva de estos agentes (Fernández *et al.*, 2003).

La resistencia bacteriana representa un gran problema de salud mundial, el cual requiere del mayor esfuerzo y atención por parte de las instituciones gubernamentales que garanticen su control. Este fenómeno implica, como consecuencia, el fracaso terapéutico de los antimicrobianos, así como el aumento de la morbilidad, además de un incremento considerable en los costos por atención médica (García, Castillo y Salazar, 2014).

La resistencia es un proceso natural que se conserva con la evolución, por lo que un factor que influye en la capacidad de adaptación es el hecho de que las bacterias tienen acceso a un gran grupo de genes que se movilizan por transferencia vertical y horizontal, y se van extendiendo en las demás poblaciones bacterianas en elementos genéticos móviles como plásmidos y trasposones. Se cuantifica la resistencia como la concentración mínima que se necesita para que se produzca el efecto deseado (Acevedo, Severiche y Jaimes, 2015).

La resistencia es el mecanismo por el cual el microorganismo es capaz de disminuir la acción de los agentes antimicrobianos, donde una concentración por debajo de la concentración mínima inhibitoria clasifica a la bacteria como resistente, y valores intermedios representan una sensibilidad moderada. Los términos de resistencia y sensibilidad son relativos, van a depender del valor de la localización de la infección, así como la vía de administración y la dosis del antibiótico que es empleado (Fernández *et al.*, 2003).

Según Cabrera, Gómez y Zúñiga (2007), algunos factores que pueden contribuir con el desarrollo de la resistencia bacteriana son:

- Los centros hospitalarios tienen medidas ineficientes para el control de las infecciones.
- La falta de campañas educativas para un uso correcto de los medicamentos, por condiciones económicas e ignorancia en prescripciones.
- La severidad de las patologías, así como el manejo de los pacientes cuando se encuentran en unidad de cuidados intensivos.
- La colonización previa de microorganismos resistentes.
- Los procedimientos invasivos como diálisis o cateterización.
- El uso de antibióticos en agricultura puede generar residuos en la carne de los animales, y las bacterias resistentes llevan a una exposición directa a los consumidores. Se pueden encontrar organismos resistentes provenientes de los alimentos de origen vegetal por la irrigación con aguas residuales, o si se aplican antibióticos a los cultivos.
- Se ha documentado la presencia de bacterias resistentes en nacimientos de agua.
- El uso de elementos de limpieza ha incrementado con los años, por lo que se le añaden sustancias antibacterianas, las cuales son semejantes en acción a los antibióticos y puede llegar a acelerar la resistencia.

Mecanismos de resistencia.

Según Calderón y Aguilar (2016), la resistencia antimicrobiana se puede dar por mutaciones cromosomales y el intercambio de material genético de otras bacterias o fagos (virus se desarrollan y reproducen empleando bacterias), por medio de los mecanismos:

- **Transducción:** representa la transferencia de cualquier parte de un genoma bacteriano, cuando un fago atemperado (el cual es genoma del virus que está inserto en el ADN bacteriano) durante la fase de ensamblaje encapsula este material. Se denomina

transducción generalizada si el fragmento de ADN que queda envuelto es completamente bacteriano, pero si solo se encapsula una parte del genoma bacteriano conservando el genoma viral, es transducción especializada (Cabrera, Gómez y Zúñiga, 2007).

- Transformación: se da la transferencia de genes desde el ADN desnudo de una bacteria que previamente ha sido lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma (Cabrera, Gómez y Zúñiga, 2007).
- Conjugación: corresponde a la transferencia del material genético que se encuentra en plásmidos de una bacteria a otra por medio de una hebra sexual; usualmente, estos plásmidos presentan genes que le confieren resistencia a drogas, antisépticos y desinfectantes (Cabrera, Gómez y Zúñiga, 2007).
- Transposición: se da por el movimiento de una sección del ADN (transposon), el cual puede tener genes para la resistencia a diversos antibióticos y otros genes casete que se encuentran unidos para la expresión de un promotor en particular (Cabrera, Gómez y Zúñiga, 2007).

Según Moreno, González y Beltrán (2009), los mecanismos de resistencia antimicrobiana desarrollados por las bacterias son diversos, y entre ellos se encuentran cuatro mecanismos principales:

- Enzimas hidrolíticas: las bacterias sintetizan enzimas que pueden hidrolizar al antimicrobiano, lo que destruye su acción antibacteriana, imposibilitando su acción sobre el microorganismo. La producción de betalactamasas es el mecanismo con mayor frecuencia de resistencia antibiótica, por lo que se emplea un inhibidor enzimático con más afinidad a la enzima, para impedir su destrucción y pueda realizar su acción (clavulanato y sulbactam).

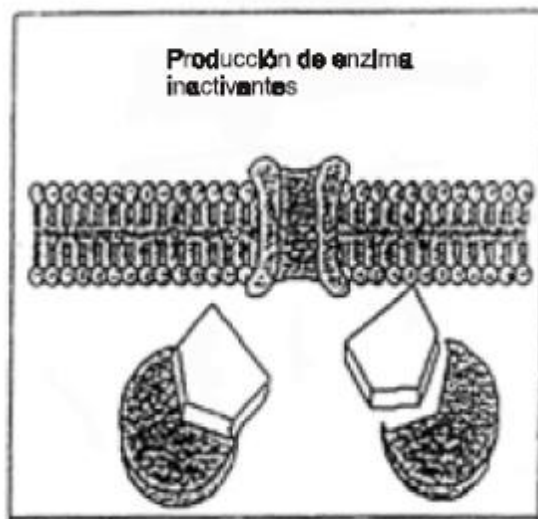


Figura 20. Producción de enzimas inactivantes de antibióticos.

Fuente: Fernández *et al.*, 2003.

- Modificación, 20 del sitio activo: se presenta una modificación en un aminoácido que genera un blanco distinto, lo que disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano.

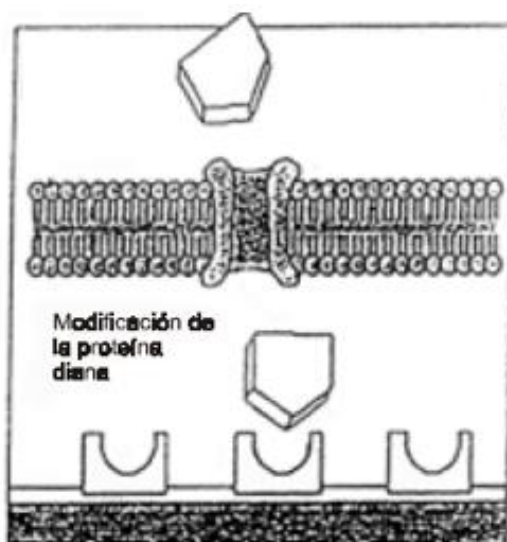


Figura 21. Modificación de la proteína.

Fuente: Fernández *et al.*, 2003.

- Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano: se presentan cambios en el diámetro o el número de porinas que bloquean el ingreso a la bacteria del antimicrobiano.

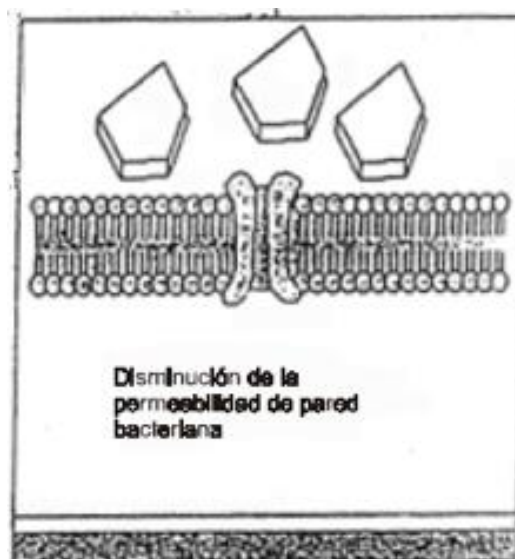


Figura 21. Pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas).

Fuente: Fernández *et al.*, 2003.

- Bombas de eflujo: se encargan de transportar al fármaco al exterior de la célula sin modificaciones, pero al mismo tiempo sin acción antimicrobiana. Para tratar de combatir este mecanismo de resistencia está en estudio, la asociación de inhibidores de bombas de eflujo junto al antimicrobiano.

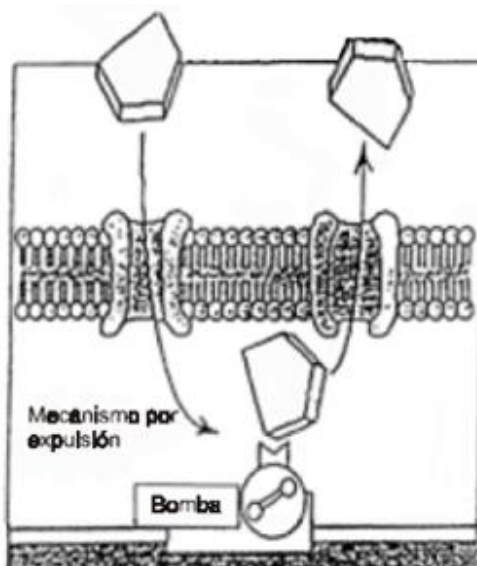


Figura 22. Sistema de expulsión activo del antimicrobiano por bombas expuloras.

Fuente: Feránes *et al.*, 2013.

Staphylococcus Aureus

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) se descubrió en 1880 por un cirujano escocés, quien encontró pus en las heridas quirúrgicas al observar un absceso de un paciente al microscopio. El patógeno se caracteriza por producir infecciones en piel y tejido blando como músculos, tendones, tejidos grasos y vasos sanguíneos. En Latinoamérica, se considera como la principal causa de bacteriemia nosocomial y la segunda en Europa. Los factores de riesgo son niños menores de dos años, diabéticos, personas que usan drogas inyectadas, pacientes con infecciones pulmonares o cutáneas recientes, aunque cualquier persona puede adquirir una infección por este microorganismo (Pasachova, Ramírez y Muñoz, 2019).

Staphylococcus aureus se ha reconocido como uno de los principales patógenos humanos que son responsables de gran número de infecciones tanto comunitarias como nosocomiales. Gracias a la diversidad de factores de virulencia que lo caracterizan, tanto bioquímicos como estructurales, lo hacen un patógeno “perfecto” para colonizar, invadir y diseminarse, siendo responsable de un amplio espectro de manifestaciones clínicas (Jiménez y Correa, 2009).

El género *Staphylococcus* se encuentra formado por cocos Gram positivos que tienen un diámetro de 0.5 a 1.5µm, los cuales se agrupan como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, sin cápsula y anaerobias facultativas. La mayoría de estafilococos son productores de catalasa (enzima que desdobra el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre), lo cual es empleado como característica diferencial con los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (Cervantes, García y Salazar, 2014).

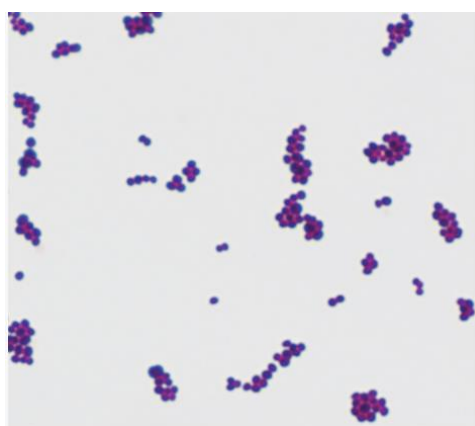


Figura 23. Tinción de Gram de *Staphylococcus aureus*.

Fuente: Riedel *et al.*, 2020.

En este género se encuentran 32 especies, de las cuales 16 forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos. Algunas de ellas son patógenas cuando hay predisposición e inmunosupresión en el huésped. Los medios de cultivo se incuban durante 18 a 24 horas, formando colonias lisas, elevadas, brillantes y con bordes enteros que tienen una consistencia cremosa y pigmentación de amarillo a dorado por la formación de carotenoides. *S. aureus* crece bien en medios no selectivos como agar sangre, agar chocolate y agar infusión cerebro corazón (Cervantes, García y Salazar, 2014).

Para identificar el patógeno se utiliza microscopia, donde se logran observar cocos Gram positivos, y con el fin de confirmar la especie se realiza la prueba de la enzima coagulasa, ya que *S. aureus*, a diferencia de las demás especies de *Staphylococcus*, es coagulasa positiva. En la prueba de catalasa, esta especie produce oxígeno al interactuar con el peróxido de hidrógeno. Se considera como medio de cultivo el agar salado manitol, ya que al presentar agentes inhibidores para que se dé solo el crecimiento de las especies de *Staphylococcus*, las colonias que producen fermentación manitol como *S. aureus* son de color amarillo, y las especies coagulasa negativa producen colonias rojas (Pasachova, Ramírez y Muñoz, 2019).

Resistencia antimicrobiana.

El descubrimiento del primer mecanismo de resistencia de *Staphylococcus aureus* se documenta en los años 40 del siglo XX, debido a la introducción de la penicilina como antibiótico para el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno. Desde ese momento, surgieron cepas resistentes productoras de penicilinasas. En los años 50, se disponen los primeros β -lactámicos estables a la acción de las penicilinasas, como las cefalosporinas de primera generación y la meticilina semisintética. Sin embargo, tiempo después en Inglaterra, surgieron cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA, por su acrónimo en inglés) en aislamientos de origen nosocomial, y se han logrado diseminar a nivel mundial con el paso de los años, especialmente en instituciones que brindan atención especializada (Jiménez y Correa, 2009).

La resistencia a meticilina está dada por la presencia de una proteína alterada de unión a la penicilina que es codificada por el gen *mecA*. Esta proteína está caracterizada por una afinidad reducida para los antibióticos β -lactámicos y por la presencia de un solo dominio transpeptidasa, por lo que lo obliga a apoyarse en la actividad de transglicosilación de la proteína normal (PBP2) para transformar el peptidoglicano en pared celular (Jiménez y Correa, 2009).

Producción de toxinas.

Esta bacteria es capaz de producir componentes superficiales denominados toxinas, así como producir enzimas extracelulares. Estos componentes tienen la capacidad de producir severas intoxicaciones alimentarias en dependencia de la cantidad ingerida de alimento. Las toxinas se dividen según los efectos biológicos que producen en las células, así como la localización dentro de la célula bacteriana (Zendejas, Ávalos y Soto, 2014).

Staphylococcus aureus puede producir gran variedad de toxinas citolíticas identificadas (α , β , δ , γ). La toxina α representa la más importante y es denominada α -hemolisina, es una proteína que casi todas las cepas secretan. Esta citotoxina forma poros que lisan la membrana citoplasmática mediante una inserción directa en la bicapa lipídica para la formación de poros transmembranales (Ryan y Ray, 2017).

La α -hemolisina una vez que es liberada al medio, esta se puede asociar con su célula blanco, por medio de un mecanismo dependiente de receptores específicos o favorecidos por la presencia de colesterol. Esta toxina es particularmente citotóxica para una gran variedad de células eucariotas, particularmente las células del sistema inmune, por lo que constituye un factor importante de virulencia (Castañón, 2012).

Las enfermedades que son transmitidas por los alimentos se originan por el consumo de alimentos que se encuentran contaminados con toxinas microbianas. Dicha contaminación se puede presentar por el contacto del alimento por los encargados de producirlos o que están en contacto directo con estos. En el caso de la mayoría de los brotes por intoxicación, son causados por *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, ya que hay pocas cepas coagulasa negativa con la capacidad de producir enterotoxinas (Zendejas, Ávalos y Soto, 2014).

Se conoce la capacidad que tienen las enterotoxinas de *S. aureus* para la estimulación de síntomas gastrointestinales, principalmente vómitos, en humanos y animales. Estas toxinas, una vez formadas, son estables y mantienen su actividad incluso después de la ebullición o a la exposición con enzimas gástricas y del yeyuno. Las acciones superantigénicas parecen actuar por la estimulación de los reflejos viscerales abdominales, los cuales son transmitidos a los centros eméticos bulbares localizados en el tronco encefálico por medio del nervio vago (Ryan y Ray, 2017).

Patogenia.

De los estafilococos, el que muestra mayor relevancia es *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, debido a que aproximadamente un 20% de los individuos sanos son portadores permanentes de esta bacteria en las fosas nasales. Este porcentaje se incrementa en pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana, hemodializados, y en casos de dermatitis atópica donde se alcanza un valor de hasta el 85% (Aragüés y González, 2007).

Desde el sitio nasal, las bacterias son eliminadas hacia la piel expuesta, ropa del portador y demás personas con las que entren en contacto, y se propagan al tocarse la cara o rascarse la nariz. Una vez en la piel, *S. aureus* puede tener acceso profundo en casos de traumatismos. De manera común, la fuente de la infección va a ser endógena a partir de las narinas anteriores colonizadas o en caso de contacto directo con un portador de la bacteria. En ciertos casos se puede presentar que la cepa produzca una exotoxina circulante similar a los superantígenos estafilocócicos (StaphSAg), lo que puede llevar a ocasionar síndrome de choque tóxico asociado a una infección local.

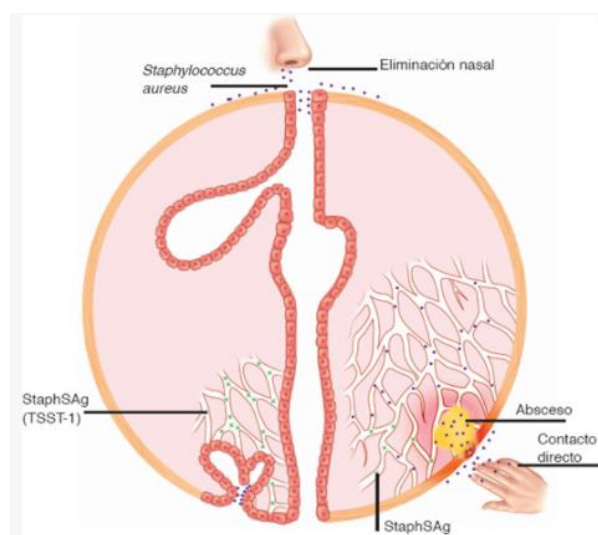


Figura 24. Fuente de infección endógena.

Fuente Ryan y Ray, 2017.

Este microorganismo es uno de los causantes principales de infecciones adquiridas en la comunidad e intrahospitalarias. Las infecciones nosocomiales pueden provocar bacteriemias y provocar afecciones en piel, tejidos blandos y el tracto respiratorio inferior. Las bacteriemias asociadas son con catéter venoso central y neumonía asociada a ventilación mecánica, esto debido a que los pacientes hospitalizados tienen un sistema inmune comprometido y están particularmente

expuestos a infecciones. *S. aureus* es responsable de enfermedades mediadas por toxinas, como el síndrome de choque tóxico, síndrome de la piel escaldada y enfermedades que son transmitidas por los alimentos (Castañón, 2012).

Staphylococcus aureus tiene en su superficie proteínas denominadas “moléculas adhesivas de matriz que reconocen componentes de superficie microbiana”, las cuales se encargan de mediar la adherencia a los tejidos del hospedero para inicial la colonización que lleva a establecer la infección. Las proteínas A y B de unión a fibronectina (FnbpA y FnbpB) favorecen la unión de la bacteria a los componentes de la matriz extracelular como la fibronectina. La proteína Cna es responsable de la adhesión a colágena de la matriz. Así, las proteínas ClfA y ClfB (factor aglutinante A y B) son las encargadas de aglutinar y adherir la bacteria al fibrinógeno (Castañón, 2012).

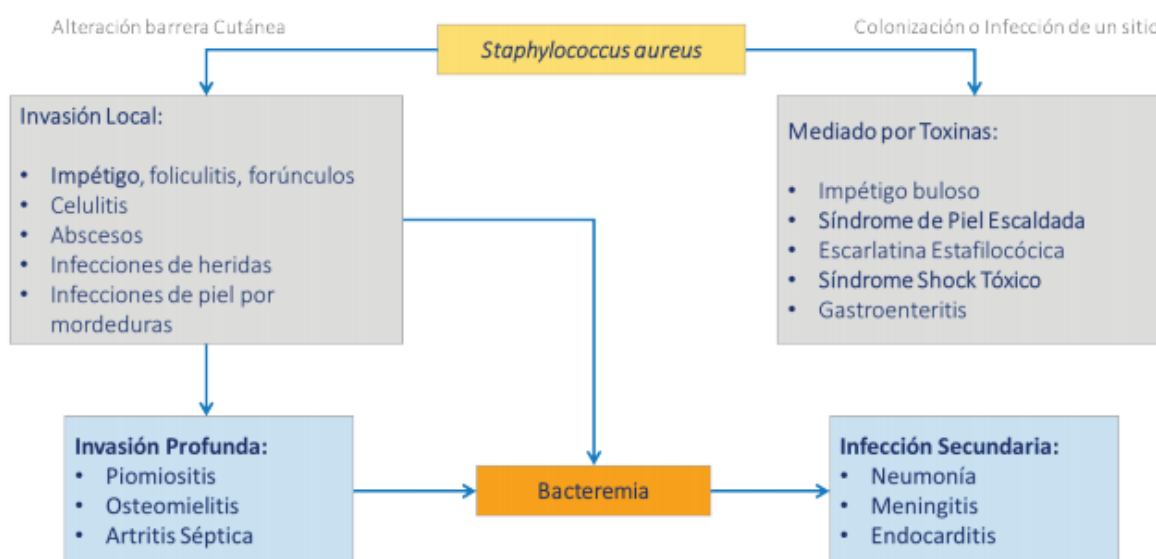


Figura 25. Mecanismos patogénicos de *Staphylococcus aureus*.

Fuente: Faúndes *et al.*, 2019.

Determinantes de patogenicidad.

Las enfermedades infecciosas son el resultado de la interacción que hay entre el microorganismo causal y el huésped. Se pueden dividir los factores de patogenicidad que posee *Staphylococcus aureus* en tres grupos: los componentes de la pared celular, las enzimas y toxinas.

Determinante de patogenicidad	Propiedades
Componentes de la pared celular <ul style="list-style-type: none"> ▪ Peptidoglicano ▪ Ácidos teicoicos ▪ Proteína A ▪ Cápsula mucoide 	Activación del complemento Antifagocítica Antifagocítica Adherencia
Enzimas <ul style="list-style-type: none"> ▪ Coagulasa ▪ Estafiloquinasas ▪ Hialuronidasa ▪ Lipasas 	Formación de absceso Destrucción del coagulo Invasión hística Colonización
Toxinas <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemolisinas ▪ Leucocidina ▪ Toxina exfoliatina ▪ Toxina del shock tóxico ▪ Enterotoxinas 	Rotura de la membrana celular Alteración de la permeabilidad celular de fagocitos Epidermólisis Shock Intoxicación alimentaria

Figura 26. Determinantes de patogenicidad de *S. aureus*.

Fuente: Seija, 2006.

La pared celular se compone por una capa gruesa de peptidoglicano, se trata de un polímero polisacárido que se está formado por cadenas con uniones de tipo β (1,4) no ramificadas, que contienen subunidades alternantes de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina. Las cadenas laterales de pentapéptido se encuentran conectadas al residuo de ácido murámico, el cual posee una unión cruzada por un puente pentaglicina que está fijado a la L-lisina de una cadena y la D-alanina de la otra cadena, y tiene como función mantener la rigidez de la pared bacteriana y la resistencia osmótica, que a su vez contribuye con la patogenia porque desencadena la inflamación por activación del complemento. Es capaz de atraer leucocitos polimorfonucleares (PMN) y estimula la producción de anticuerpos opsonizantes (Seija, 2006).

Los ácidos teicoicos son el mayor componente de la pared, representan un 40% del peso de la pared. Son polímeros de glicerol o ribitol fosfato, azúcares y D-alanina (algunas veces). Se encuentran unidos de forma covalente al peptidoglicano. Cuando están unidos a la membrana citoplasmática, se denominan ácidos lipoteicoicos. *Staphylococcus aureus* posee ácido de ribitol fosfato en predominancia, mientras que en los estafilococos coagulasa negativos predomina el glicerol fosfato (Seija, 2006).

La presencia de cápsula es variable, pero su importancia a nivel patogénico se debe a las propiedades antifagocíticas; las cepas de *S. aureus* que tienen cápsula son más virulentas. No hay

claridad sobre si esta cápsula juega un papel importante en la adherencia, pero sí se conoce que la adherencia de la bacteria a las válvulas cardíacas y cuerpos extraños es mediada por receptores de fibronectina (glicoproteína importante en varias funciones de adherencia) en su superficie. Cuando las cepas de *S. aureus* poseen gran cantidad de receptores de fibronectina, suelen ser más invasivas y con mayor habilidad para adherirse (Seija, 2006).

En la pared celular de *S. aureus* se encuentra la proteína A, la cual posee la habilidad de unirse a la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina G (IgG), por lo que va a llegar a funcionar como un factor de virulencia, debido a que interfiere con la opsonización y con la ingestión de los microorganismos por parte de los leucocitos polimorfonucleares, ya que activan el complemento y dan lugar a reacciones de hipersensibilidad tanto inmediata como tardía (Seija, 2006).

Según Seija (2006), las enzimas que contribuyen con los factores de patogenicidad de este patógeno son:

- Catalasas: pueden actuar inactivando algunos sistemas de ingestión de los PMN.
- Coagulasas: cubren a la célula de fibrina, lo que la vuelve más resistente a la opsonización y a la fagocitosis.
- Estafiloquinasas: degradan la fibrina y contribuyen con la invasión de tejidos vecinos.
- Hialuronidasas: hidrolizan la matriz intracelular de mucopolisacáridos de los tejidos y así contribuyen con la diseminación a tejidos subyacentes.
- Lipasas: las cepas productoras de forunculosis crónica son productoras potentes de lipasas, lo que ayuda al microorganismo a diseminarse al tejido cutáneo y subcutáneo.
- Fosfolipasa C: se asocia con cepas recuperadas de pacientes con distrés respiratorio del adulto y coagulación intravascular diseminada (eventos que se dan durante la sepsis). Los tejidos afectados por esta enzima son más susceptibles al daño y a la destrucción por componentes bioactivos del complemento y sus productos durante su activación.
- DNAsas, proteasas y fosfatasas: estas colaboran con el proceso infeccioso y con la producción de las lesiones.

Las toxinas que puede producir *Staphylococcus aureus* de acción general son las hemolíticas (α , β , γ y δ) y la leucocidina, y las toxinas especializadas como las exfoliatinas, toxina del shock tóxico y enterotoxinas. Las hemolisinas son toxinas citolíticas importantes sobre una variedad de células. Según Seija (2006), las toxinas son las siguientes:

- α hemolisina o α toxina: posee efecto letal en una variedad de membranas celulares eucariotas, incluyendo la PMN humanos, y la de eritrocitos de diferentes especies animales si son administradas vía intravenosa. Es la causante de la zona de hemólisis que se observa alrededor de las colonias de *S. aureus*.
- B hemolisina: corresponde a una esfingomielinasa activa sobre diferentes células como leucocitos, eritrocitos y fibroblastos.
- γ y δ hemolisinas: se presentan en ciertas cepas de *S. aureus* y lisan una variedad de células.
- Leucocidina: exotoxina que posee efecto tóxico directo sobre las membranas de los PMN humanos, lo que causa degranulación del citoplasma, hinchamiento celular y lisis. Su modo de acción es la formación de poros que alteran la permeabilidad celular para el potasio y otros cationes.
- Exfoliatina o toxinas epidermolíticas: ciertas cepas de *S. aureus* las producen y consisten en dos proteínas, que son bioquímica e inmunológicamente diferentes, pero algunas de sus funciones biológicas son similares. La exfoliatina A es producto de genes cromosómicos, termoestable y se inactiva por EDTA, y la exfoliatina B tiene origen plasmídico, se inactiva con el calor y es estable frente al EDTA. Ambas tienen actividad proteolítica, pueden actuar como superantígenos y logran disolver la matriz mucopolisacárida de la epidermis, lo que resulta en la separación intraepitelial de las uniones en el estrato granuloso. Las cepas que son productoras de estas toxinas son responsables del síndrome de piel escaldada.
- Enterotoxinas: son moléculas termoestables que son responsables de la intoxicación alimentaria que es producida por ciertas cepas de *S. aureus*. Su modo de acción es desconocido, pero se sabe que aumentan el peristaltismo.
- Toxina del shock tóxico: también denominada enterotoxina F. Se implica en la patogenia del síndrome del shock tóxico. Aunque el rol es poco claro, tiene gran cantidad de actividades biológicas.

Cuadro clínico.

Infección primaria.

Las infecciones se caracterizan por lesiones agudas, purulentas y destructivas localmente. La más familiar es el forúnculo común, el cual es un nódulo doloroso en la piel, que cuenta con un centro necrótico y con una cubierta fibrosa reactiva. El forúnculo o divieso representa una infección primaria, la cual es un absceso, y prototipo de lesiones purulentas que pueden ser causadas por otras bacterias (Ryan y Ray, 2017).

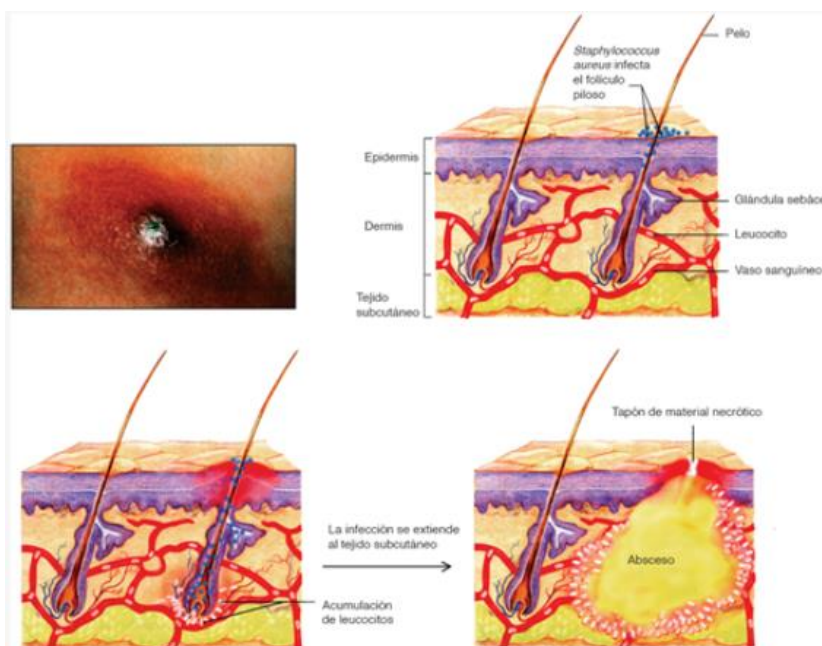


Figura 27. Naturaleza de la lesión.

Fuente: Ryan y Ray, 2017.

El forúnculo es una infección superficial cutánea que se puede desarrollar en un folículo piloso, glándula sebácea o glándula sudorípara. Se da un bloqueo del conducto glandular, en el cual se da la condensación del contenido, causando una predisposición a la infección. Generalmente, el curso de la infección es benigno, sin embargo, se puede extender a partir del forúnculo a través de abscesos en los tejidos subcutáneos adyacentes, esta lesión se conoce como ántrax. Es más frecuente que ocurra en la parte trasera del cuello, pero puede comprometer otras localizaciones cutáneas (Ryan y Ray, 2017).

Los abscesos locales se producen cuando el microorganismo se inocula en la piel desde el sitio de transporte. El *S. aureus* puede difundirse a nivel local o tener acceso al torrente sanguíneo;

una vez en sangre, se propaga a sitios periféricos en órganos distantes y esta diseminación puede provocar las infecciones. Si no hay invasión, hay posibilidad de que se presenten síndromes específicos que son provocados por el efecto de toxinas de acción local o sistémica (Castañón, 2012).

Según el nivel de intensidad de la reacción inflamatoria y de afectación, se presenta una foliculitis. Es una piodermatitis que afecta principalmente al folículo. Generalmente es superficial y se localiza en el cuero cabelludo, zona de la barba, en extremidades y glúteos. Se debe realizar diagnóstico diferencial con acné, tiña y pseudofoliculitis de la barba (Aragüés y González, 2007).



Figura 28. Foliculitis.

Fuente: Aragüés y González, 2007.

Síndrome estafilocócico de piel escaldada.

El síndrome estafilocócico de la piel escaldada se presenta como el resultado de la producción de exfoliatina en una lesión estafilocócica. Se caracteriza por presentar eritema y descamación intraepidérmica en sitios en los cuales no se puede aislar *S. aureus*. Se presenta con mayor frecuencia en neonatos y niños menores a los cinco años. El rostro, las axilas y la ingle son las primeras zonas en verse afectadas, pero puede extenderse en todo el cuerpo. Se puede presentar en adultos, especialmente en aquellos que se encuentran inmunocomprometidos (Ryan y Ray, 2017).



Figura 29. Síndrome estafilocócico de piel escaldada en un neonato.

Fuente: Ryan y Ray, 2017.

El tiempo de incubación puede variar entre una a 10 días desde la infección y hasta la posible expresión del síndrome estafilocócico de piel escaldada. Se presenta un cuadro inicial con pródromo, el cual se caracteriza por malestar general, fiebre, seguido por un exantema eritematoso de manera generalizada y con un inicio abrupto. En el segundo día de evolución, se presenta exantema escarlatiniforme, e hiperestesia cutánea con ampollas con signo de Nikolski positivo (se da la fácil ruptura de la bula frente a la presión tangencial suave). Alrededor del tercer y quinto día de evolución se da una exfoliación cutánea generalizada, lo que da paso a parches eritematosos bien definidos, se pueden extender a áreas mayores y se acompañan de fiebre y alteración de la consciencia (Faúndes *et al.*, 2019).

Su inicio se da a partir de un foco séptico en mucosas (como oído medio, faringe, conjuntiva) o en piel, y generalmente es adquirido por portadores asintomáticos, los cuales representan entre un 15% y 40%, como las madres, enfermeras o niñeras. Se da una reacción exfoliativa que es producida por dos exotoxinas epidermolíticas (exfoliatinas A y B). Estas toxinas producen epidermolisis subgranular y por la acción proteolítica dan lugar a la pérdida de adherencia celular en la parte alta de la epidermis (Arenas, 2019).

Su diagnóstico principalmente es clínico. La sospecha se da en caso de presentar lesiones vesículo-bulosas, con signo de Nikolsky positivo y una apariencia de piel escaldada. Puede haber similitud con trastornos como la necrólisis epidérmica tóxica, reacción inmunológica a fármacos o

infección; y son clínicamente diferenciables por la ausencia de afección de mucosas, la descamación más superficial y la ausencia de antecedentes de fármacos. Se puede hacer un hemocultivo para intentar aislar el microorganismo, pero el rendimiento es bajo; además de que el cultivo de las lesiones no es recomendado, ya que se emplea solamente con fines académicos (Faúndes *et al.*, 2019).

Tratamiento.

La mayoría de los abscesos estafilocócicos superficiales y forúnculos se logran resolver de manera espontánea, sin necesidad del uso de terapias antimicrobianas. Las lesiones más extensas, profundas o que se localizan en órganos pueden requerir del drenaje quirúrgico y agentes antimicrobianos para su resolución. La penicilina G es el tratamiento de elección. Las penicilinas resistentes a la penicilinas (metecilina, oxacilina y nafcilina), así como las cefalosporinas de primera generación se emplean mayoritariamente por la elevada resistencia a la penicilina (Ryan t Ray, 2017).

Más del 90% de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* producen betalactamasas que inactivan a la penicilina. Las penicilinas resistentes a penicilinasas son los betalactámicos que poseen mayor actividad intrínseca frente a las cepas productoras de betalactamasas, como la metecilina, nafcilina y penicilinas isoxazólicas; así como las asociaciones de una penicilina con un inhibidor de betalactamasas, las cefalosporinas principalmente de primera generación y los carbapenems (Mensa *et al.*, 2013).

Al limitar los aspectos farmacocinéticos con mayor importancia clínica sobre los betalactámicos usados para el tratamiento de la infección estafilocócica por vía intravenosa se encuentran cloxacilina y cefazolina, y como alternativa de tratamiento por vía oral se encuentra cefalexina y cefadroxilo (Mensa *et al.*, 2013).

El tratamiento empírico adecuado corresponde a un factor predictor de supervivencia. Cuando es identificado el microorganismo y se ha analizado su perfil de sensibilidad, se debe adecuar el tratamiento a estos resultados con el antibiótico correcto. Los antibióticos presentan diferencias en la actividad intrínseca frente *Staphylococcus aureus*, y su elección va a depender del antibiograma, así como de la condición clínica del paciente, sus comorbilidades, la función renal y el foco de la infección (Carmona y Del Pozo, 2018).

Actualmente, la oxacilina es el medicamento de elección para el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus*; sin embargo, el panorama no es del todo alentador por el nivel

de resistencia que se ha reportado para la meticilina, considerando que en 1996 se dio el surgimiento de las primeras cepas que presentaron sensibilidad disminuida a los glicopéptidos (vancomicina), que eran los antibióticos considerados de elección para el control de MRSA (Jiménez y Correa, 2009).

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

En el presente capítulo se expondrá la metodología que rige la elaboración de este trabajo de investigación, la cual está conformada por criterios de inclusión y exclusión de los artículos que se analizarán, así como el detalle de las fuentes de información de los artículos que han sido tomadas como una base de apoyo y las categorías de análisis.

Enfoque

El enfoque en el cual se desarrolla la investigación es cuantitativo. Para Hernández, Fernández y Baptista (2014) en su libro titulado *Metodología de la Investigación*, se define el enfoque cuantitativo como secuencial y probatorio, en el que cada etapa va precedida por otra en la cual hay un orden de pasos a seguir. Por lo que, partiendo de una idea que se encuentre delimitada, se pueden llegar a derivar objetivos y preguntas de investigación.

Se selecciona este enfoque dado que se busca sintetizar nanopartículas de plata por medio de química verde usando las cáscaras de rambután y desechos de jengibre como agentes catalizadores, para luego evaluar la efectividad como antimicrobianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

Diseño

Según Hernández, Fernández y Baptista (2014), el diseño de la presente investigación es experimental, en el cual se da la manipulación de manera intencional de una o más variables que son independientes. La variable independiente representa la causa en relación entre variables, y el efecto que provoque se denomina variable dependiente.

A su vez, el subtipo es experimento puro, como lo explican Hernández *et al.* (2014), en el cual se reúnen los requisitos para obtener el control y la validez interna por medio de grupos de comparación en los cuales se da la manipulación de las variables independientes, así como la equivalencia de los grupos.

Fuentes de Información

En este trabajo de investigación se analizarán trabajos de tesis y artículos científicos que hayan sido publicados, con el fin de sustentar la parte experimental, los cuales se encuentran

disponibles en Google Académico, ScienceDirect, PubMed, MDPI, Taylor & Francis, Web of Science, la biblioteca de la Universidad Internacional de las Américas y la biblioteca de la Universidad de Costa Rica.

Criterios de Inclusión

Se tomarán en cuenta los artículos y trabajos finales de graduación que se encuentren en el idioma de español o inglés, cuya antigüedad no sobrepase seis años de publicación y los cuales hagan referencia al tema para esta investigación. La búsqueda se llevará a cabo con la búsqueda de las siguientes palabras claves: “caracterización de nanopartículas”, “síntesis verde de nanopartículas”, “aplicaciones de nanopartículas”.

Criterios de Exclusión

Se descartarán los artículos o trabajos de investigación que tengan más de seis años de publicación, así como otro idioma distinto a los descritos en el criterio de inclusión, y que el tema abordado no permita brindar apoyo al problema planteado. Además de todos los recursos que no se encuentren en revistas o bases de datos indexadas.

Variables de la Investigación

Tabla 3.

Operacionalización de variables de la investigación.

Objetivo específico	Variable	Definición conceptual	Indicador	Definición operacional	Instrumento
Definir la metodología de extracción mediante el diseño de experimentos para la obtención de los compuestos fitoquímicos que actuarán como agentes reductores en la formación de las nanopartículas de plata.	Extracción de compuestos fitoquímicos.	La formación de nanopartículas por medio del uso de plantas y sus extractos como agentes reductores y estabilizantes prolongan la vida útil de las nanopartículas metálicas y evita efectos no deseados por el uso de solventes orgánicos. (Hernández, 2013).	Formación de nanopartículas al interactuar con la solución de nitrato de plata.	Extracto del desecho de jengibre. Extracto de las cáscaras de rambután. Solución de nitrato de plata. Agitador magnético.	Sistema de extracción en medio acuoso.
Identificar las nanopartículas de plata mediante la ejecución de diversas pruebas fisicoquímicas.	Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas	Las nanopartículas metálicas tienen propiedades ópticas, biológicas, magnéticas, electrónicas y catalíticas que van en función del tamaño, la	Espectro de absorción ultravioleta visible.	Espectrofotómetro Uv-Vis.	Análisis de espectroscopía de ultravioleta visible.

		composición, la forma, la cristalinidad y la estructura (Sánchez, 2017).			
Evaluar la efectividad antimicrobiana de las nanopartículas formadas a través de estudios microbiológicos para la identificación de aquellas bacterias susceptibles a su acción.	Efectividad antimicrobiana de las nanopartículas	La efectividad de las nanopartículas en aplicaciones para materiales antimicrobianos va a depender del tamaño de partícula, morfología, estabilidad y sus propiedades químicas y físicas (Betancur, Hernández y Buitargo, 2016).	Concentración Mínima Inhibitoria para <i>Staphylococcus aureus</i> .	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Técnica de microplaca.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Instrumentos y Técnicas

Materiales

- Cáscaras de *Nephelium lappaceum*.
- Raíz de *Zingiber officinale*.
- *Beakers* de varios tamaños.
- Pastillas de agitación.
- Pizeta.
- Probetas de varios tamaños.
- Microespátula.

- Balón aforado.
- Embudos.
- Goteros.
- Papel filtro.
- Papel aluminio.
- Pipeta graduada.
- Pera.
- Termómetro.

Equipos y Condiciones

- Espectrofotómetro Uv-Vis.
 - Blanco: Nitrato de plata $1 \times 10^{-3} \text{M}$.
 - Cubetas de cuarzo.
 - Longitud de onda: 240 a 740nm.
- Balanza granataria.
- Centrifuga.
Velocidad: 5000 rpm.
Tiempo: 15 minutos.
- Espectroscopía Infrarrojo.
 - FTIR serie 5500 Agilent.
 - Temperatura: 25°C.
 - Rango: 600 a 4000 cm^{-1} .
 - Humedad relativa: 30%.
 - Escaneos por réplica: 200.
 - Tres réplicas.

Reactivos

- Nitrato de plata.
- Agua destilada.

Procedimiento de Recolección y Análisis de Datos

Elaboración del Extracto de *Nephelium Lappaceum* y *Zingiber Officinale*

Se pesó aproximadamente 10g de macerado de las cáscaras *Nephelium lappaceum* y de raíz de *Zingiber officinale* en *beakers* de 150mL. A cada uno de los *beaker* se les agregó 100mL de agua y se puso en agitación constante con una pastilla de agitación a 500rpm a 60°C durante una hora.

Los extractos anteriores se filtraron con papel filtro Wattman N2 hasta su completa filtración. El filtrado obtenido se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se trasvasó el contenido filtrado y los sedimentos se descartaron. Se volvió a filtrar con Millipore 0,45µm.



Figura 30. Macerado de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.



Figura 31. Macerado de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Estudio Preliminar de la Síntesis Verde de Nanopartículas de Plata

Se pesó exactamente 17 mg de nitrato de plata en un balón aforado de 100,00mL, y se llevó a aforo con agua destilada para lograr una concentración final de $1 \times 10^{-3} M$. Se tomaron 20mL de esta solución y se colocaron en 8 *beakers* de 50mL. Para la síntesis en ambos casos, se añadieron alícuotas de 0,50mL, 0,75mL, 1,00mL y 2,00mL del extracto a una velocidad constante gota a gota. Seguidamente, se mantuvo en agitación a 500rpm y se evaluó la formación de nanopartículas mediante espectroscopio ultravioleta visible a las 1, 3 y 24 horas en un rango de longitud de onda de 200 a 900nm.

$$M = \frac{1,0 \times 10^{-4} \text{ mol}}{0,1 L} = 1 \times 10^{-3} M$$

Diseño de Experimentos para *Zingiber Officinale*

Tabla 4.

Condiciones para elaboración de extractos.

Extracto de <i>Zingiber officinale</i>		
Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
1	60	2
2	80	2
3	60	1
4	80	1

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Los extractos se realizaron por triplicado, se filtraron con papel filtro Wattman N2 hasta su completa filtración. El filtrado obtenido se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se trasvasó el contenido filtrado y los sedimentos se descartaron. Se volvió a filtrar con Millipore 0,45 μm . Los extractos obtenidos fueron utilizados para el estudio confirmatorio de la síntesis verde de nanopartículas de plata.



Figura 32. Tratamiento 1 *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.



Figura 33. Tratamiento 2 Zingiber officinale.

Nota: Elaboración propia, 2021.



Figura 34. Tratamiento 3 Zingiber officinale.

Fuente: Elaboración propia, 2021.



Figura 35. Tratamiento 4 *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Estudio Confirmatorio de la Síntesis Verde de Nanopartículas de Plata a Partir del Extracto de *Zingiber Officinale*

Se tomó una alícuota de 2,5mL que se añadió a 20mL de nitrato de plata extracto a una velocidad constante gota a gota. Seguidamente, se mantuvo en agitación a 400 rpm y se evaluó la formación de nanopartículas mediante espectroscopio ultravioleta visible a las 1, 3 y 24 horas en un rango de longitud de onda de 200 a 900nm.



Figura 36. Agitación de 2,5mL de extracto de *Zingiber officinale* con nitrato de plata.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Caracterización Físicoquímica de las Nanopartículas

Espectroscopía ultravioleta visible.

Se usó una cubeta de cuarzo con la solución blanco de nitrato de plata $1 \times 10^{-3} \text{M}$ y se colocó en la primera celda del espectroscopio para establecer la línea base. La segunda cubeta de cuarzo contenía la solución obtenida en la síntesis verde y se colocó en la segunda celda para realizar el barrido de absorción. Se leyeron las absorbancias en un rango de longitud de onda de 200 a 900nm, haciendo lecturas cada 1nm.



Figura 37. Muestra de nanopartículas de plata a partir del extracto de *Nephelium lappaceum* en la cubeta de cuarzo para su lectura en el espectroscopio UV-visible.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Espectroscopía infrarroja.

Se colocaron tres gotas de la muestra en el visor de muestreo de diamante, de manera que cubriera toda el área superficial del cristal de diamante. Se giró la tuerca estriada hasta que llegara a la posición de bloqueo. En el *software* MicroLab se dio clic a “Siguiente” para continuar con el análisis y se obtuvo el espectro.



Figura 38. Espectro infrarrojo marca Agilent.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Evaluación Antimicrobiana

Materiales y equipo.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Medio antibiótico #11
- Medio antibiótico #1
- Fosfato monobásico de potasio
- Fosfato dibásico de potasio
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Ácido fosfórico 18N
- Hidróxido de potasio 10N
- Agua destilada
- 1 *beaker* 3000mL
- 1 probeta 1000mL
- 1 micropipeta 1000 μ L
- 1 micropipeta 200 μ L
- 1 probeta 250mL
- 1 probeta 50mL
- 16 placas Petri

- 3 gasas estériles
- Pinzas
- 96 penicilindros de acero inoxidable de 8 mm de diámetro externo, 6 mm diámetro interno, 0,1 mm de altura
- pHmetro
- Balanza analítica
- Incubadora
- Autoclave
- Vernier
- Refrigerador
- Espectrofotómetro UV-VIS
- Dispensador penicilindros
- Agitador magnético
- Pastilla de agitación
- Termómetro infrarrojo

Solución buffer estéril 0.1M pH 8,0.

Se pesaron 16,73g de fosfato dibásico de potasio y 0,523g de fosfato monobásico de potasio en un *beaker* de 2000mL y se disolvió en 1000mL de agua purificada medida con probeta. Se ajustó el pH con H_2PO_4 18 N o KOH 10N a pH $8,0 \pm 0,1$. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Solución salina estéril 0,9% p/v.

Se disolvieron 0,9 g de cloruro de sodio (NaCl) en 100mL de agua destilada. Se dispensó en tubos de ensayo, en los cuales se colocó alrededor de 10mL por tubo. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Preparación de las muestras.

Se emplearon como muestras las soluciones resultantes de los tratamientos para la formación de las nanopartículas de plata con los extractos de *Nephelium lappaceum* y *Zingiber officinale*.

Solución de trabajo de estándar.

El estándar que se empleó para la prueba fue la solución de nitrato de plata $1 \times 10^{-3} \text{M}$.

Preparación del inóculo.

Se subcultivó el microorganismo de prueba en medio #1, se incubó a 35°C durante 24 horas. El microorganismo se usó en un pasaje no mayor a 5. Se suspendió el microorganismo obtenido de un cultivo en su fase exponencial (obtenido del subcultivo del microorganismo 24 horas antes de realizar el análisis) en 3mL de solución salina y se transfirió la solución a un frasco de vidrio estéril. Se diluyó una cantidad de la solución del microorganismo con solución salina estéril hasta que se obtuvo una transmitancia de $25\% \pm 2$. Se realizó las mediciones de transmitancia en el espectrofotómetro UV-visible a 580nm.

Se tomó una alícuota de $800\mu\text{L}$ de la solución de microorganismo y se colocó en 200mL de medio antibiótico #11 que se ha autoclavado previamente con una pastilla de agitación dentro a 45°C , monitoreado con termómetro infrarrojo a baño María en el agitador magnético con movimiento continuo para una distribución del calor uniforme. Este medio se usó de capa semilla.

Desarrollo de la prueba.

Se prepararon 16 placas Petri con 21mL de medio antibiótico # 11 cada una, correspondiente a la capa base. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se agregaron 4mL de medio capa semilla. Con la capa semilla solidificada, se colocaron seis penicilindros a cada placa, se encontraba a 25°C medida con termómetro infrarrojo. Para la curva estándar, se preparó por triplicado para cada dilución estándar (S1, S2, S3, S4, S5), y se llenó en cada placa penicilindros alternos con $200\mu\text{L}$ de la dilución estándar (S3) y $200\mu\text{L}$ de la dilución estándar (S1).

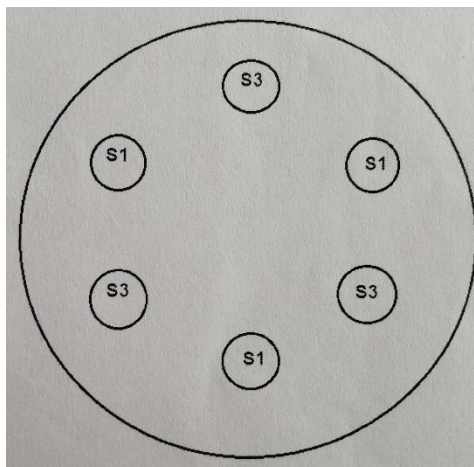


Figura 39. Distribución de las soluciones estándar en los penicilindros.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Para realizar las muestras, se tomó una placa para cada muestra preparada. Se llenó en cada placa penicilindros alternos con 200 μ L de la solución de prueba. Se colocó un papel filtro 125mm celulosa en cada placa y se tapó. Se incubaron todas las placas Petri por 16 a 18 horas a una temperatura de 35°C.



Figura 40. Preparación de ensayos microbiológicos.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

Estudios Preliminares

Al realizar los estudios preliminares para determinar la posible formación de las nanopartículas de plata, a partir de los extractos de desechos naturales de *Nephelium lappaceum* y *Zingiber officinale*, se logra demostrar que con el extracto de rambután sí se da su síntesis a las 24 horas, ya que se observan las nanopartículas en la siguiente curva de color gris obtenida con las lecturas de las absorbancias en un rango de longitud de onda de 200 a 900nm.

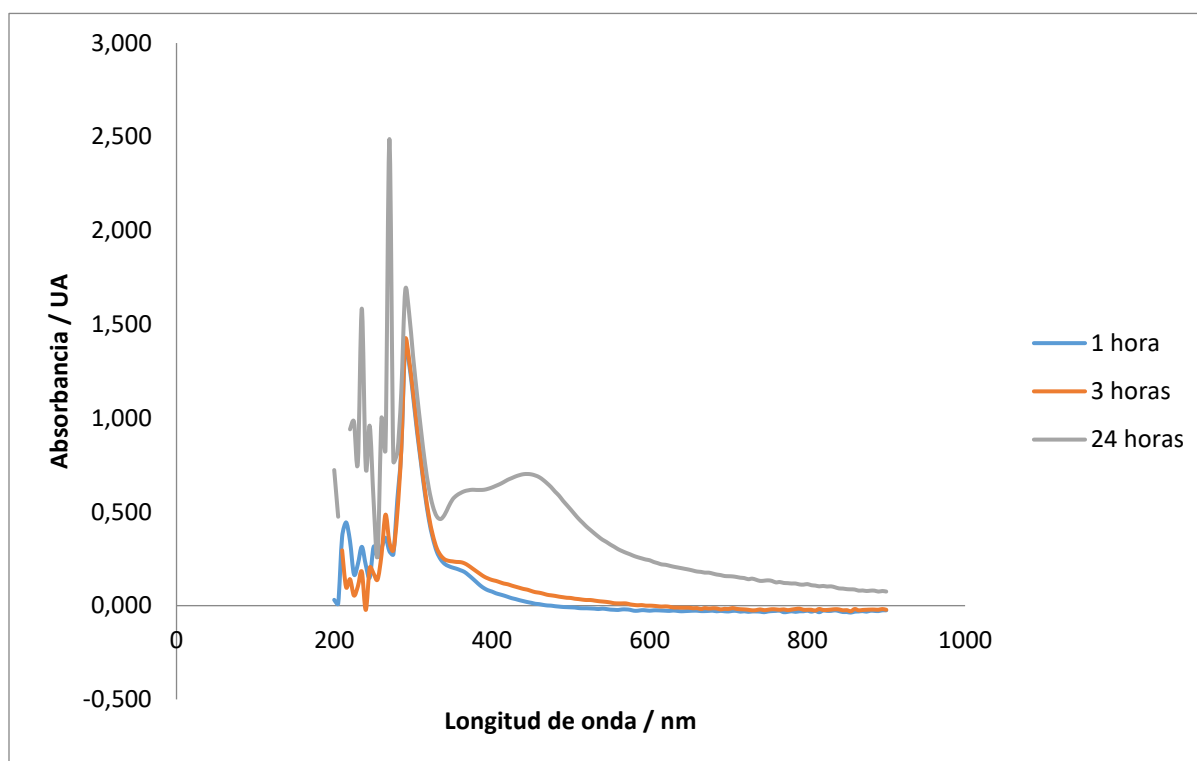


Figura 41. Estudio preliminar del extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Léase como la curva color azul el muestreo hecho a una hora, la curva anaranjada la lectura a las 3 horas y la curva color gris representa el muestreo pasadas 24 horas de agitación.

En este estudio preliminar se empleó una alícuota del extracto de 0,5mL y sus respectivas evaluaciones a 1h, 3h y 24h de agitación constante. Con la figura anterior se ratifica que para este extracto no es necesario el desarrollo de un diseño de experimentos, debido a que se observa claramente la formación de las nanopartículas de plata con este extracto como agente reductor y

estabilizador. Sin embargo, se evalúan tres alícuotas distintas con el propósito de conocer si se puede obtener una curva más pronunciada a las 24 horas.

En el caso del jengibre, el gráfico resultante de las lecturas de las absorbancias en el rango de longitud de onda no muestra una clara síntesis de nanopartículas de plata, debido a que no se logra definir una curva (como se muestra en la figura 43), lo que no permite determinar con exactitud si hay presencia de nanopartículas o la curva representa al extracto. Por esta razón, se hace el diseño de experimentos para este extracto para evaluar condiciones de extracto distintas, y si esto llega a influir directamente en la formación de las nanopartículas de plata.

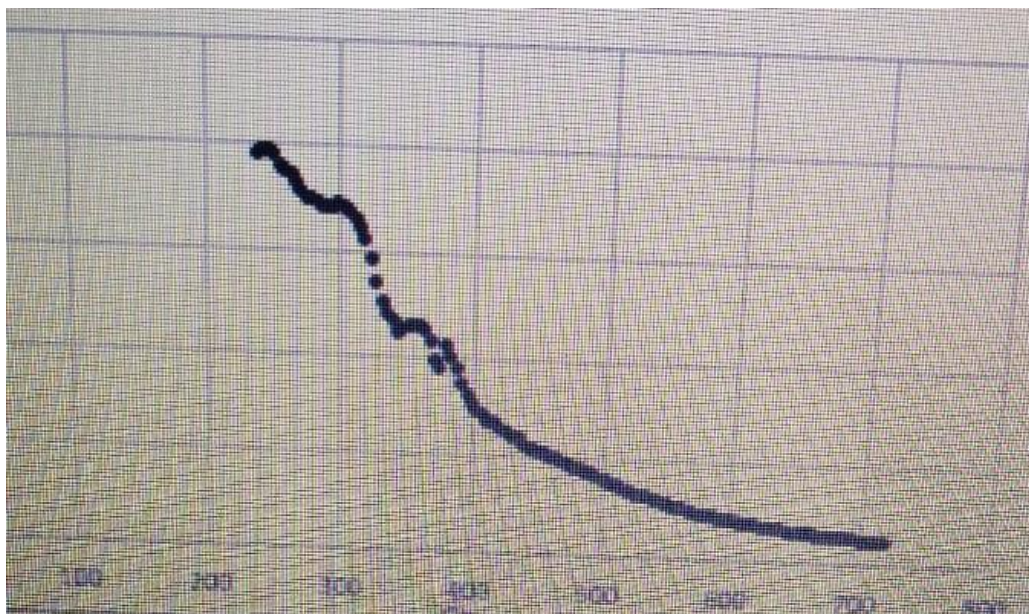


Figura 42. Estudio preliminar del extracto de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Con base en el artículo “Fabrication of silver nanoplates using *Nephelium lappaceum* (Rambutan) peel: A sustainable approach”, se logra demostrar que, a partir del extracto de la piel del rambután, el cual tiene función de reductor y estabilizador, permite la síntesis de nanoplacas de plata, por su evaluación en el espectro UV-visible en una longitud de onda de 370 a 495nm. Las curvas evaluadas se realizaron en distintos tiempos, para determinar si la formación de nanopartículas es dependiente del tiempo de agitación del extracto con el nitrato de plata (Kumar, Smita, Cumbal y Angulo, 2015).

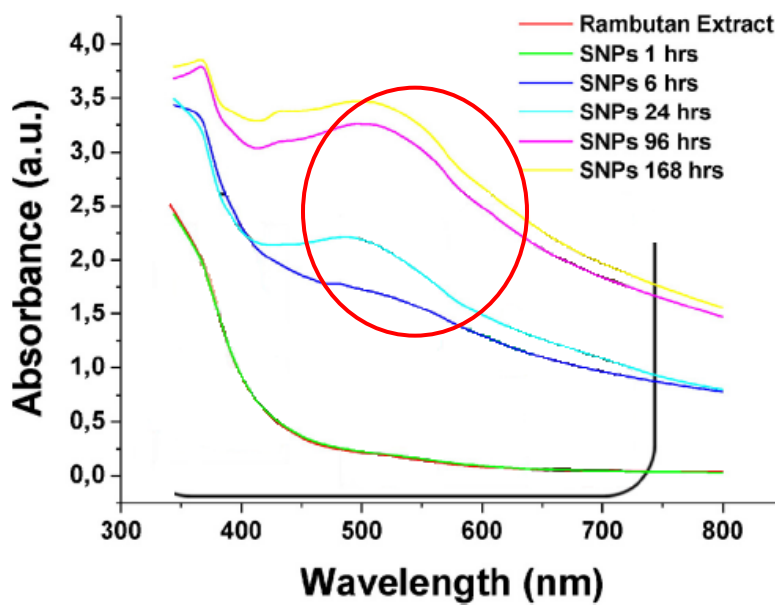


Figura 43. Espectro de nanopartículas de plata con el extracto de la piel del rambután.

Fuente: Kumar, Smita, Cumbal y Angulo, 2015.

La sección de las últimas tres curvas señaladas en el círculo rojo evidencia la presencia de las nanopartículas de plata, lo que demuestra que conforme mayor tiempo de agitación tiene el extracto de la cáscara de rambután con la solución de nitrato de plata, más nanopartículas se van a formar, y por lo tanto, la curva va a ser más pronunciada. A su vez, se usa como referencia la curva roja, la cual se encuentra sobrepuesta a la curva verde, representando el espectro del extracto de piel de rambután y la primera hora agitación con AgNO_3 , respectivamente.

Al analizar la curva formada en la figura 43, no se logra diferenciar con claridad si hay formación de nanopartículas, ya que la segunda elevación que se logra observar en el gráfico puede representar el extracto de jengibre por sí solo, y que la alícuota tomada de este para la síntesis junto con el AgNO_3 pudo haber sido insuficiente para dicha formación. Dado lo anterior, se procede a realizar un diseño de experimentos con el cual se pueda lograr un resultado distinto al obtenido.

Síntesis de Nanopartículas de Plata a Partir del Extracto de *Nephelium Lappaceum*

Para la formación de las nanopartículas a partir de los tratamientos de rambután, se realizan cuatro tratamientos: tratamiento A, tomando una alícuota de 0,5mL del extracto; tratamiento B, con una alícuota 0,75mL; tratamiento C, con 1mL de extracto; y el tratamiento D, con una alícuota de 2mL. Las lecturas en el espectro UV-visible se realizaron a 1h, 3h y 24h en un rango de longitud de onda de 200 a 900nm, haciendo lecturas cada 5nm.

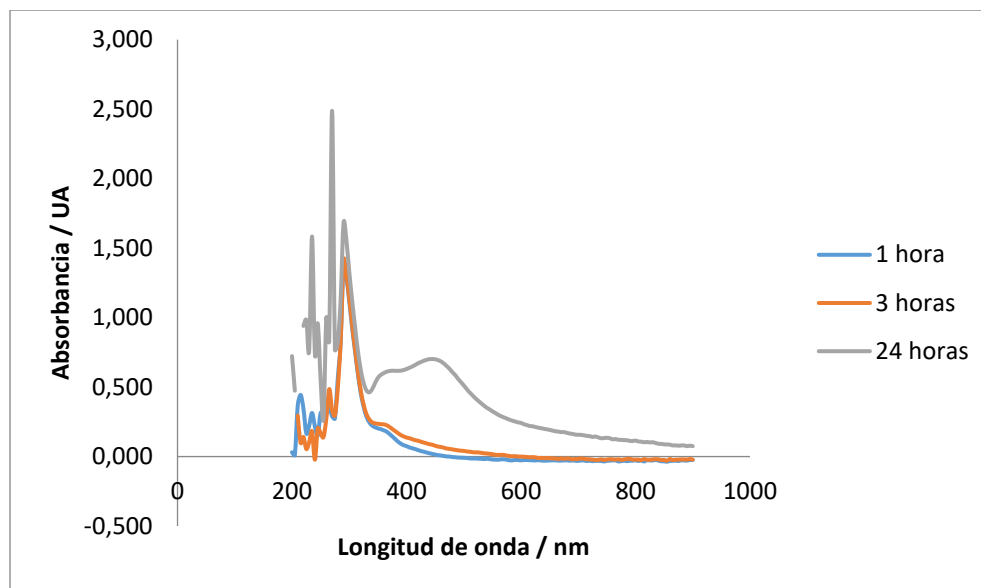


Figura 44. Análisis por Espectroscopia UV-visible de la formación de nanopartículas a partir de una alícuota de 0,5mL del extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Léase como la curva color azul el muestreo realizado a una hora, la curva anaranjada la lectura a las 3 horas y la curva color gris representa el muestreo transcurridas 24 horas.

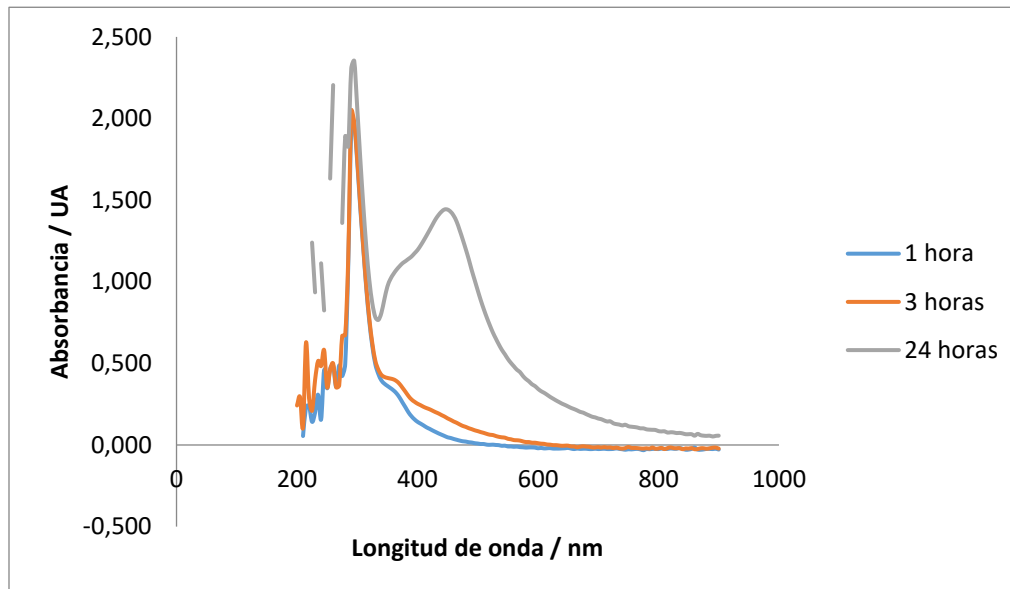


Figura 45. Análisis por Espectroscopia UV-visible de la formación de nanopartículas a partir de una alícuota de 0,75mL del extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Léase como la curva color azul el muestreo realizado a una hora, la curva anaranjada la lectura a las 3 horas y la curva color gris representa el muestreo transcurridas 24 horas.

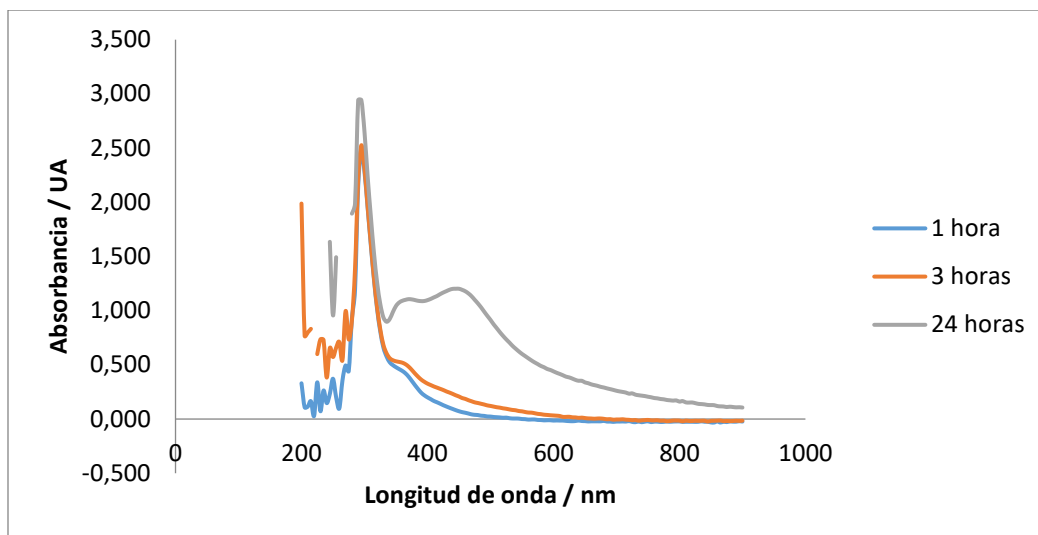


Figura 46. Análisis por Espectroscopia UV-visible de la formación de nanopartículas a partir de una alícuota de 1mL del extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Ver la curva color azul como el muestreo realizado a una hora, la curva anaranjada como la lectura a las 3 horas y la curva color gris representa el muestreo transcurridas 24 horas.

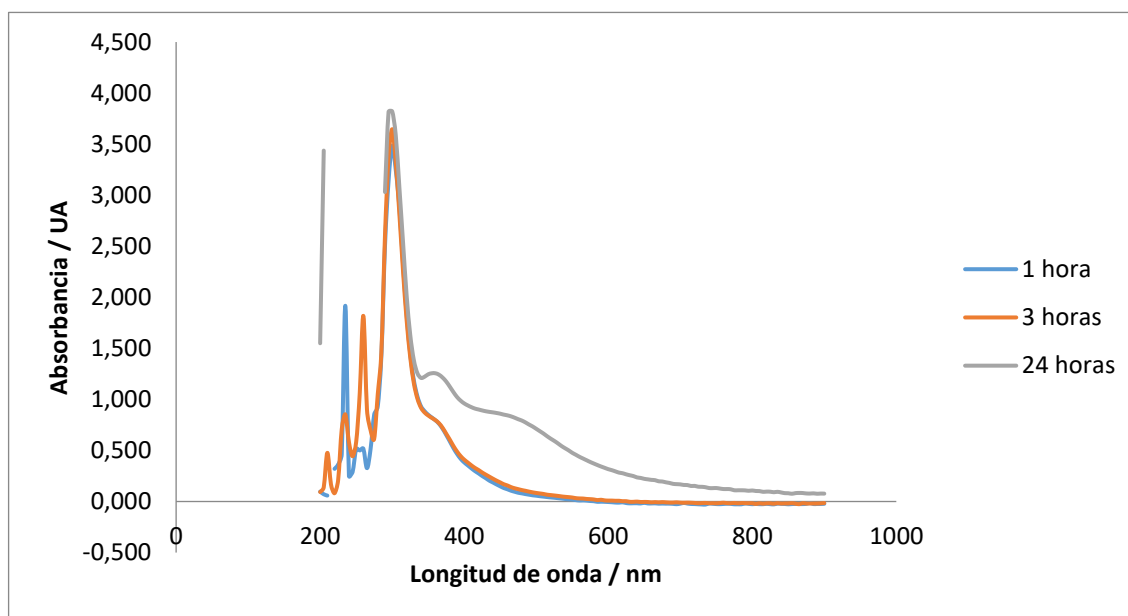


Figura 47. Análisis por Espectroscopia UV-visible de la formación de nanopartículas a partir de una alícuota de 2mL del extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Léase como la curva color azul el muestreo realizado a una hora, la curva anaranjada la lectura a las 3 horas y la curva color gris representa el muestreo transcurridas 24 horas.

En las figuras 45, 46, 47 y 48 se logra observar que las curvas que representan la evaluación de los cuatro tratamientos a 1h y 3h, representadas con el color azul y anaranjado respectivamente, evidencian que la formación de las nanopartículas de plata en esos tiempos está iniciando, porque se empieza a percibir una pequeña curva, por lo que se vuelven a evaluar transcurridas 24 horas. En la curva de específicamente este tiempo, representada por el color gris, se logra identificar la presencia de las nanopartículas por los “picos” formados entre los 350 y 500nm aproximadamente. Sin embargo, la curva obtenida con la alícuota de 0,75mL de extracto es la que tiene mejor definición de la síntesis, a diferencia de las otras tres en las cuales se muestra una influencia en muestra de las nanopartículas de plata de la curva del extracto.

Al realizar una comparación de los cuatro tratamientos de manera simultánea, tomando como criterio de evaluación los tiempos a los cuales se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro UV-visible, se pretende determinar la presencia de nanopartículas por medio de las curvas que se logran determinar.

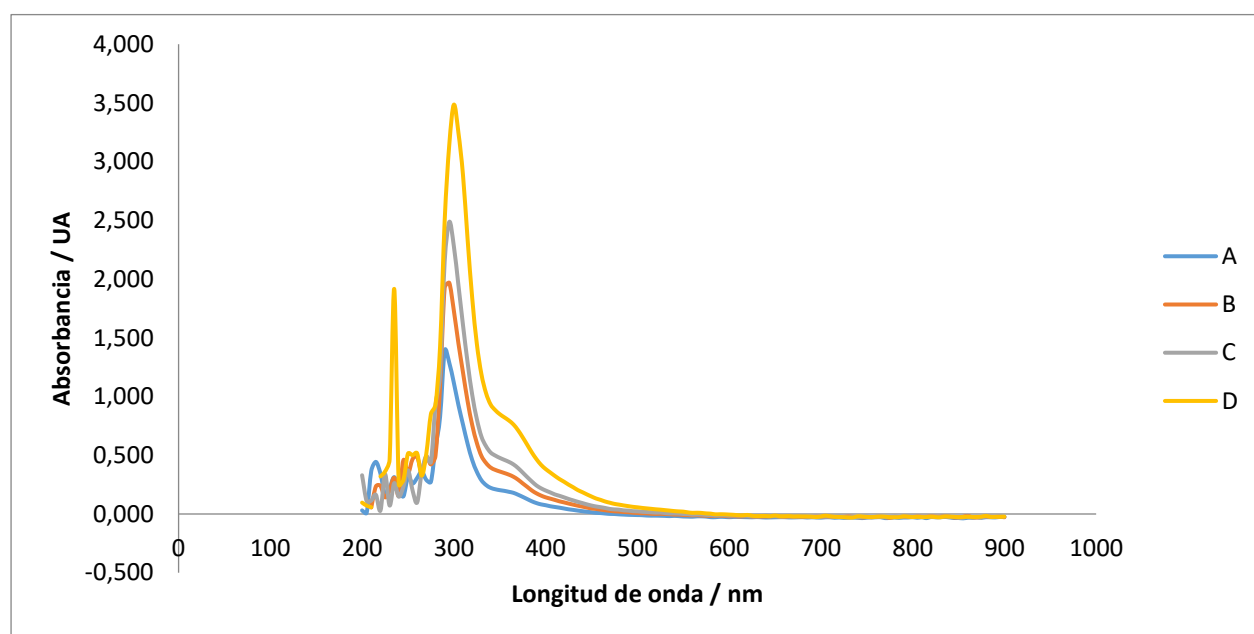


Figura 48. Comparación de lectura de los cuatro tratamientos a 1h de síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Léase como la curva azul el tratamiento A, el cual corresponde a la alícuota de 0,5mL de extracto; la curva anaranjada es el tratamiento B, representando a la alícuota de 0,75mL de extracto; la curva gris tiene una alícuota de 1mL de extracto y es el tratamiento C; y la curva amarilla es el tratamiento D, el cual tiene una alícuota de 2mL de extracto.

La figura anterior permite detallar si hay formación de las nanopartículas en la primera hora de la agitación para su síntesis. Se puede observar que, en el caso de los cuatro tratamientos, no se distingue una elevación marcada alrededor de los 350 y 400nm, el cual es el rango de longitud de onda en el cual se percibe la presencia de las nanopartículas. Lo que sugiere es el inicio de la formación de estas, ya que son apenas detectables por las lecturas en el espectro. Dado lo anterior, se define una lectura cuando han transcurrido 3h de agitación, con el fin de determinar si en ese tiempo de muestreo se percibe la síntesis.

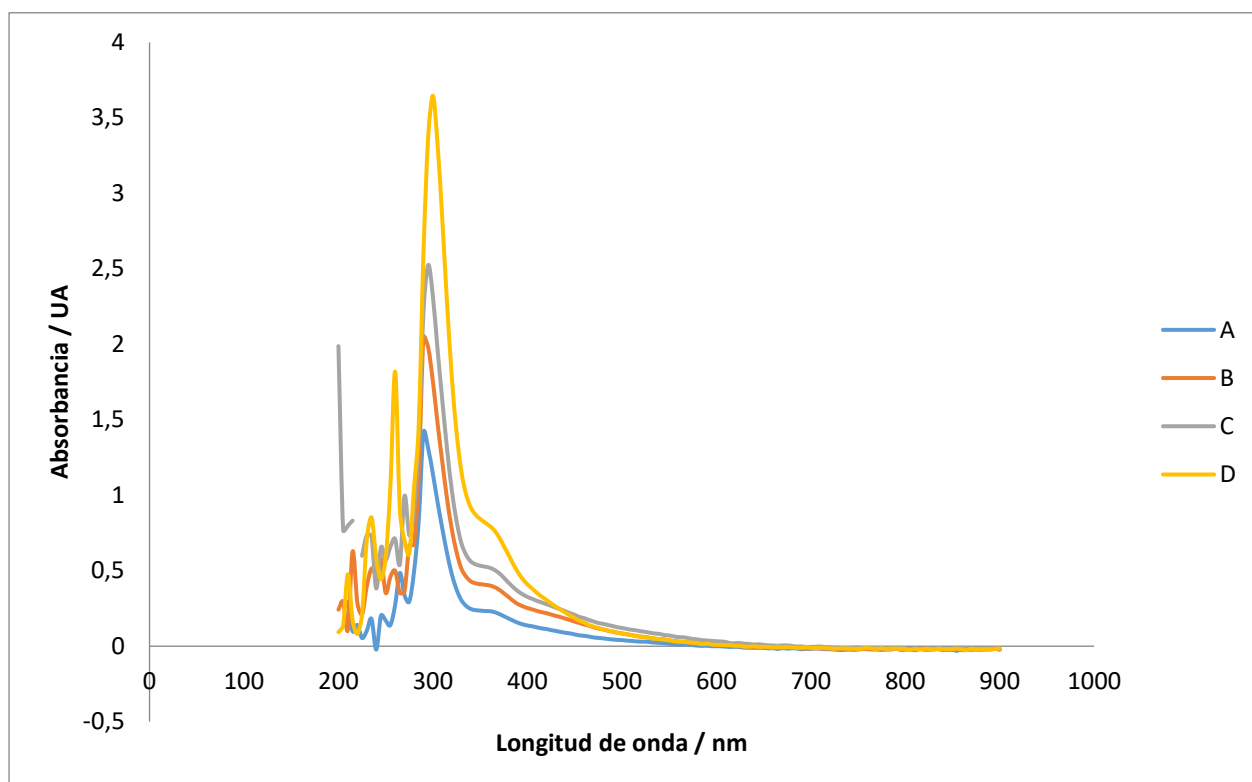


Figura 49. Comparación de lectura de los cuatro tratamientos a las 3h de síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Léase como la curva azul el tratamiento A, el cual corresponde a la alícuota de 0,5mL de extracto; la curva anaranjada es el tratamiento B, representando a la alícuota de 0,75mL de extracto; la curva gris tiene una alícuota de 1mL de extracto, y es el tratamiento C; así como la curva amarilla es el tratamiento D, con una alícuota de 2mL de extracto.

Con la figura 50 se sigue notando que la formación de las nanopartículas de plata sigue siendo poco perceptible en los cuatro tratamientos. La curva que se logra detectar puede representar la lectura se puede ver influenciada por el extracto de *Nephelium lappaceum*. Se mantienen en agitación constante para realizar las nuevas lecturas de absorbancia transcurridas 24 horas.

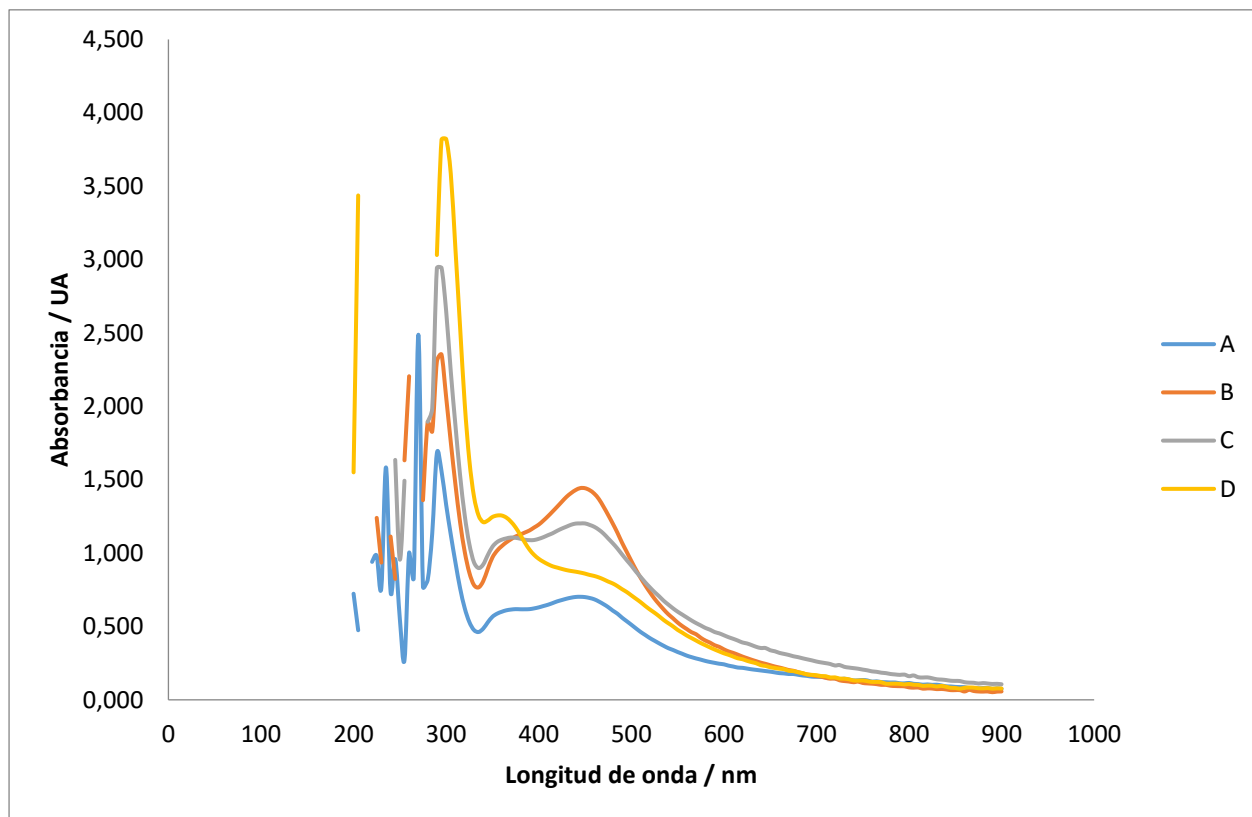


Figura 50. Comparación de lectura de tratamientos a las 24h de síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Léase como la curva azul el tratamiento A, el cual corresponde a la alícuota de 0,5mL de extracto; la curva anaranjada es el tratamiento B, con una alícuota de 0,75mL de extracto; la curva gris es el tratamiento C, y tiene una alícuota de 1mL de extracto; y la curva amarilla es el tratamiento D, el cual tiene una alícuota de 2mL de extracto.

Transcurridas las 24 horas de agitación y al notar que en las comparaciones de las figuras 49 y 50, que representan los gráficos en los cuales se empieza la formación de las nanopartículas de plata, se verifican los resultados en la figura 51. La curva que se ve con mayor definición entre 350 y 450nm demuestra que sí se dio la síntesis de las nanopartículas de plata usando el extracto de *Nephelium lappaceum* con agente reductor.

Estudio Preliminar de Formación de Nanopartículas de Plata a Partir del Extracto de *Zingiber Officinale*

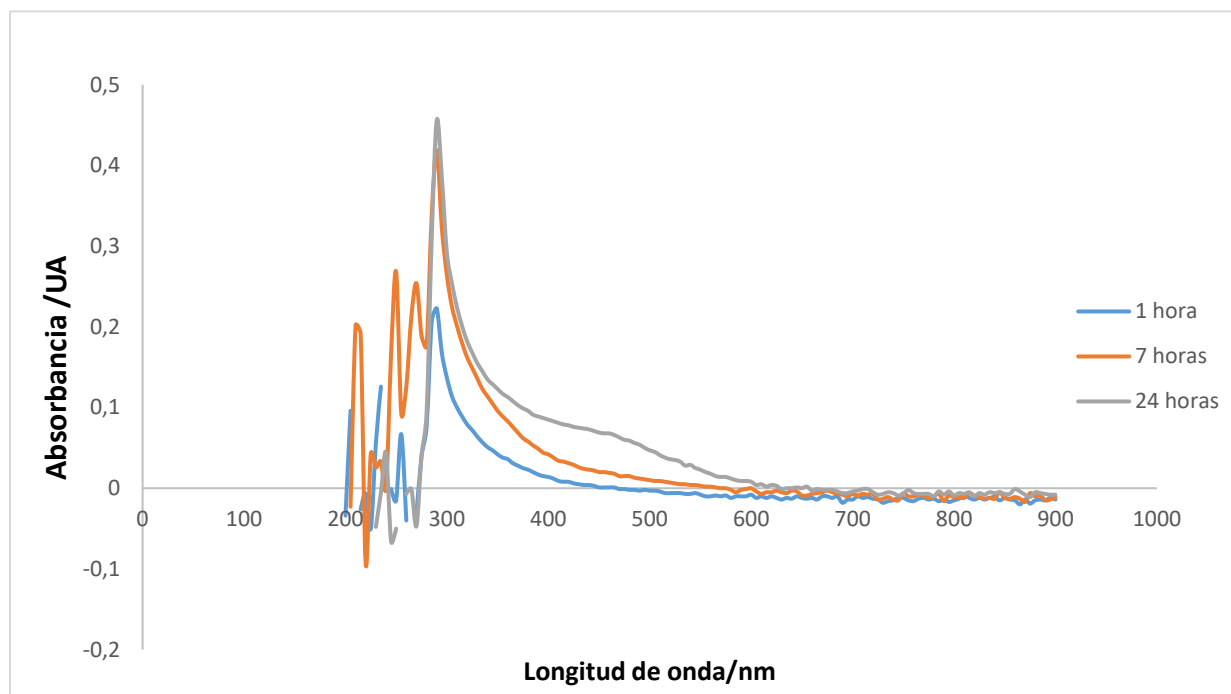


Figura 51. Análisis preliminar de la formación de nanopartículas de plata con 0,5mL extracto de *Zingiber officinale* mediante espectroscopía UV-visible.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Interpretar la curva azul como la lectura realizada a 1 hora de agitación, la curva anaranjada representa la lectura hecha pasadas tres horas de agitación, y la curva gris es el muestreo transcurridas 24 horas.

En la figura 52 se puede detectar una señal de presencia de nanopartículas de plata en la curva que representa el muestreo transcurridas 24 horas. La elevación que se presenta, a pesar de no ser tan elevada, sí es indicativa de la presencia de las nanopartículas; a diferencia de las curvas obtenidas en los muestreos de 1 y 3 horas, en las cuales no hay algún cambio que indique la síntesis de las nanopartículas. Por ende, se podría asumir que, en el caso de esta muestra, si se dejara en agitación por más tiempo, se podría llegar a ver una curva de nanopartículas más marcada.

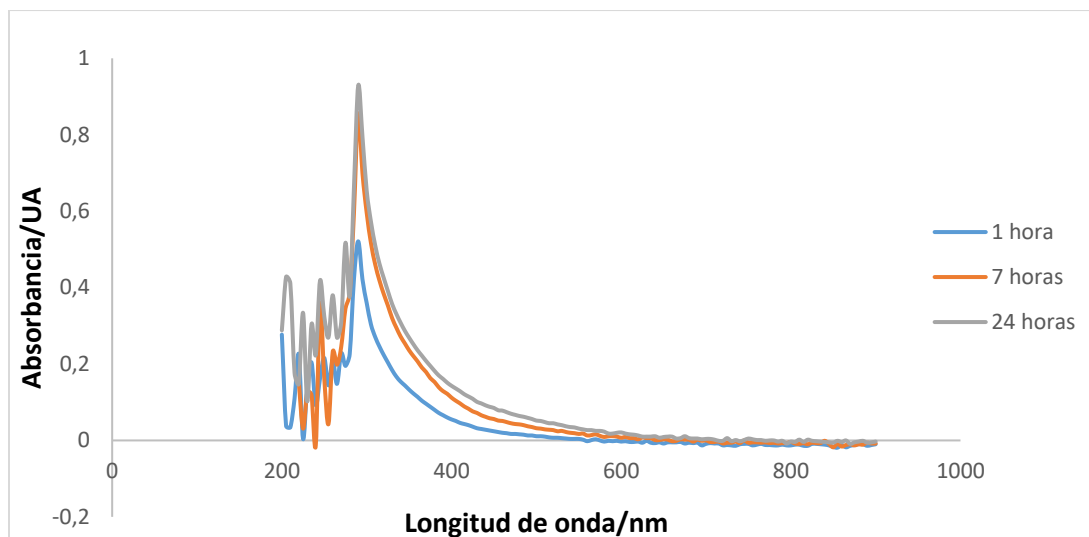


Figura 52. Análisis preliminar de la formación de nanopartículas de plata con 0,75mL extracto de *Zingiber officinale* mediante espectroscopía UV-visible.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Léase la curva azul como la lectura realizada a 1 hora de agitación, la curva anaranjada representa la lectura hecha pasadas tres horas de agitación, y la curva gris es el muestreo transcurridas 24 horas.

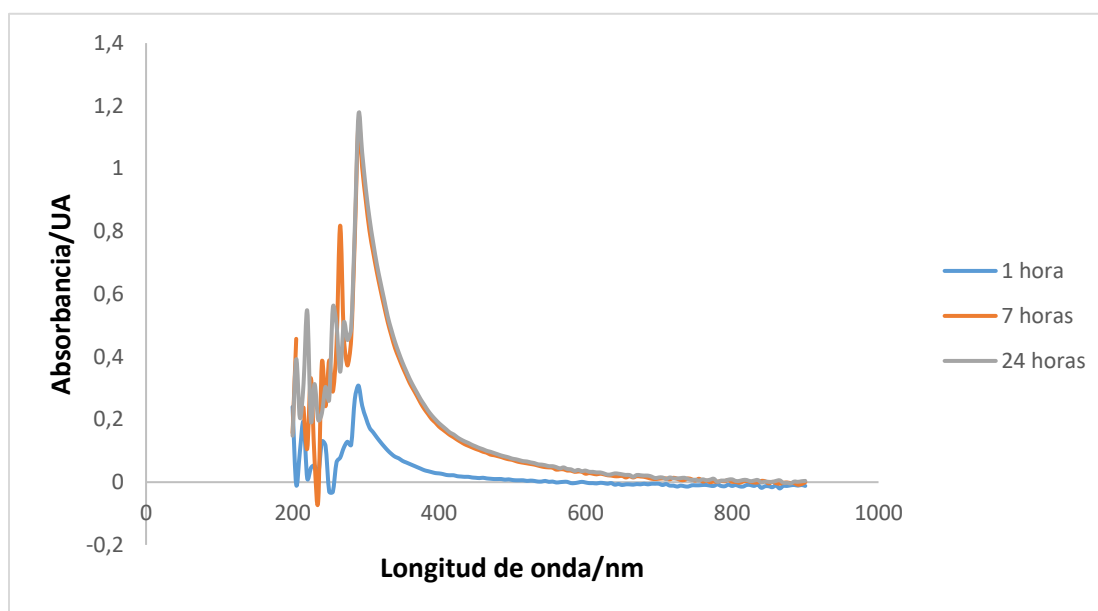


Figura 53. Análisis preliminar de la formación de nanopartículas de plata con 1mL extracto de *Zingiber officinale* mediante espectroscopía UV-visible.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Interpretar la curva azul como la lectura realizada a 1 hora de agitación, la curva anaranjada representa la lectura hecha pasadas tres horas de agitación, y la curva gris es el muestreo transcurridas 24 horas.

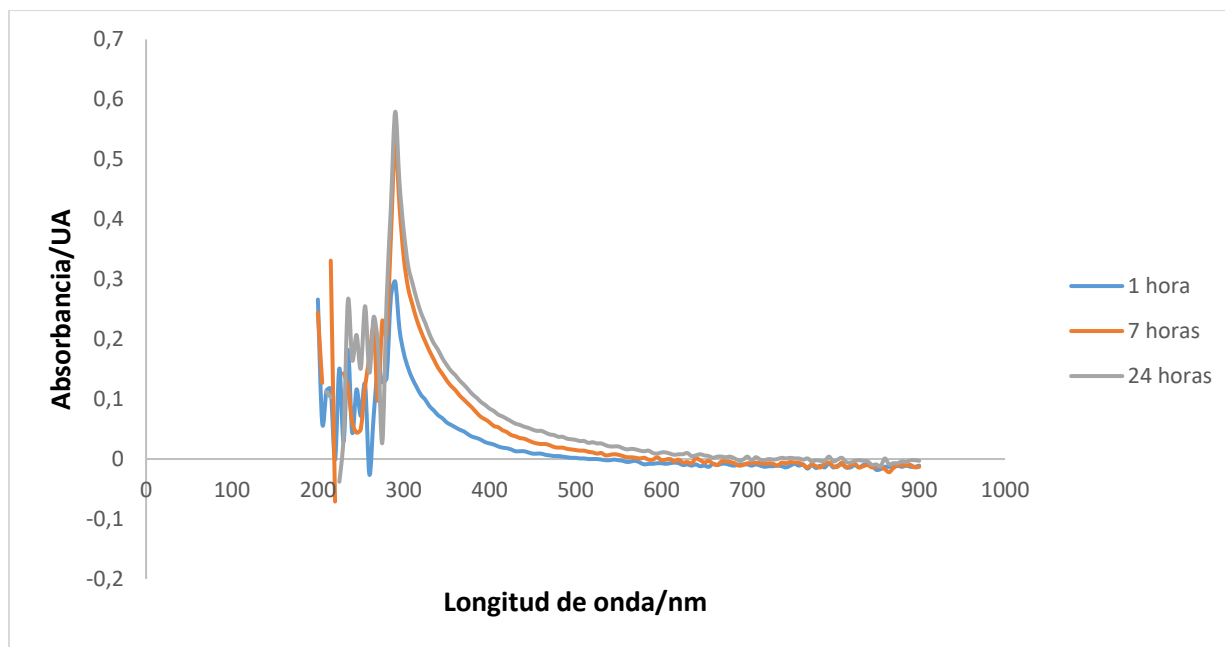


Figura 54. Análisis preliminar de la formación de nanopartículas de plata con 2mL extracto de *Zingiber officinale* mediante espectroscopía UV-visible.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Ver la curva azul como la lectura hecha a 1 hora de agitación, la curva anaranjada es la lectura hecha a las tres horas de agitación, y la curva gris es el muestreo a las 24 horas.

Caso contrario a la explicación anterior sucede en las figuras 53, 54 y 55, en las cuales en ninguno de los tres muestreos a distintas horas se evidencia que se haya dado la formación de las nanopartículas. Tampoco se observa el inicio de la formación, por esta razón se realiza el diseño de experimentos para el extracto de *Zingiber officinale*, con el propósito de conocer si se da la síntesis de las nanopartículas partiendo de tratamiento diferentes en la extracción.

Diseño de Experimentos

En los estudios experimentales se tiene como objetivo encontrar una relación entre las variables independientes (factores) y las variables dependientes (resultados), que tienen influencia en un determinado proceso y su producto final, por lo que el diseño de experimentos se ha empleado con el fin de organizar, conducir e interpretar los resultados de los experimentos, de manera que se garantice que la recopilación de información útil se dé por medio de la ejecución de pocos ensayos. Así que la elección de un diseño experimental va a depender de la naturaleza del problema y del nivel de información que se quiera obtener a partir de él (Djuris, Ibric y Djuric, 2013).

Estos diseños son empleados en lugar de emplear el concepto que se conoce popularmente como “prueba y error”, donde el investigador usa el conocimiento que tiene sobre el proceso o el producto, siendo definido por el espacio de diseño, el cual corresponde a una combinación e interacción multidimensional entre las variables de entrada y los parámetros del proceso que brindan garantía de calidad (Djuris, Ibric y Djuric, 2013).

Cada operación unitaria posee gran cantidad de variables tanto de entrada como de salida, así como parámetros de proceso, lo que hace casi imposible investigarlas de manera experimental. Con los resultados del diseño de experimentos se puede identificar las condiciones óptimas, los factores críticos que tienen influencia y los que no, en los atributos de calidad críticos, y se detalla si existen interacciones y sinergias entre los factores (Patel, Parmar y Patel, 2013).

El diseño de experimentos que se ajusta al tipo de investigación es el diseño factorial, ya que se necesita conocer el efecto que tiene cada forma de tratamiento del extracto de jengibre para la formación de las nanopartículas de plata de manera individual. En este caso, los factores cuantitativos que se busca analizar en los diferentes tratamientos son la temperatura y el tiempo al cual se realiza la extracción. Cada factor está conformado por dos niveles, siendo 60°C y 80°C para el factor temperatura, y para el tiempo son una hora y dos horas, por lo que resulta en un diseño factorial completo de 2^2 , obteniendo cuatro posibles combinaciones de tratamientos.

La técnica estadística central en los análisis de los experimentos es la conocida como Análisis de Varianza (ANOVA). La validez de estos resultados se encuentra sujeta a que los supuestos del modelo se cumplan, y estos deben estar constituidos por normalidad, varianza constante e independencia. Para la comprobación, se deben implicar pruebas tanto analíticas como gráficas (Djuris, Ibric y Djuric, 2013).

Tabla 5.

Resumen del diseño de experimentos.

Factores:	2	Réplicas:	3
Corridas base:	4	Corridas totales:	12
Bloques base:	1	Bloques totales:	3

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Tabla 6.

Ejecución del diseño de experimentos.

Orden estándar	Orden de análisis	Bloque	Temperatura	Tiempo de extracción	Tiempo requerido para la síntesis de nanopartículas
6	1	2	60°C	2 horas	24
8	2	2	80°C	2 horas	12
7	3	2	80°C	1 hora	24
5	4	2	60°C	1 hora	24
12	5	3	80°C	2 horas	12
10	6	3	60°C	2 horas	24
9	7	3	60°C	1 hora	24
11	8	3	80°C	1 hora	24
2	9	1	60°C	2 horas	24
4	10	1	80°C	2 horas	12
1	11	1	60°C	1 hora	24
3	12	1	80°C	1 hora	24

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Tabla 7.

ANOVA de un factor para el diseño de experimentos.

Fuente de variación	DF	Adj SS	Adj MS	Valor p
Modelo	5	2916,00	583,20	0,000
Bloques	2	0,00	0,00	0,689
Lineal	2	2808,00	1404,00	
Temperatura	1	2700,00	2700,00	0,001
Tiempo de extracción	1	108,00	108,00	0,683
Interacciones bidireccionales	1	108,00	108,00	0,001
Temperatura * Tiempo de extracción	1	108,00	108,00	0,001
Error	6	0,00		
Total	11	2916,00		

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Tabla 8.

Ecuación de regresión. Ecuación promediada sobre bloques.

Respuesta =	$33,00 + 15,00 \text{ Temperatura}_{60\text{ °C}} - 15,00 \text{ Temperatura}_{80\text{ °C}}$ $+ 3,000 \text{ Tiempo extracción}_{1\text{ hora}} - 3,000 \text{ Tiempo extracción}_{2\text{ horas}}$ $-3,000 \text{ Temperatura} * \text{Tiempo extracción}_{60\text{ °C } 1\text{ hora}}$ $+3,000 \text{ Temperatura} * \text{Tiempo extracción}_{60\text{ °C } 2\text{ horas}}$ $+3,000 \text{ Temperatura} * \text{Tiempo extracción}_{80\text{ °C } 1\text{ hora}}$ $-3,000 \text{ Temperatura} * \text{Tiempo extracción}_{80\text{ °C } 2\text{ horas}}$
-------------	--

Fuente: Elaboración propia, 2021.

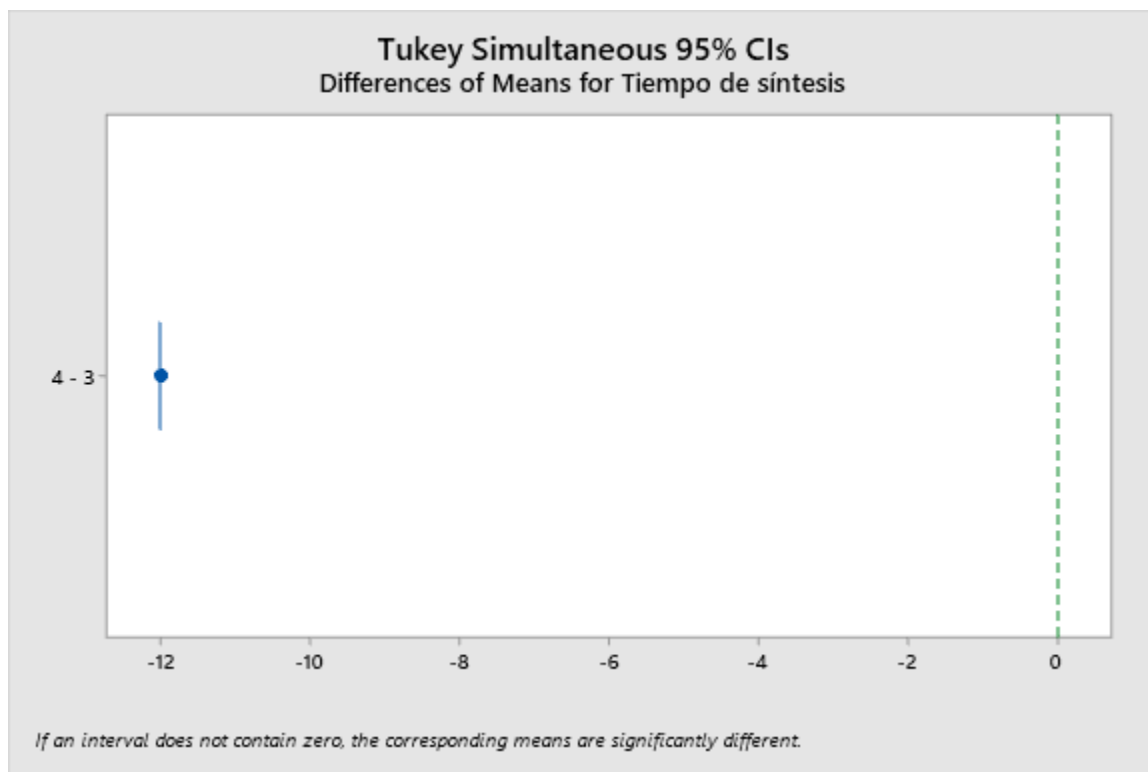


Figura 55. Estudio Tukey.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

En la prueba de Tukey se representa una diferencia siempre y cuando el rango que está en estudio no contenga el 0. Este método es utilizado en ANOVA con el fin de crear intervalos de confianza para las diferencias en parejas entre las medias de los factores, y a su vez se controla la tasa de error por un nivel específico.

La prueba Tukey es la más aplicada y la que prefieren los estadísticos, ya que con ella se controlan de una mejor manera los dos errores ampliamente conocidos en la estadística, los α y β . Con esta prueba se pueden llevar a cabo todas las posibles comparaciones de los tratamientos, de dos en dos, por lo que es considerada una de las pruebas más completas (Wong, 2010).

Si los tratamientos no contienen el 0, por ende, no lo comparten, refiere a que ambos son grupos distintos, por lo que el tratamiento 3 y el tratamiento 4 muestran resultados distintos entre ellos. En el caso de los tratamientos 1 y 2 están descartados porque no se dio la formación de nanopartículas en la lectura realizada a las 24 horas. Es usado como un complemento al ANOVA, para indicar la existencia de diferencias significativas entre ellos por medio de la comparación de medias, y a partir de esto se puede llegar a elegir cuál es la mejor opción como tratamiento.

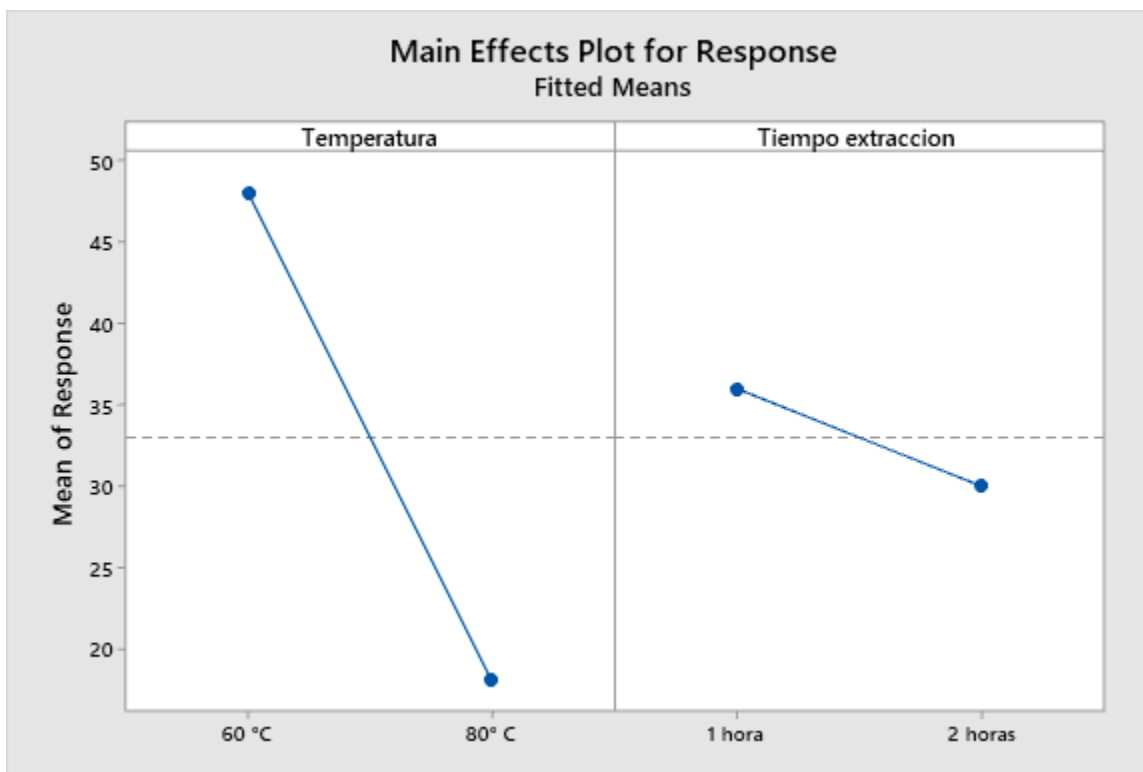


Figura 56. Diagrama de efectos principales para la respuesta.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

El gráfico anterior permite conocer cuál es el factor que tiene mayor relevancia en la respuesta del experimento. El efecto principal es la respuesta promedio que se observa en el nivel alto de un factor, menos la respuesta promedio en el nivel bajo. En este caso, hay gran diferencia entre las medias, ya que al evaluar el valor medio que da a 60°C y el que da a 80°C, la diferencia es mayor que al analizar la diferencia que hay entre trabajar a 1 y a 2 horas, por lo que hace que el efecto principal del experimento sea la temperatura.

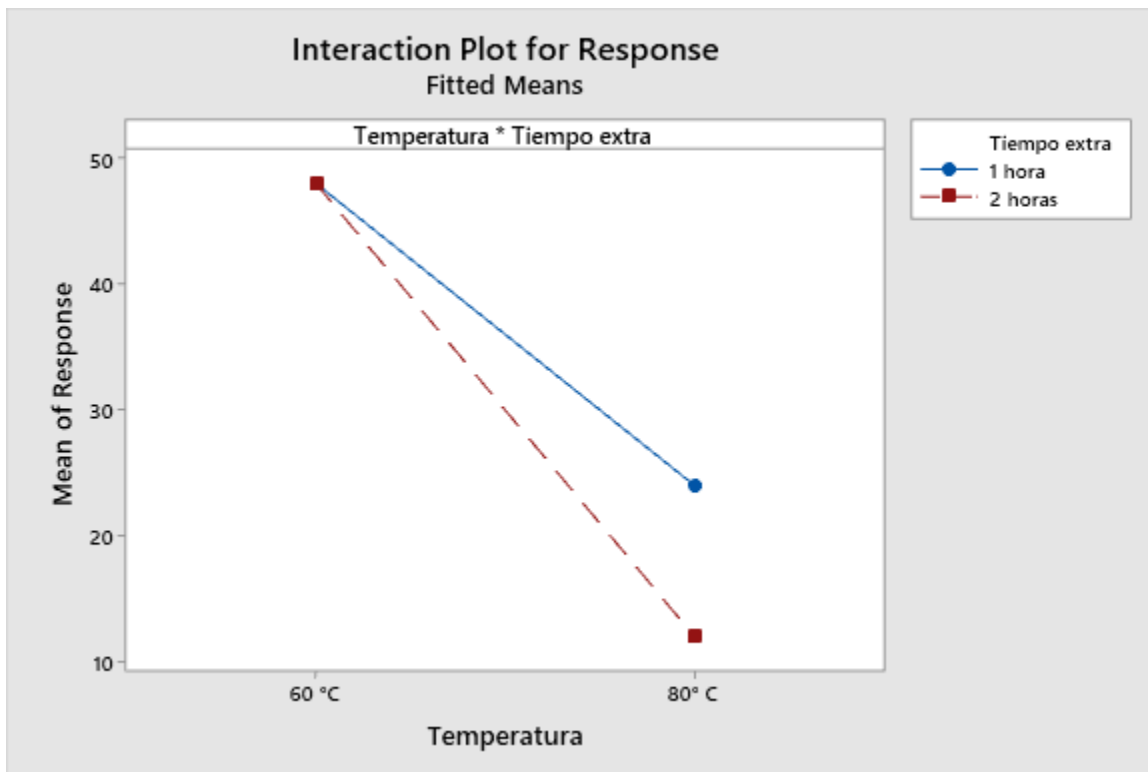


Figura 57. Gráfico de interacción para la respuesta.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Las interacciones de los factores son significativas sobre la variable de respuesta cuando el efecto de uno depende del nivel en el que se encuentra el otro. Esta situación se representa de manera gráfica al colocar en el eje vertical una escala que sea representativa de la magnitud de la variable de respuesta, y luego uno de los dos factores es representado con sus dos niveles en el eje horizontal (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

En la dirección vertical de cada nivel se anota un punto que identifique la respuesta promedio en cada nivel del otro factor, y al final, cada punto al lado izquierdo se va a unir con su respectivo punto del lado derecho por medio de una línea recta. En caso de que no haya interacción, las líneas que se obtienen son en forma de pendiente, similar como si fueran acomodadas de manera paralela, mientras que, si se da una interacción, las pendientes sean distintas (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

En la figura 58 se observa un cruce de las líneas, lo que representa que sí hay una interacción significativa entre los factores. En este caso, la interacción es la que domina el proceso, por lo que se le presta mayor importancia. El factor que es parte de la interacción no es relevante, lo que importa es la interacción “Temperatura-Tiempo”. Al analizar los factores por separado, se

determina que la temperatura es lo que permite la obtención de las nanopartículas, pero sí hay influencia del tiempo.

Al detallar los resultados obtenidos, se da la formación de las nanopartículas de plata a con los tratamientos del extracto de *Zingiber officinale* realizados a 80°C; sin embargo, la extracción realizada a 1 hora permite la formación de las nanopartículas transcurridas 24 horas de la agitación, mientras que en la extracción hecha en 2 horas se logra observar la presencia de las nanopartículas a las 12 horas.

Dado lo anterior, se confirma que la interacción “Temperatura-Tiempo” de síntesis es la que tiene el predominio de la formación de las nanopartículas. Si no fuera el caso de que el factor influyente fuese solamente la temperatura, planteando ambos tratamientos a 80°C, independientemente del tiempo de extracción, se hubiera presentado en el mismo tiempo de lectura para detectar la presencia de las nanopartículas.

Si se trata de elegir el mejor tratamiento basado en los resultados del diseño de experimentos, sería el que se llevó a cabo una extracción de *Zingiber officinale* a 80°C durante dos horas, principalmente porque se obtienen con mayor rapidez, así como que 80°C es una temperatura importante; además la interacción que se da entre ambos factores es lo que promueve la obtención de las nanopartículas de plata.

Interpretación de los Espectros Infrarrojos

Se analizan los extractos de *Nephelium lappaceum* y *Zingiber officinale* por espectroscopía infrarroja para determinar los compuestos orgánicos que los conforman. Se realiza el espectro de los extractos por sí solos y luego a la solución con nanopartículas de plata formadas, con el objetivo de conocer si hay diferencia significativa entre los espectros obtenidos.



Figura 58. Muestra a evaluar en el espectroscopio IR de *Nephelium lappaceum* y *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Interpretar la solución color marrón como el extracto de *Nephelium lappaceum* y la solución color amarillenta como el extracto de *Zingiber officinale*.

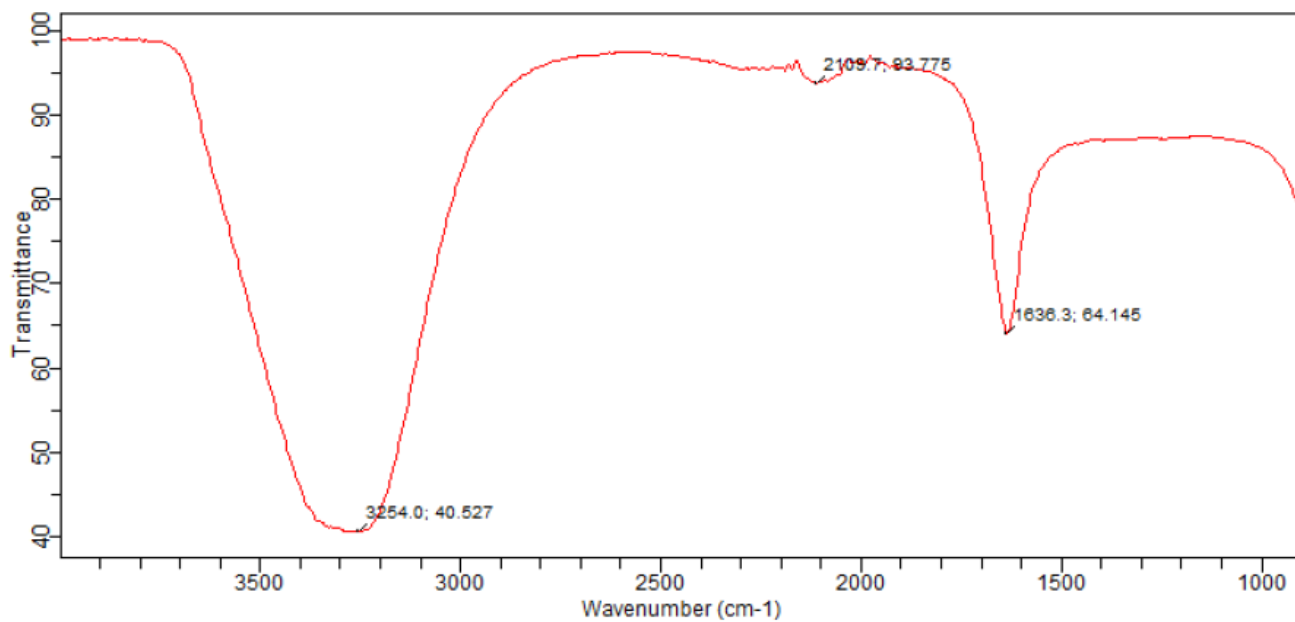


Figura 59. Espectro IR del extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

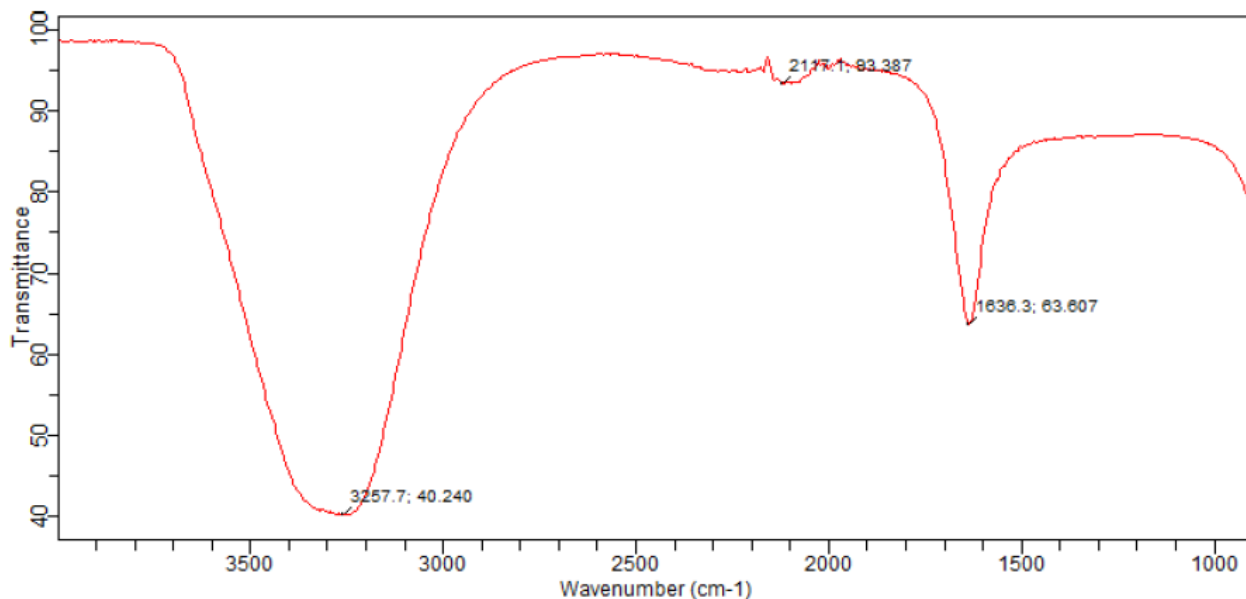


Figura 60. Espectro IR del extracto de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Unidad estructural	Frecuencia, cm ⁻¹	Unidad estructural	Frecuencia, cm ⁻¹
Vibraciones de alargamiento			
Enlaces sencillos		Enlaces dobles	
—O—H (alcoholes)	3 200 a 3 600		1 620 a 1 680
—O—H (ácidos carboxílicos)	2 500 a 3 600		
N—H	3 350 a 3 500		
<i>sp</i> C—H	3 310 a 3 320	Aldehídos y cetonas	1 710 a 1 750
<i>sp</i> ² C—H	3 000 a 3 100	Ácidos carboxílicos	1 700 a 1 725
<i>sp</i> ³ C—H	2 850 a 2 950	Anhídridos de ácido	1 800 a 1 850 y 1 740 a 1 790
<i>sp</i> ² C—O	1 200	Halogenuros de acilo	1 770 a 1 815
<i>sp</i> ³ C—O	1 025 a 1 200	Ésteres	1 730 a 1 750
		Amidas	1 680 a 1 700
		Enlaces triples	
		—C≡C—	2 100 a 2 200
		—C≡N	2 240 a 2 280

Figura 61. Frecuencia de absorción de infrarrojo.

Fuente: Carey y Giuliano, 2014.

Para la interpretación de las figuras 60 y 61, se debe analizar por secciones según las señales que se encuentran en las diversas frecuencias de absorción. La señal con mayor predominio en ambos espectros es la que se encuentra entre los $3000\text{-}3500\text{cm}^{-1}$, la cual hace referencia al estiramiento de enlaces sencillos de OH. Al analizar las estructuras químicas de los principales componentes del rambután, predominan el ácido elágico, la geranina y la corilagina, y en el caso de los compuestos del jengibre son gingeroles y shogaoles. En ambos casos se consideran polifenoles.

Los fenoles son compuestos que están formados por un grupo hidroxilo unido directamente a un anillo de benceno. Debido a esto, en los espectros infrarrojos de los fenoles se encuentra una combinación de las propiedades de los alcoholes, así como de los compuestos aromáticos. La absorbancia del hidroxilo, la cual representa el alargamiento del O-H, se logra observar alrededor de 3600cm^{-1} , y la señal detectada por el alargamiento de C-O se produce en la región de 1200 a 1250cm^{-1} (Carey y Giuliano, 2014).

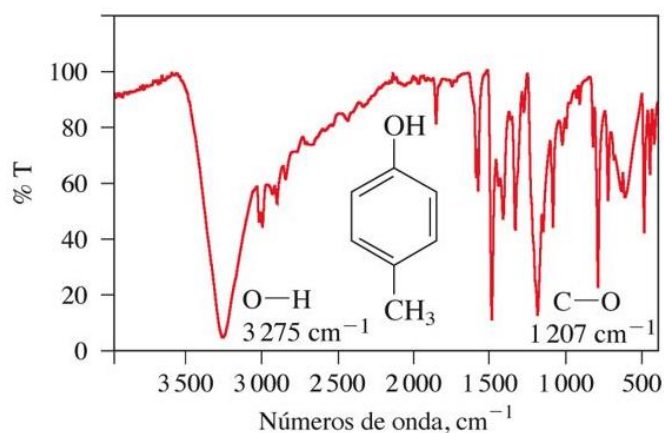


Figura 62. Espectro IR de un fenol.

Fuente: Carey y Giuliano, 2014.

Al tomar como espectro referencia la figura anterior para hacer la comparación de las figuras 60 y 61, se identifica la señal correspondiente, en ambos casos, al alargamiento del grupo hidroxilo alrededor de los 3250cm^{-1} , y para las señales que se encuentran a 1630cm^{-1} aproximadamente. Por ende, se afirma la presencia de los compuestos polifenólicos en los extractos de rambután y de jengibre.

Los gingeroles son los compuestos pungentes del *Zingiber officinale*, los cuales se encuentran en la oleorresina en una proporción del 5% a 8%, y a los cuales se les atribuye las

propiedades medicinales de la planta. El mayor compuesto de la oleorresina es el 6-gingerol, el cual químicamente es un decano no cíclico que tiene un grupo 4-hidroxi-3-metoxifenil en el carbono uno (C1), en el carbono 3 (C3) tiene un grupo carbonilo y un grupo hidroxilo en el carbono cinco (C5) (Vargas, 2014).

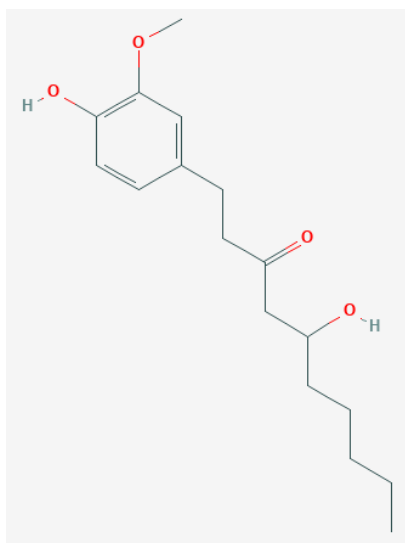


Figura 63. Estructura de 6-gingerol.

Fuente: National Center for Biotechnology Information, 2021.

Por otro lado, los taninos se encuentran dentro del grupo de compuestos polifenólicos. Estos se clasifican químicamente como taninos hidrolizables o hidrosolubles, taninos condensados y pseudotaninos (Hernández, García, Rojo y Olivares, 2003). A diferencia de la pulpa y la semilla, la cáscara del rambután posee mayor cantidad de compuestos antioxidantes, entre ellos predominan los compuestos fenólicos, los cuales son conocidos por sus actividades biológicas; dentro de ellos se encuentran la corilagina, el ácido elágico y la geranina, siendo esta última el compuesto principal (Hernández *et al.*, 2019).

Cuando ya se han sintetizado las nanopartículas de plata con uno de los extractos de *Nephelium lappaceum* y *Zingiber officinale*, ya que los componentes orgánicos e inorgánicos van a ser los mismos en todos los tratamientos, se analiza los espectros IR de estas soluciones.

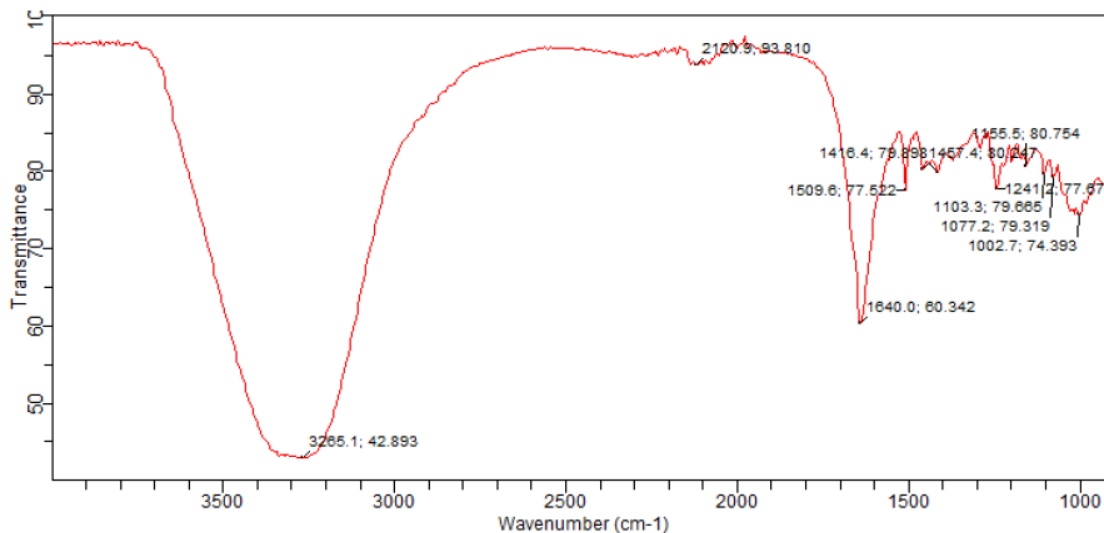


Figura 64. Espectro IR de la síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

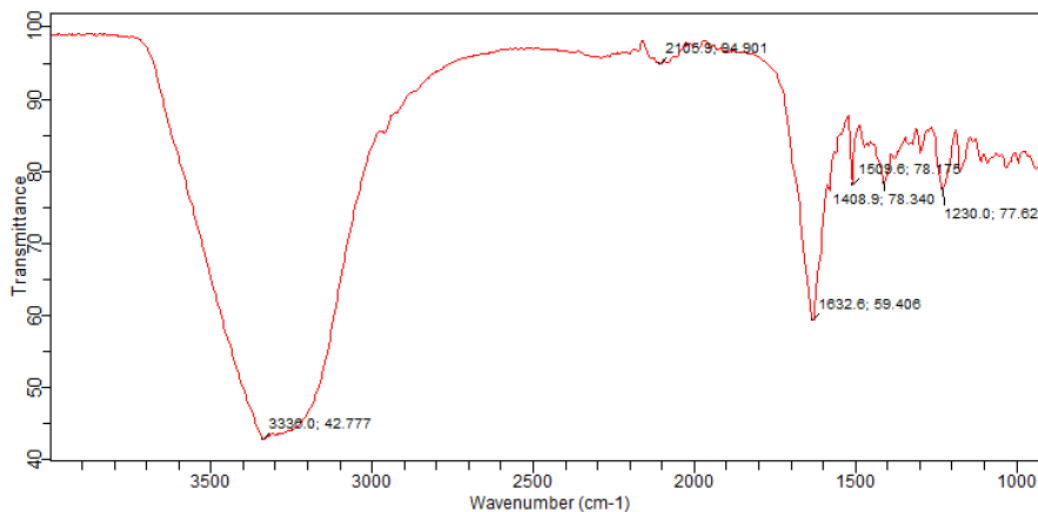


Figura 65. Espectro IR de la síntesis de nanopartículas de plata a partir del extracto de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Se puede decir que hay probabilidad de que se encuentren residuos sólidos de AgNO_3 en el espectro, que pueden provenir de la interacción que puede tener con alguna otra molécula presente en el extracto. Se puede reconocer a los 1560cm^{-1} , aproximadamente (Saavedra *et al.*, 2010).

Analizando las figuras 65 y 66, se logra identificar una señal a los 1509cm^{-1} , que podría ser representativa a la plata, y las demás señales que se observan pueden deberse a interacciones que se registran. Por lo que se confirma la presencia de la señal de la plata de las nanopartículas identificada en el espectro infrarrojo, ya que en el espectro UV-visible se logran detectar éstas en las curvas.

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

Para conocer si los tratamientos de los extractos tanto de los obtenidos con *Nephelium lappaceum* como de *Zingiber officinale*, se realiza la prueba antimicrobiana, con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria de cada tratamiento. Se realiza una placa Petri por cada uno de los tratamientos, en las cuales se encuentra inoculada la cepa de *Staphylococcus aureus*.

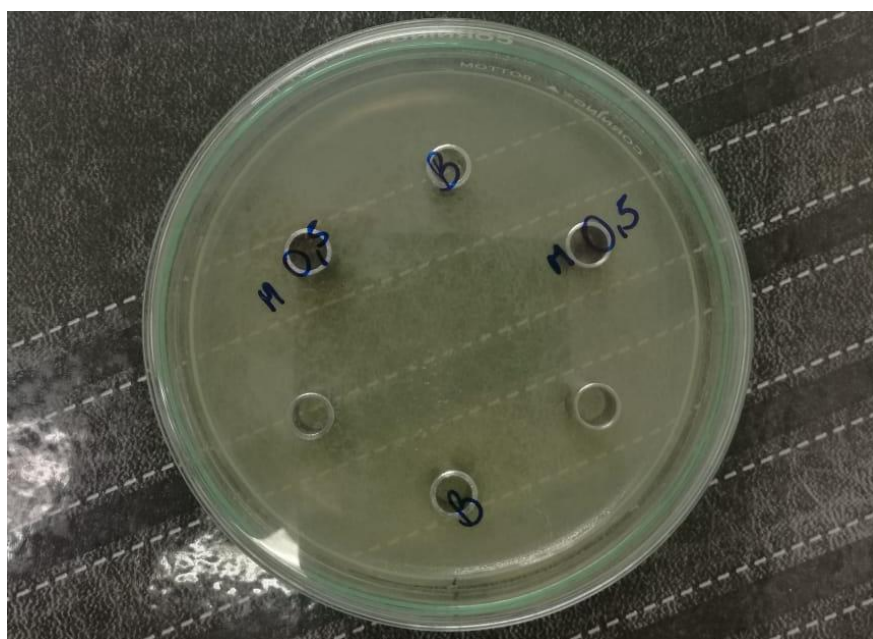


Figura 66. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 0,5mL de extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

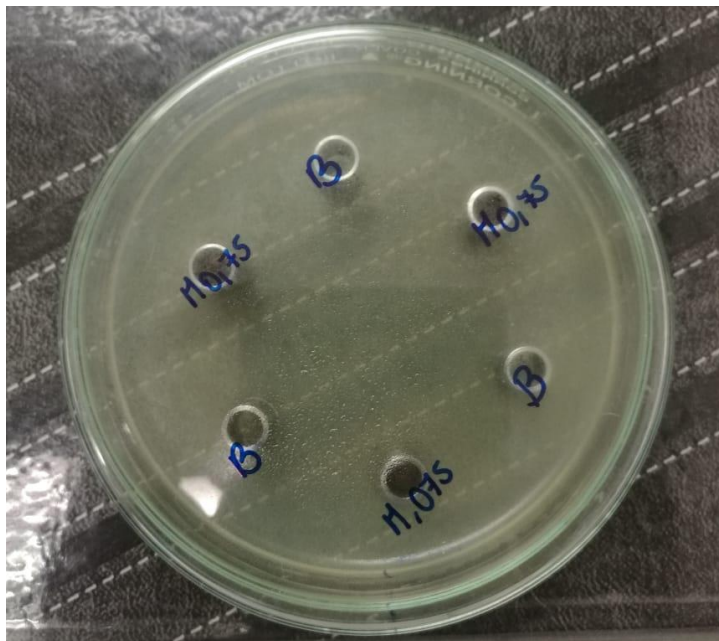


Figura 67. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 0,75mL de extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

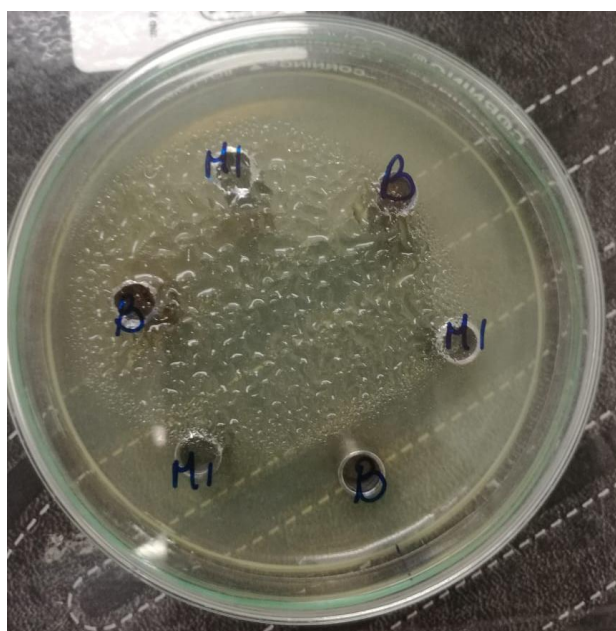


Figura 68. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 1mL de extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

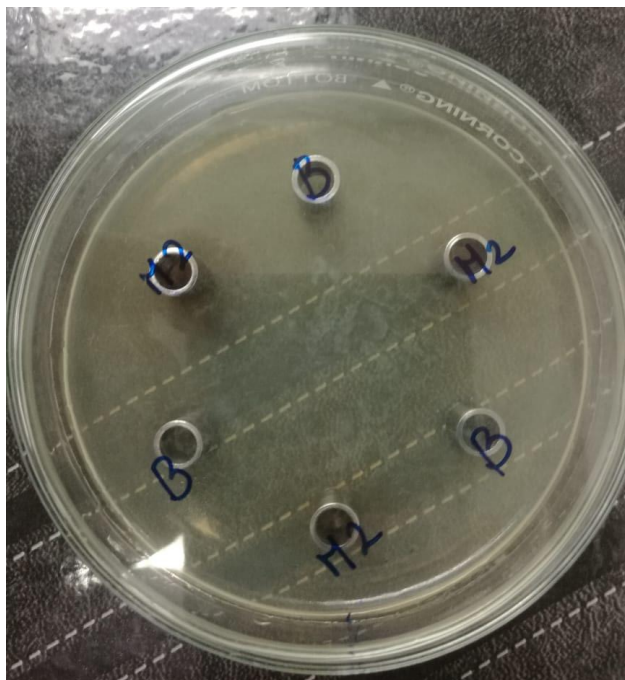


Figura 69. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 2mL de extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

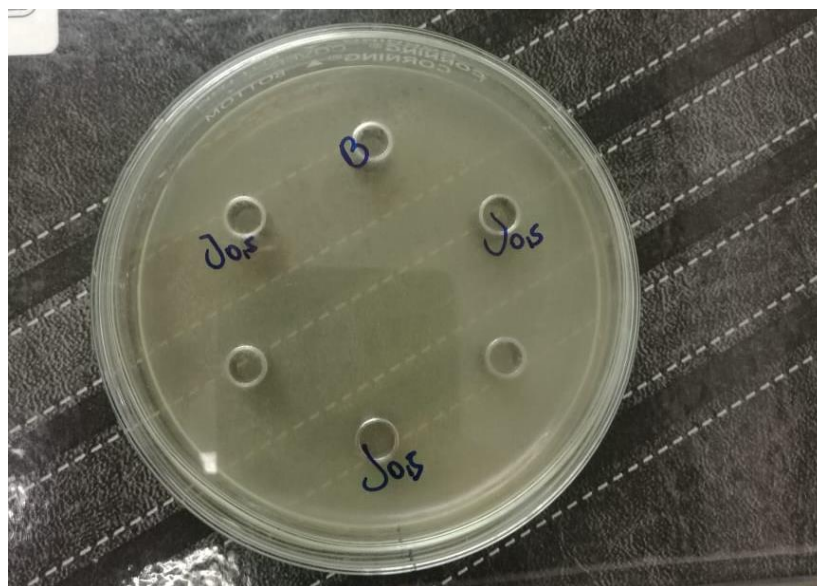


Figura 70. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 0,5mL de extracto de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

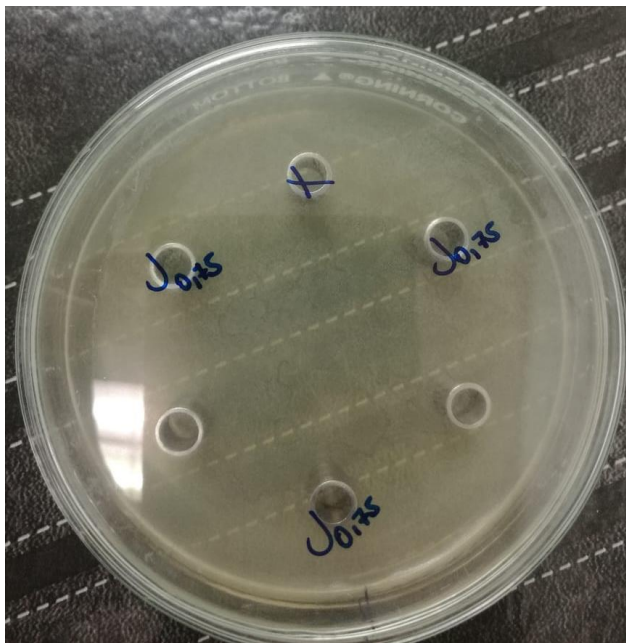


Figura 71. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 0,75mL de extracto de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

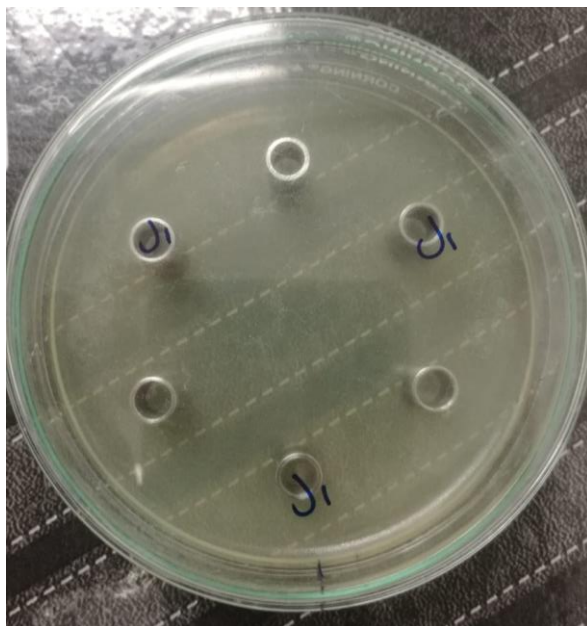


Figura 72. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 1mL de extracto de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

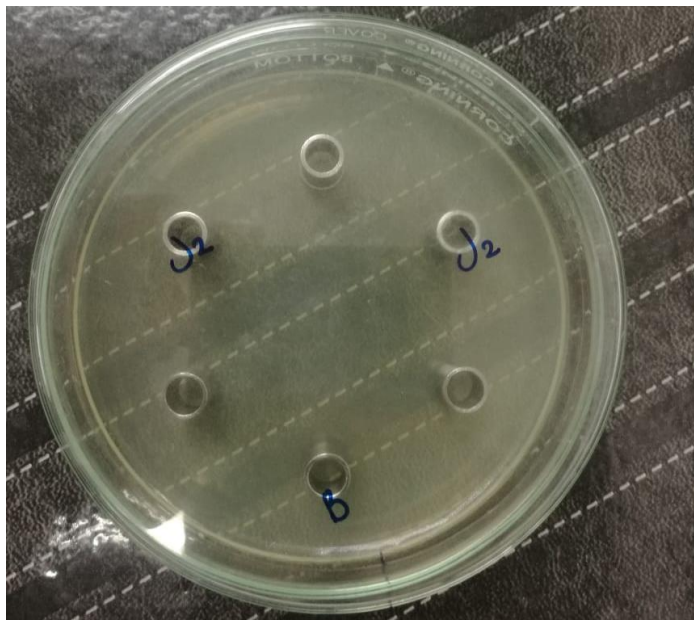


Figura 73. Evaluación antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con una alícuota de 2mL de extracto de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Transcurrido el tiempo de incubación de las placas Petri, se procede a realizar el análisis y la interpretación de los resultados obtenidos con el propósito de conocer cuál de los extractos y en cuál concentración se presenta una inhibición en el crecimiento de la cepa de *Staphylococcus aureus*. En las figuras, se denota la solución denominada “blanco”, que representa el nitrato de plata (AgNO_3) $1 \times 10^{-3} \text{M}$ con “B” y/o “X”.

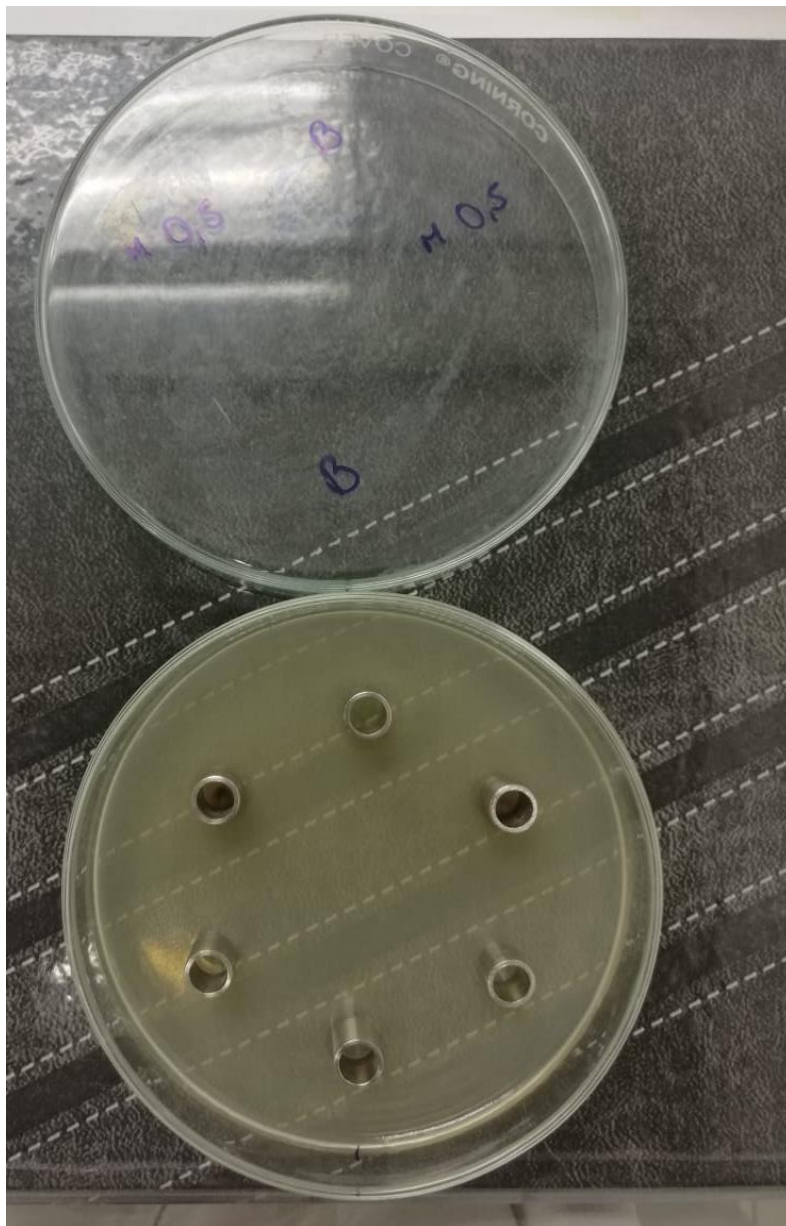


Figura 74. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 0,5mL de extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

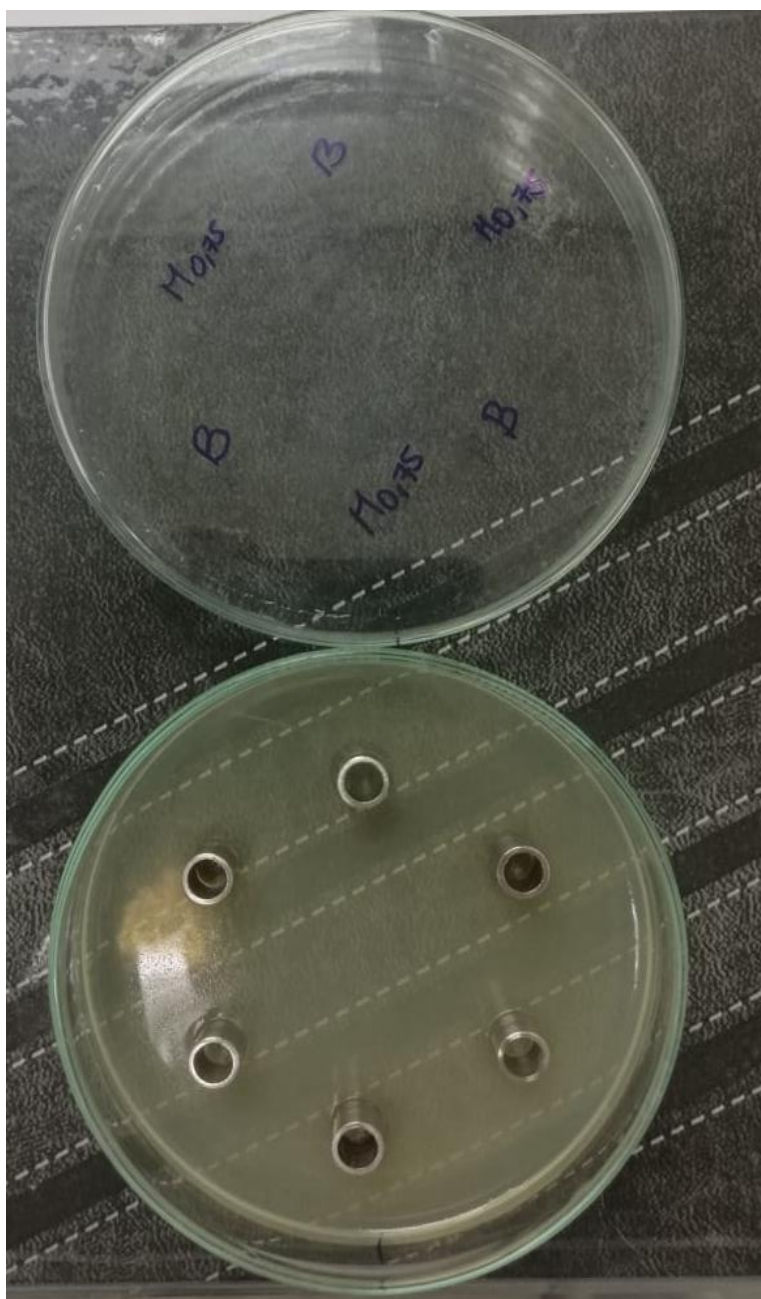


Figura 75. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 0,75mL de extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

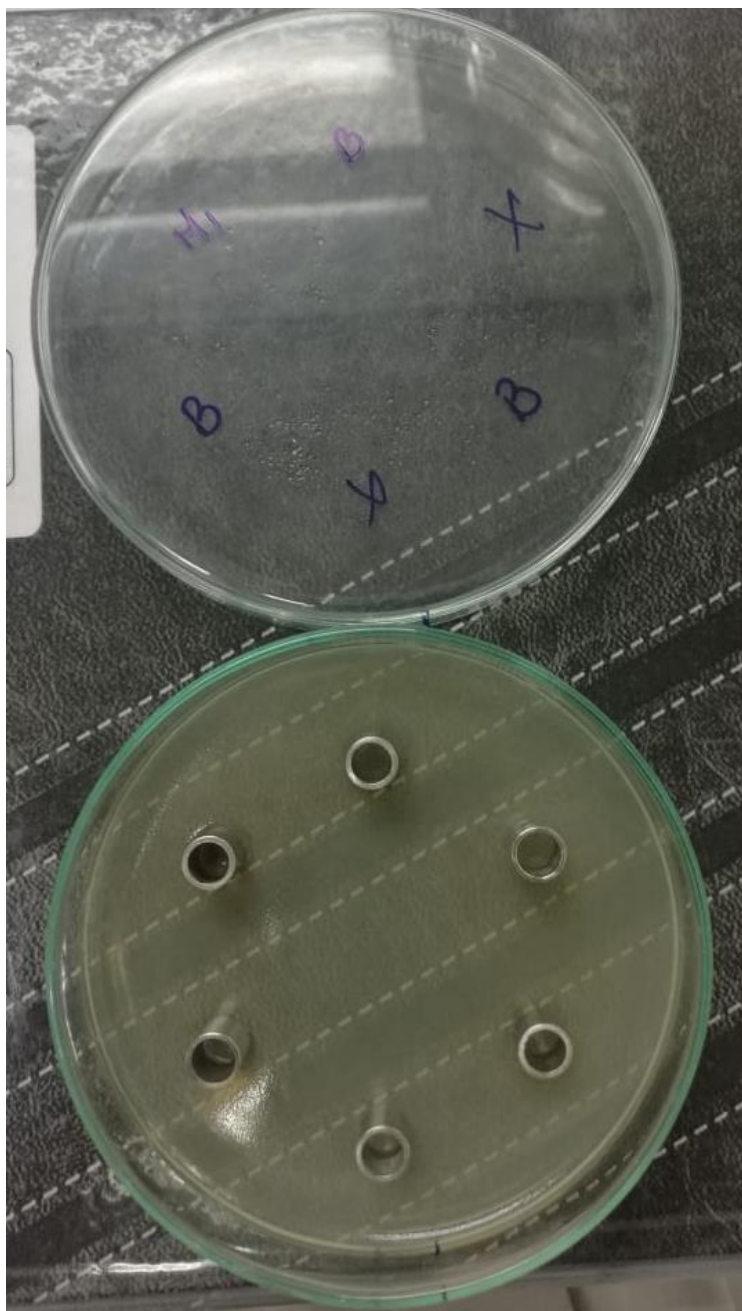


Figura 76. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 1mL de extracto de *Nepelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

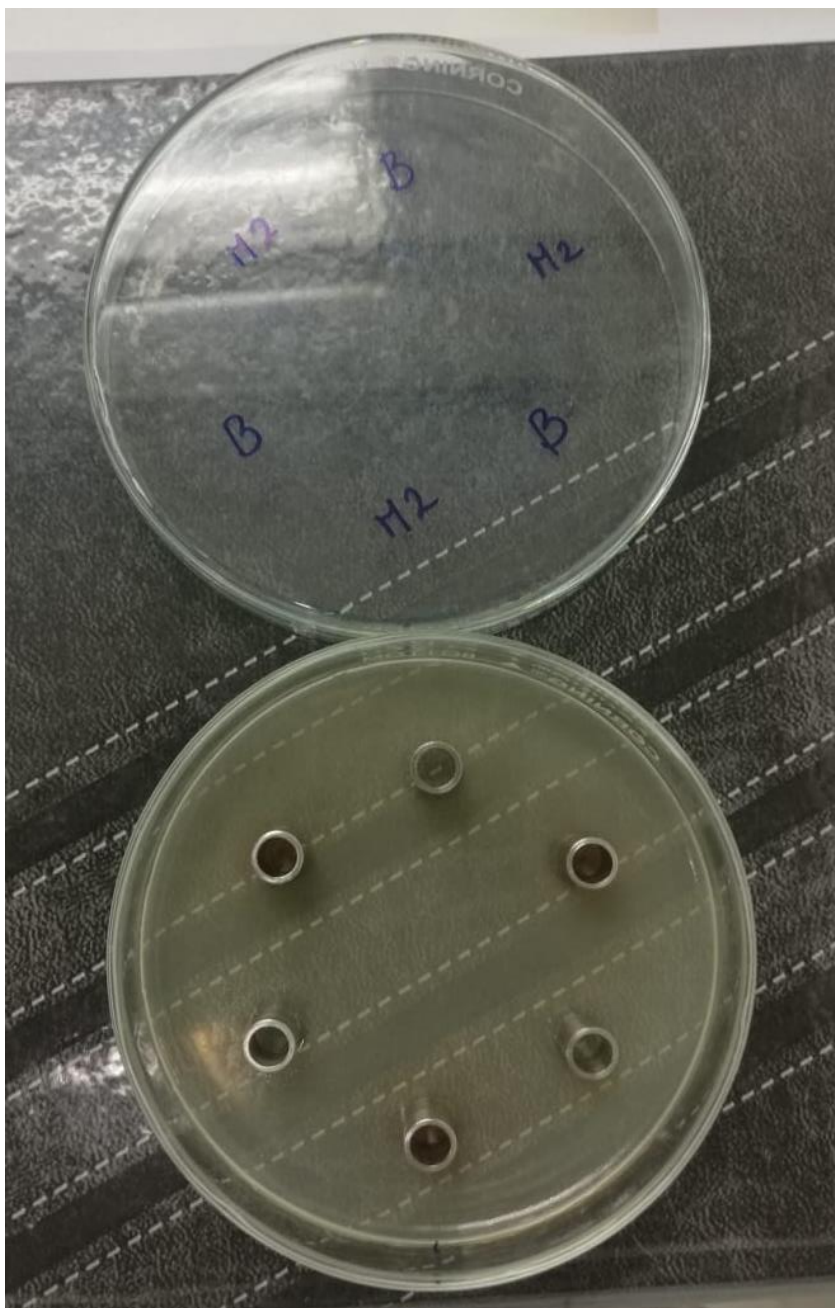


Figura 77. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata formada a partir de 2mL de extracto de *Nephelium lappaceum*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

En las figuras 75, 76, 77 y 78 se presentan las placas en las cuales se realizó el análisis de efectividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas con el extracto de las cáscaras de *Nephelium lappaceum*. En los cuatro tratamientos no se logra ver un halo de inhibición de crecimiento bacteriano. Esto puede deberse al hecho de que las alícuotas tomadas del extracto para

llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas de plata no fueron lo suficientemente representativas como para causar la inhibición del crecimiento de *S. aureus*.

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir de química verde está dada tanto por la actividad intrínseca de estas, así como por la acción del extracto, ya que se ha logrado demostrar con los extractos etéreo, metanólico y acuoso una concentración de polifenoles con actividad tanto antioxidante como antimicrobiana frente a bacterias patógenas (Macías, 2019).

Además, se exhibe la actividad antimicrobiana del extracto obtenido con la cáscara de rambután y se consiguió actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* 344 ATCC6538, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) DMST20645 y *Streptococcus mutans* ATCC25175T. Sin embargo, la actividad antimicrobiana fue negativa para las cepas de Gram negativas como *Escherichia coli* ATCC25922 y *Candida albicans* ATCC 10231. A su vez, se determina que la concentración mínima inhibitoria con contra *S. aureus* y MRSA es de 2 y 0,4mg/mL respectivamente (Tadrong *et al.*, 2011).

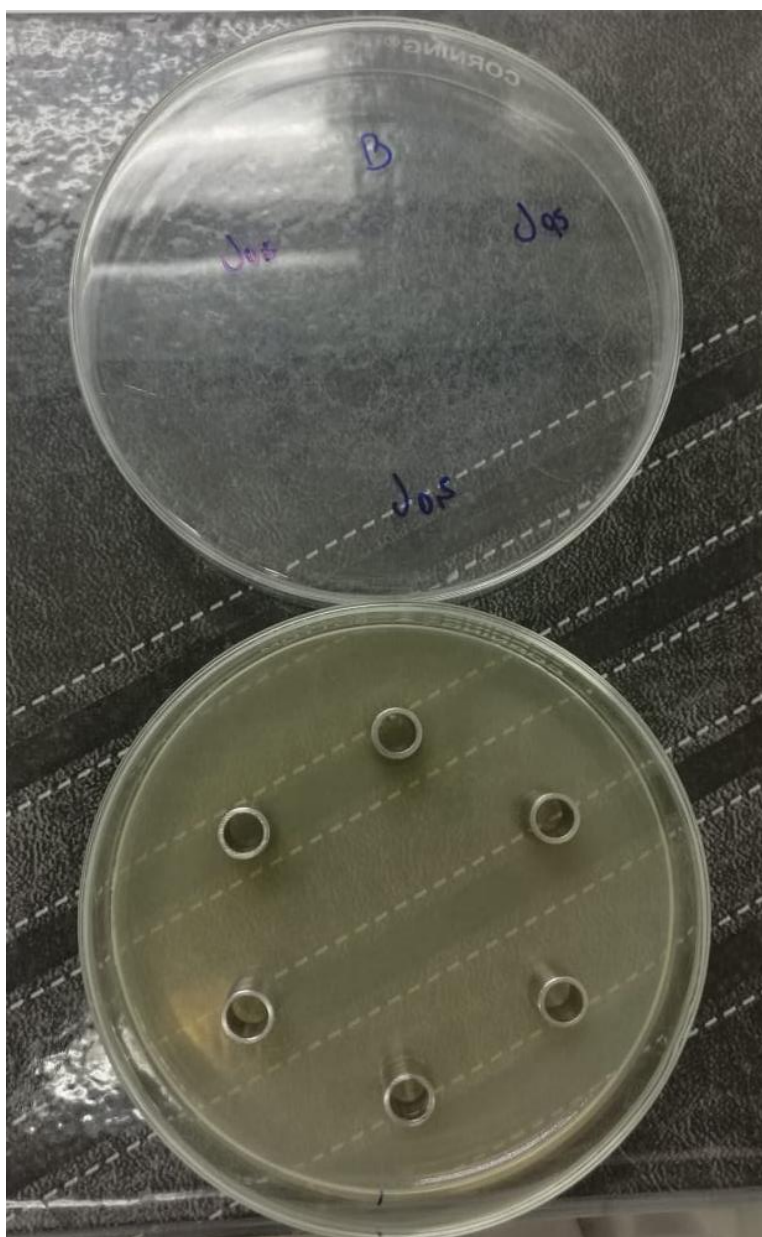


Figura 78. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 0,5mL de extracto de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.



Figura 79. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 0,75mL de extracto de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

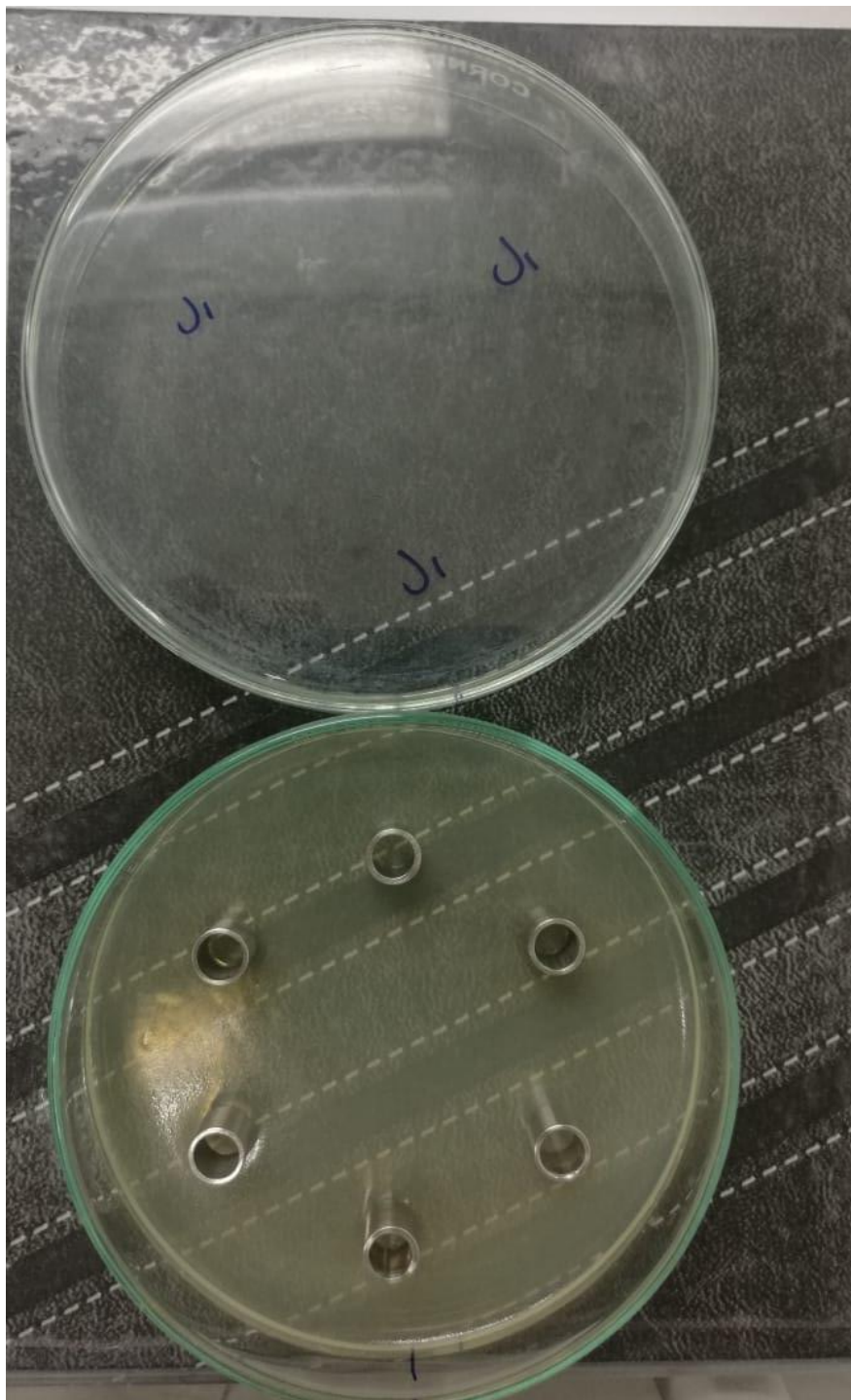


Figura 80. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 1mL de extracto de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

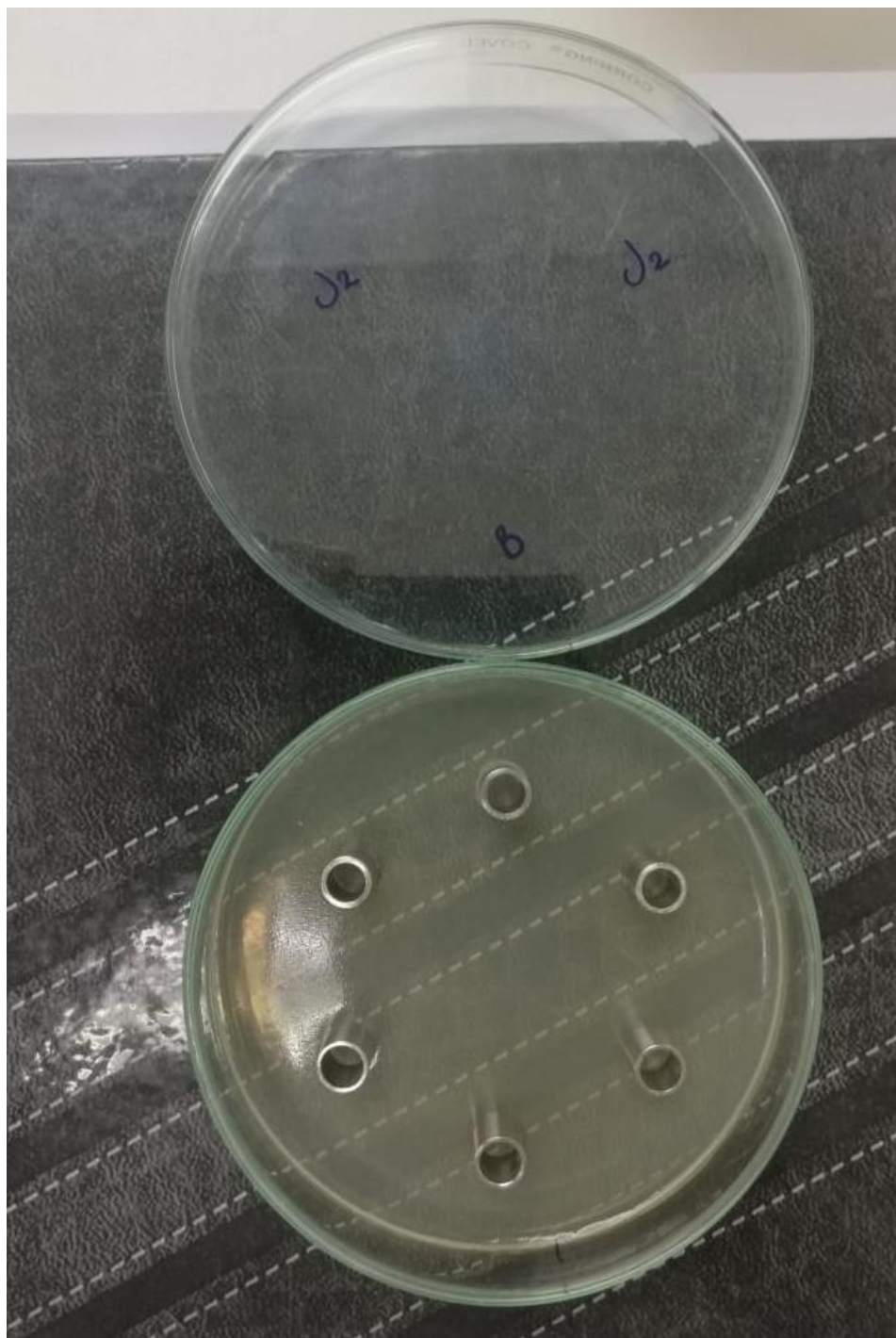


Figura 81. Análisis antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas con 2mL de extracto de *Zingiber officinale*.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

En la evaluación antimicrobiana que se realizó con las cuatro soluciones de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de los tratamientos de extracción de *Zingiber officinale*, se demuestra que en ninguna hubo inhibición de crecimiento bacteriano. Como se muestra en las figuras 79, 80, 81 y 82, no se identifica un halo de inhibición que se pueda medir con el propósito de conocer la concentración mínima inhibitoria de estas nanopartículas evaluadas.

Sin embargo, al analizar el extracto de *Zingiber officinale* por sí solo, se ha descrito que este tiene potencial antimicrobiano. Los resultados evidenciaron que los extractos acuoso y etanólico del jengibre sí poseen acción bactericida. La inhibición en el crecimiento de los aislamientos bacterianos que fueron realizados con la solución madre de los extractos era buena, pero al realizar diluciones de estas soluciones, la eficacia antimicrobiana se veía disminuida (Navarro, 2017).

Al ser los extractos tanto de las cáscaras de *Nephelium lappaceum* como de la raíz de *Zingiber officinale*, por sí solos sí presentan actividad antimicrobiana. Al tomar su acción como agentes reductores para la formación de las nanopartículas de plata, no se mantiene esta acción bactericida. El enfoque se basa en determinar si se da la formación de las nanopartículas de plata empleando concentraciones bajas de los extractos, porque si se emplearan cantidades muy altas de los extractos, este puede llegar a enmascarar la formación de las nanopartículas.

Primero se buscó verificar que sí hubo síntesis de nanopartículas, pero se puede llevar a cabo una investigación en la cual se siga concentrando el extracto y que se sigan identificando bien las nanopartículas. Las nanopartículas que se obtuvieron en esta investigación no eran muy fuertes o no tenían los suficientes componentes propios de los extractos que le brindaran la actividad antimicrobiana, aunque sí se dio la formación de estas, porque sí se lograron detectar por medio del espectro UV-visible y se logró ver un sedimento característico en las muestras.



Figura 82. Ejemplo de sedimento confirmatorio de la presencia de las nanopartículas.

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Nota: Sedimento señalado con el círculo color rojo.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Al ejecutar y finalizar los resultados de la investigación, se determinan las siguientes conclusiones:

Conclusión del primer objetivo específico

- Con los resultados de los ensayos preliminares realizados, se determinó que con el extracto de *Nephelium lappaceum* a cualquier concentración se daba la síntesis de nanopartículas de plata. Sin embargo, con el extracto de *Zingiber officinale*, el proceso de extracción preliminar era crítico, por lo que se desarrolló el diseño de experimentos, siendo las mejores condiciones de extracción a 80°C durante 2 horas con una alícuota de 2,5mL.

Conclusión del segundo objetivo específico

- Se logró detectar la formación de las nanopartículas de plata a partir de ambos extractos por medio de los espectros UV-visible, en los cuales se observó la curva característica de estas en un rango de longitud de onda entre 350 y 450nm. A su vez, se confirma con los espectros IR, en los cuales se notaron los grupos funcionales característicos.

Conclusión del tercer objetivo específico

- Se determinó que ninguno de los tratamientos de nanopartículas de plata que se evaluaron en la cepa de *Staphylococcus aureus* con una concentración aproximada de $5,6 \times 10^7$ ufc medidos a una transmitancia de 580nm, no presentaron inhibición, por lo que no presentan actividad antimicrobiana usando 200µL de nitrato de plata 1×10^{-3} M como blanco y 200µL de las soluciones de prueba a cultivar por 18 horas a 35°C.

Conclusión del objetivo general

- Se concluye que sí se lograron desarrollar las nanopartículas de plata a partir de los extractos de desechos naturales de *Nephelium lappaceum* y *Zingiber officinale*; sin embargo, no presentaron efectividad como inhibidoras del crecimiento bacteriano frente la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en las condiciones en las cuales se realizaron las pruebas microbiológicas.

Recomendaciones

- Se recomienda a los estudiantes llevar a cabo futuras investigaciones en las que se desarrollen más síntesis de nanopartículas basadas en el principio de química verde, empleando extractos naturales como agentes reductores.
- Fomentar la investigación en los profesionales de salud de nuevas alternativas antimicrobianas frente al crecimiento de la resistencia bacteriana, provenientes de metabolitos secundarios de extractos naturales.
- Se motiva a la Universidad Internacional de las Américas a la creación de un laboratorio microbiológico como equipos químicos para el fortalecimiento del laboratorio de química, con el fin brindar facilidad a las futuras investigaciones.

REFERENCIAS

- Acevedo, R., Severiche, C. y Jaimes, J. (2015). Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Producción + Limpia*, 10(2), 160-172.
- Aguayo, F., Zarzuela, E. y Lama, J. (2011). Nanotecnología y nanoquímica. *Sevilla Técnica*, (36), 28-37.
- Aguilar, M. y Rosas, G. (2016). Síntesis de nanopartículas de Cu por reducción química. *Instituto de Investigaciones Metalúrgicas. UMSNH*.
- Al-Otibi, F., Perveen, K., Al-Saif, N., Alharbi, R., Bokhari, N., Albasher, G., . . . Al-Mosa, M. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Malva parviflora* and their antifungal activity. *Saudi Journal of Biological Sciences*. doi:org/10.1016/j.sjbs.2021.01.012
- Aragüés, M. y González, A. (2007). Infecciones cutáneas primarias por estafilococos y estreptococos. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 98(1), 4-14.
- Arenas, C. (2017). *Síntesis de nanopartículas metálicas a partir de extractos de raspo de uva*. (Tesis de Grado en Ingeniería Química).
- Arenas, R. (2019). *Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento*. McGraw-Hill.
- Bacallado, D. (2018). *Nanotecnología: Problemas ecológicos y bioéticos*. (Trabajo de fin de grado, Facultad de Humanidades).
- Barrantes, C. y Ortega, G. (2020). Nanopartículas y antibióticos: respuesta a la resistencia global bacteriana. *Revista Ciencia & Salud: Integrando Conocimientos*, 4(5), 34-43.
- Bazán, A., Monjás, A., Balderas, C. y Molina, E. (2020). Uso y aplicación de nanopartículas de plata en odontología. *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Publicación semestral*, 8(16), 96-100.
- Bergesio, C. y Ligorria, T. (2016). *Desarrollo de caramelos a base de jengibre y arándano*. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Católica de Córdoba.
- Betancur, C., Hernández, V. y Buitargo, R. (2016). Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(4).
- Blas, S. (2017). *Acción reductora del extracto etanólico de *Zingiber officinale* Roscoe (jengibre) sobre el ión férrico*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo.
- Blázquez, M. (2018). *Nanotecnología en Dermofarmacia*. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia.

- Briones, F. y Martínez, Á. (2002). Eficiencia de algunos diseños experimentales en la estimación de una superficie de respuesta. *Agrociencia*, 36(2), 201-210.
- Cabrera, C., Gómez, R. y Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2), 149-158.
- Calderón, G. y Aguilar, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica*, 73(621), 757-763.
- Cardoso, P. (2016). Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Revista Hospital de Niños*, 58(260), 19-28.
- Carey, F. y Giuliano, R. (2014). *Química orgánica* (9ª ed.). McGraw-Hill.
- Carmona, F. y del Pozo, J. (2018). Tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus aureus*. *Medicine*, 12(49), 2918-2923.
- Castañón, C. (2012). Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evidencia Médica e Investigación en Salud*, 5(3), 79-84.
- Castillo, I. (2016). Las bacterias, estudio y cambios a lo largo de la historia. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 17(5).
- Castro, K. (2018). *Elaboración de nanopartículas de plata vía síntesis y compuestos orgánicos de Púnica Granatum y catálisis bacteriana de Escherichai coli, Staphylococcus aureus y Aspergillus niger*. (Tesis). Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química.
- Cavaliere, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., . . . Spiegel, C. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. http://cidbimena.desastres.hn/docum/ops/libros/labs_sucep_antimicro.pdf
- Cedeño, L. y Ganchozo, J. (2018). *Estudio farmacognóstico y fitoquímico de las hojas de dos variedades de Achotillo (Nephelium lappaceum L.)*. (Tesis). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Guayaquil.
- Cervantes, E., García, R. y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Chamé, K. (2013). *Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas*. (Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias). Centro de Investigaciones en Óptica.

- Cona, E. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*, 19(2). doi:dx.doi.org/10.4067/S0716-10182002019200001
- Cóndor, G. (2014). *Evaluación de la actividad expectorante de Molle (Schinus molle L.), ISO (Dalea coerulea), Jacaranda (Jacaranda mimosifolia), Jengibre (Zingiber officinale), Romero (Rosmarinus officinalis), Marrubio (Marrubium vulgare), en ratones (Mus musculus)*. (Tesis). Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Coutiño, E., Ávila, L. y Arroyo, O. (2017). Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 36(2), 39-54.
- Díaz, E. (2020). Nanopartículas de plata: síntesis y funcionalización. Una breve revisión. *Mundo nano*, 12(22). doi: doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2019.22.60758
- Djuric, J., Ibrić, S. y Djuric, Z. (2013). Experimental design application and interpretation in pharmaceutical technology. *Computer-Aided Applications in Pharmaceutical Technology*, 31-56. doi:10.1533/9781908818324.31
- Doria, M. (2009). Química verde: un nuevo enfoque para el cuidado del medio ambiente. *De Aniversario*, 412-420.
- Duque, J. (2017). *Resonancia del plasmón de superficie en nanopartículas metálicas sintetizadas por ablación láser*. (Tesis). Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Ingenierías Física, Eléctrica, Electrónica y Ciencias de Computación.
- Enríquez, A. y Prieto, E. (2007). *Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de Zingiber officinale Roscoe "jengibre" de la ciudad de Chanchamayo-Región Junpin-Perú*. (Tesis). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo.
- Farías, G. y Olaya, Y. (2018). *Estudio farmacognóstico y fitoquímico de las semillas de los frutos dulces y amargos de Nephelium lappaceum L.* (Tesis). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Guayaquil.
- Faúndes, N., Estrada, S., García, A., Leiva, J. y Ducasse, K. (2019). Síndrome de piel escaldada. Avances en diagnóstico y tratamiento. *Boletín Micológico*, 34(2), 81-91. doi:10.22370/bolmicol.2019.34.2.2004
- Fernández, F., López, J., Ponce, L., y Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana Médica Militar*, 32(1), 44-48.

- Fernández, T. (2017). *Estudio de las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de plata*. (Tesis). Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia.
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G. y Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20, 8856-8874. doi:10.3390/molecules20058856
- Frutos, V. (2017). *Nanotecnología aplicada a la medicina*. (Tesis). Universidad Zaragoza. Facultad de Medicina.
- Fu, X., Cai, J., Zhang, X., Li, W., Ge, H. y Hu, Y. (2018). Top-down fabrication of shape-controlled, monodisperse nanoparticles for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 169-187. doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.006
- García, A. y Kikut, K. (2020). Microscopía de fuerza atómica como herramienta en la investigación de asfaltos. *Revista Infraestructura Vial/LanammeUCR*, 22(40), 20-27.
- García, I. (2016). *Efecto del jengibre dietético como método alternativo para paliar náuseas y vómitos en el embarazo*. (Tesis). Universitat de Les Illes Balears.
- García, T., Castillo, A. y Salazar, D. (2014). Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. *Revista Cubana de Salud Pública*, 40(1).
- Gómez, M. (2018). Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27(2), 75-80.
- Gómez, M. (2019). Usos terapéuticos de nanomateriales y nanopartículas. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 28(1), 5-11.
- González, A. (2018). *Utilización de nanopartículas de plata como agente antibacteriano en infecciones óseas*. (Tesis de Farmacia). Universidad Complutense.
- González, P. (2015). *La química verde como perspectiva de la enseñanza de la química*. (Tesis). Universidad de Chile. Escuela de Ciencias Sociales.
- Guerrero, H., Caicedo, J. y Guerrero, E. (2017). La nanotecnología farmacéutica es una realidad. *Dominio de las Ciencias*, 3(2), 526-538.
- Gutiérrez, H. y De la Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. México: McGraw-Hill.
- Gutiérrez, J. (2017). *Diseño de experimento factorial*. Centro Universitario UAEM Zumpango. Universidad Autónoma del Estado de México.

- Hernández, C., Aguilar, C., Rodríguez, R., Flores, A., Morlett, J., Govea, M. y Ascacio, J. (2019). Rambután (*Nephelium lappaceum* L.): Una revisión general. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 11(21), 7-13.
- Hernández, M. (2013). *Síntesis de nanopartículas de plata biológicamente asistida con Opuntia sp. y su incorporación en membranas poliméricas nanofibrosas*. Centro de Investigación en Química Aplicada.
- Hernández, M., García, L., Rojo, D., y Olivares, D. (2003). Almendro de la India: potencial biológico valioso. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1).
- Hernández, P. (2017). *Reproducción*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación* (6ª ed.). México: McGraw-Hill.
- Herrera, M. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34.
- Horna, G., Silva, M., Vicente, W. y Tamariz, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana*, 16(1), 39-45.
- IDEXX Laboratories. (2018). Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI). *Actualización en Diagnóstico*.
- Ilzarbe, L., Tanco, M., Viles, E. y Álvarez, M. (2007). El diseño de experimentos como herramienta para la mejora de los procesos. Aplicación de la metodología al caso de una catapulta. *Tecnura*, 10(20), 127-138.
- Jiménez, J. y Correa, M. (2009). Staphylococcus aureus resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. *Iatreia*, 22(2), 147-158.
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L. y Angulo, Y. (2015). Fabrication of silver nanoplates using *Nephelium lappaceum* peel: A sustainable approach. *Journal of Molecular Liquids*, 211, 476-480. doi:dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2015.07.067
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G. y Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, 3(1), 10-18.
- Macías, E. (2019). *Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos en cáscara de rambután (Nephelium lappaceum L.) de dos variedades (dulce y amarga)*. (Tesis). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Guayaquil.

- Martínez, J., Pacheco, M. y Rada, I. (2013). Comparación de concentración mínima inhibitoria y concentración plasmática de cefalotina mediante un modelo matemático. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 47(2), 213-224.
- Martínez, M., Carrillo, R. y González, M. (2017). Aplicaciones y desafíos de la nanotecnología en el control y la mitigación de la contaminación. *Agroproductividad*, 10(4), 73-79.
- Mascarell, L. y Vilches, A. (2016). Química verde y sostenibilidad en la educación en ciencias en secundaria. *Enseñanza de las ciencias*, 34(2), 25-42. doi:<http://dx.doi.org/10.5565/rev/ensciencias.1688>
- Mensa, J., Soriano, A., Llinares, P., Barberán, J., Montejo, M., Salavert, M. . . . Picazo, J. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Revista Española de Quimioterapia*, 26(1), 1-84.
- Mercado, D. (2016). *Uso de residuos orgánicos domiciliarios en la obtención de materiales útiles de interés ambiental y nanotecnológico*. (Tesis). Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas.
- Mestres, R. (2013). Química sostenible: Naturaleza, fines y ámbito. *Educación química*, 24(1), 103-112.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2007). *Plan estratégico de la cadena productiva de Rambután*.
- Montes de Oca, G. (2018). Synthesis of silver nanoparticles using extracts from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) wastes. *Springer Nature*. doi:[doi:doi.org/10.1007/s12649-018-0394-7](https://doi.org/10.1007/s12649-018-0394-7)
- Mora, X. (2012). Diferenciando bacterias Gram+ y Gram-. *Selecciones avícolas*, 25-27.
- Morales, A. (2007). El cultivo de jengibre *Zingiber officinale*. *Ministerio de Agricultura y Ganadería. República de Costa Rica*. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-5066.pdf>
- Morcillo, M. y Peñafiel, M. (2017). *Elaboración de fitofármaco a partir del extracto hidroalcohólico de dos especies de Jengibre*. (Tesis). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Guayaquil.
- Moreno, C., González, R. y Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 69, 185-192.
- Napolitano, H. (2006). Diseño de experimentos. *Industria & Química*, 354, 62-73.

- National Center for Biotechnology Information. (2021). *PubChem Compound Summary for CID 3473, [6]-Gingerol*. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6_-Gingerol.
- Navarro, D. (2017). *Desarrollo de un enjuague bucal profiláctico en base a aceite esencial de Zingiber officinale con actividad frente a Streptococcus mutans*. (Tesis). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Central de Ecuador.
- Ortiz, J., Calderón, V., Pumasunta, S., Acosta, A., Sigcha, M. y Fernández, A. (2015). La nanotecnología aplicada en el campo de la medicina. *EFDeportes.com*(211).
- Pájaro, N. y Olivero, J. (2011). Química verde: un nuevo reto. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 21(2), 169-182.
- Palomino, M. y Salazar, E. (2020). *Efecto antiinflamatorio y capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico del pericardio de Nephelium lappaceum "Rambután"*. (Tesis). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Norbert Wiener.
- Paraguay, F. (2020). Técnicas de microscopía electrónica usadas en el estudio de nanopartículas. *Mundo nano*, 13(25). doi:<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69626>
- Pasachova, J., Ramírez, S. y Muñoz, L. (2019). Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *NOVA*, 17(32), 25.
- Patel, H., Parmar, S. y Patel, B. (2013). A comprehensive review on quality by design (QbD) in pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutical Sciences* , 21(1), 223-236.
- Picazo, J. (2001). Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Piqué, T. y Vásquez, A. (2012). Uso de espectroscopía infrarroja con transformada de fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y cemento. Investigación y Desarrollo*, 3(2), 62-71.
- Portillo, D. (2015). *Potencial de nanopartículas de plata inmovilizadas mediante la técnica de ultrasonido recubiertas en corcho granular como agente microbiano*. (Tesis). Universidad Politécnica de Cataluña.
- Quiñones, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3).
- Ramos, M. y Castillo, C. (2011). Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas. *Ide@s CONCYTEG*, 6(72), 629-646.

- Reyes, L. (2012). Aporte de la química verde a la construcción de una ciencia socialmente responsable. *Educación química*, 23(2), 222-229.
- Riedel, S., Hobden, J., Miller, S., Morse, M., Mietzner, T., Detrick, B. . . . Mejia, R. (2020). *Microbiología Médica* (28ª ed.). McGraw Hill.
- Rivera, M. y Arenas, J. (2019). De los micrómetros a los picómetros: evolución de las técnicas de microscopía para el estudio de nanomateriales. *Mundo Nano*, 12(23). doi:http://dx.doi.org/10.22201/ceich.24485691e.2019.23.67334
- Robles, D., Rodríguez, N. y Pataquiva, A. (2019). Síntesis de nanopartículas de magnetita a partir del extracto de cáscara de papaya para la degradación de colorantes azoicos en soluciones acuosas. *Ingeniare*, 27(3). doi:dx.doi.org/10.4067/S0718-33052019000300431
- Rodríguez, P. y Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2).
- Ryan, K. y Ray, G. (2017). *Microbiología médica*. McGraw Hill.
- Saavedra, F., Ale, N., Gordillo, G., Apestequía, A., Jurado, B. y Revilla, A. (2010). Análisis por espectroscopía UV y FTIR de macerados acuosos y alcohólicos de Aloe vera L. y Aloe barbadensis Miller. Interacción con sales inorgánicas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(3), 242-260.
- Salazar, J. y Baena, A. (2009). Análisis y diseño de experimentos aplicados a estudios de simulación. *Dyna*, 76(159), 249-257.
- Sánchez, M. (2017). *Nanopartículas de plata: Preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos*. (Tesis). Universidad Nacional de Educación a Distancia. Facultad de Ciencias.
- Saravanan, A., Senthil, P., Karishma, S., Dai-Vet, N., Jeevanantham, S., Yaashikaa, P. y Susan, C. (2020). A review on biosynthesis of metal nanoparticles and its environmental applications. *Chemosphere*, 264(2). doi:doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128580
- Seija, V. (2006). Género Staphylococcus. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 257-266.
- Siedentopp, U. (2008). El jengibre, una planta medicinal eficaz como medicamento, especia o infusión. *Revista Internacional de Acupuntura*, 2(3), 188-192. doi:10.1016/S1887-8369(08)72011-8
- Sierra, A., Meléndez, L., Ramírez, A. y Arroyo, M. (2014). La química verde y el desarrollo sustentable. *Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo*, 5(9).

- Tadtong, S., Athikomkulchai, S., Worachanon, P., Chalongpol, P., Chaichanachaichan, P. y Sareedenchai, V. (2011). Antibacterial activities of rambutan peel extract. *Journal of Health Research*, 25(1), 35-37.
- Taroco, R., Seija, V. y Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 663-671.
- Téllez, C. (2019). *Aplicaciones de la espectroscopía infrarroja en el análisis de alimentos*. (Tesis de Farmacia). Universidad de Sevilla.
- Torres, E. (2017). *Evaluación de los estudios de toxicidad de las nanopartículas de plata*. (Tesis). Universidad Distrital Fransico José de Caldas. Facultad de Ciencias y Educación.
- Torres, J., Rodríguez, L., Méndez, L. y Pérez, I. (2020). Diseño de experimentos para optimizar resistencia e índices de capacidad de un fusible. *Cultura Científica y Tecnológica*, 17(2), 1-9. doi:10.20983/culcyt.2020.2.2.4
- Torrontegui, L. (2018). *Nanopartículas de magnetita para recubrimientos marinos*. (Trabajo final de Grado en Marina). Universidad del País Vasco.
- Travieso, M., Rubio, A. y Pino, O. (2017). Las nanopartículas a partir de plantas como base para el diseño de nuevos antimicrobiano. *Revista Cubana de Farmacia*, 51(4).
- Urquilla, A. (2019). Impacto de la nanotecnología como revolución industrial a nivel mundial. *Realidad y Reflexión*(49), 66-78.
- Vargas, T. y Kuno, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49(2), 2594-2598.
- Vargas, V. (2014). *Efecto antimicrobiano in vitro del extracto de Zingiber officinale (jengibre) obtenido por extracción con fluidos supercríticos*. (Tesis). Universidad Católica de Santa María. Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas.
- Varsavsky, A. (2002). Química verde y prevención de la contaminación. *Industria y Química*, (344), 2-6.
- Velázquez, D. (2016). *La importancia de la química verde y su aplicación en la simulación del proceso para la producción de anhídrido maleico*. (Tesis). Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas.
- Vera, J. (2018). *Evaluación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de jengibre (Zingiber officinale) y cúrcuma (Curcuma longa) frente a la bacteria Staphylococcus aureus ATCC:12600*. (Tesis). Universidad Politécnica Salesiana.

- Villa, G., Becerril, I. y Soriano, O. (2019). Aplicación de nanopartículas de Ag en el desarrollo de apósitos microbicidas. *Revista Ciencia Administrativa*, 5(1), 86-97.
- Villamor, E. (2020). *Impacto medioambiental del uso de nanopartículas*. (Tesis de Farmacia). Universidad de Sevilla.
- Wong, E. (2010). ¿Después de un análisis de varianza... qué? Ejemplos en ciencia de alimentos. *Agronomía mesoamericana*, 21(2), 349-356.
- Yacuzzi, E., Martín, F., Quiñones, H. y Popovsky, M. (2004). El diseño experimental y los métodos de Taguchi: Conceptos y aplicaciones en la industria farmacéutica. *Serie Documentos de Trabajo. Universidad del Centro de Estudios Macroeconómicos de Argentina*, 258.
- Yepes, V. (2013). ¿Qué es el diseño de experimentos? [Mensaje de blog]. *Universidad Politécnica de Valencia*. <https://victoryepes.blogs.upv.es/2013/04/21/que-es-el-diseno-de-experimentos/>
- Zendejas, G., Ávalos, H. y Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129-143.

ANEXOS

EZ-PEC™
Catalog No. 0360-PEC

Staphylococcus aureus subsp. aureus derived from ATCC® 25923™*

Please [log in](#) to see price or purchase this item

 1 Kit

 In Stock

Details

20 pellets of a microorganism delivering a final concentration of 1.0E+05 to 1.0E+06 CFU per 1.0 ml, and 10 vials (2.0 ml each) of hydrating fluid.

General Information	Documentation	All Product Formats
Biosafety Level	2	
Product Format	EZ-PEC™	
Strain Characteristics	mecA negative	
Test Method	Antimicrobial Effectiveness/Preservation Efficacy Testing, Disinfectant Qualification Testing	
WDCM Number	00034	
Catalog number	0360	
Standards and Guidelines	U.S. Pharmacopeia (USP)	
Taxonomy	Bacteria	
Industry Type	Medical Devices, Personal Care Products/Cosmetics, Pharmaceutical	