

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE HIERRO A PARTIR DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Eucalyptus robusta* Sm. Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA”

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por la Br.
Maice Maigualida Figueroa
Calderón, para optar al
título de Licenciada en
Química.

Caracas, Julio de 2019

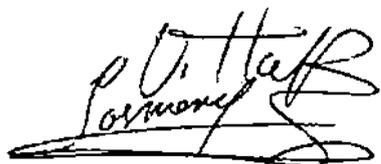
Yo Profesora Yosmery Vitta, investigadora del Laboratorio de Espectroscopía Láser de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, en conjunto con la profesora María Isabel Calderón, investigadora del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE HIERRO A PARTIR DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Eucalyptus robusta* Sm. Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA”

Que presenta la Br Maice Maigualida Figueroa Calderón para aspirar al título de Licenciada en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Espectroscopía Láser de la Escuela de Química y en el Laboratorio de Microbiología de alimentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante el año 2018, y con esta fecha autorizo su presentación.

Caracas, Julio de 2019.



Profa. Yosmery Vitta



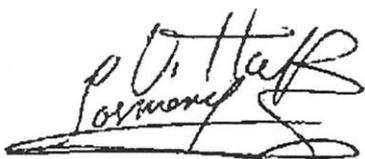
Profa. María Isabel Calderón

RESUMEN

La síntesis de nanopartículas metálicas es comúnmente llevada a cabo bajo el método químico que consiste en poner en contacto una solución precursora del metal con un agente reductor, el cual suele ser tóxico, difícil de descartar por problemas ambientales y costoso, sin embargo, se ha venido desarrollando un método de síntesis que involucra las plantas como una fuente de compuestos reductores que además pudiesen aportar alguna actividad antimicrobiana o antioxidante asociada a sus compuestos fenólicos y flavonoides. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue sintetizar nanopartículas de hierro (FeNPs) a partir del extracto acuoso de hojas de *E. robusta* Sm y evaluar su actividad antimicrobiana sobre distintos microorganismos. Para tales fines se realizó el ajuste de los parámetros involucrados en la síntesis de las nanopartículas tras el ensayo de distintas condiciones de síntesis, variando la proporción solución precursora de hierro : extracto, donde se obtuvo como proporción favorable 1:1, además se varió la concentración de ambas por separado, donde se tomaron como concentraciones óptimas 1g de hojas secas en 100mL de agua y la dilución a la mitad de esta (1g en 200mL) en el caso del extracto y 1mM y 5mM en el caso de la solución de Fe, encontrando dependencia de estas condiciones con el tamaño de partícula, exhibiendo el menor tamaño las nanopartículas sintetizadas usando [extracto] 1g de hojas secas / 200mL de agua y [Fe] 1mM. Posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana usando el método de difusión en agar frente a los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, encontrándose una relación estrecha entre las condiciones de síntesis y la actividad antimicrobiana, donde la condición que favoreció en general la actividad antimicrobiana coincidió con la mencionada anteriormente. Finalmente se realizó la cuantificación de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto acuoso de hojas de *E. robusta* Sm reportando (158,47±0,64) mg Eq ácido gálico/g y (131,12±4,49) mg Eq quercetina/g, respectivamente, y se evaluó su actividad antioxidante.

Palabras claves: Nanopartículas, hierro, *Eucalyptus robusta*, actividad antimicrobiana.

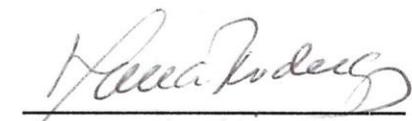
Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado : "Síntesis de Nanopartículas de Hierro a Partir del Extracto Acuoso de Hojas de Eucalyptus robusta Sm y Evaluación de su Actividad Antimicrobiana". Presentado por la Br. Maice Maigualida Figueroa Calderón, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciada en Química.



Profa. Yosmery Vitta
(Tutor)



Profa. María Isabel Calderón
(Tutor)



Profa. María Rodríguez
(Jurado)



Prof. Carlos Ciangherotti
(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, por brindarme el apoyo necesario para el desarrollo de esta investigación.

A la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, por brindarme el apoyo necesario para cubrir una parte importante de la investigación.

A la profa. Yosmery Vitta, mi tutora y gran apoyo en este proyecto de investigación, por darme la oportunidad de trabajar en este tema e impulsarme en mi crecimiento profesional.

A la profa. María Isabel Calderón, mi tutora, por guiarme y enseñarme el maravilloso mundo de la microbiología.

Al prof. Carlos Ciangherotti, jurado de esta investigación, por aportar su valiosa colaboración en esta investigación.

A la Br. Gabriela Galarza, pasante del Laboratorio de Espectroscopía Láser y operadora del microscopio de fuerza atómica, por aportar las imágenes AFM.

DEDICATORIA

A Dios, porque solo con él todo es posible.

A mi madre por creer en mí y siempre estar cuando más la he necesitado.

A mi padre por apoyarme en cada meta que me propongo.

A mi abuelo Ramón, que aunque no pudo ver este sueño materializarse, siempre estuvo apoyándome, repitiendo una y otra vez la importancia de culminar mi carrera, dándome palabras de aliento en los momentos más oportunos y estoy segura que hoy me cuida desde el cielo.

A mi abuela Armenia, que desde el comienzo apostó a mí y siempre ha estado para darme sus sabios consejos e impulsarme a avanzar aun cuando las circunstancias no son las mejores.

A mis hermanos que siempre serán mi equipo favorito, en las buenas o en las malas siempre están conmigo.

A quien considero un segundo padre, Gogui, por apoyarme siempre y motivarme a alcanzar cada meta que me propongo.

A mi mejor amiga Yennifer Jiménez, porque siempre me ha brindado su incondicional amistad y ha estado conmigo en cada paso importante.

A las mejores amigas que me regaló la universidad, Yeismar Aldana y Jhorbelis Silva, por estar en los mejores y peores momentos para apoyarme.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1 Nanopartículas | 3 |
| 2.1.1 Hierro | 4 |
| 2.1.2 Nanopartículas de hierro..... | 4 |
| 2.2 Métodos de síntesis de nanopartículas..... | 5 |
| 2.2.1 Síntesis verde de nanopartículas metálicas..... | 6 |
| 2.3 Eucalyptus | 8 |
| 2.4 Caracterización de las nanopartículas | 9 |
| 2.4.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS) | 9 |
| 2.4.2 Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-vis)..... | 9 |
| 2.4.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)..... | 10 |
| 2.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos | 11 |
| 2.5.1 Actividad antimicrobiana | 11 |
| 2.5.2 Microorganismos y su clasificación..... | 13 |
| 2.5.3 Método de difusión en agar | 16 |
| 2.5.3.1 Principio de la prueba de difusión en agar..... | 16 |
| 2.5.3.2 Factores que influyen la prueba de difusión en agar..... | 17 |
| 2.6 Antecedentes | 21 |
| 2.7 Justificación | 25 |
| 3. OBJETIVOS | 27 |
| 3.1 Objetivo General | 27 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 27 |

| | |
|---|----|
| 4. METODOLOGÍA..... | 28 |
| 4.1 Ajuste de parámetros de síntesis de las nanopartículas de hierro | 28 |
| 4.1.1 Extracto acuoso de las hojas de <i>E. robusta</i> | 28 |
| 4.1.2 Síntesis de las nanopartículas de hierro | 28 |
| 4.2 Caracterización de las nanopartículas de hierro | 29 |
| 4.2.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS) | 29 |
| 4.2.2 Espectroscopía UV-vis..... | 30 |
| 4.2.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)..... | 30 |
| 4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos | 30 |
| 4.3.1 Análisis estadístico de los resultados | 32 |
| 4.4 Caracterización del extracto acuoso de las hojas de <i>Eucalyptus robusta</i> Sm y evaluación de su actividad antioxidante..... | 33 |
| 4.4.1 Polifenoles totales..... | 33 |
| 4.4.2 Flavonoides totales | 33 |
| 4.4.3 Actividad antioxidante | 33 |
| 4.4.4 Análisis estadístico de los resultados | 34 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 35 |
| 5.1 Ajuste de parámetros de síntesis de nanopartículas de hierro y caracterización. | 35 |
| 5.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos | 46 |
| 5.3 Caracterización del extracto acuoso de las hojas de <i>Eucalyptus robusta</i> Sm y evaluación de su actividad antioxidante..... | 50 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 53 |
| 7. RECOMENDACIONES | 55 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |
|-------------------------------------|----|

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1. Distribución de tamaño vs Diámetro de nanopartículas de hierro elaboradas a partir de c4, c5 y c6. | 38 |
| Gráfico 2. Distribución de tamaño vs Diámetro de nanopartículas de hierro elaboradas a partir de c7. | 39 |
| Gráfico 3. Distribución de tamaño vs Diámetro de nanopartículas de hierro elaboradas a partir de c8. | 40 |
| Gráfico 4. Distribución de tamaño vs Diámetro de nanopartículas de hierro elaboradas a partir de c9. | 41 |
| Gráfico 5. Distribución de tamaño vs Diámetro de nanopartículas de hierro elaboradas a partir de c10. | 43 |
| Gráfico 6. Espectro UV visible de nanopartículas de hierro obtenidas a partir del extracto acuoso de hojas de <i>E. robusta</i> | 45 |
| Gráfico 7. Comportamiento de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>B. subtilis</i> frente a las nanopartículas de hierro obtenidas a partir de c8. | 49 |
| Gráfico 8. Captación de DPPH del extracto acuoso de hojas <i>E. robusta</i> (1g hojas/ 200mL agua). La quercetina fue utilizada como antioxidante de referencia. | 51 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Comparación de la pared celular de bacterias Gram negativas y Gram positivas..... | 14 |
| Figura 2. Esquema de metodología de síntesis de FeNPs..... | 28 |
| Figura 3. Metodología para preparación del inóculo..... | 32 |
| Figura 4. Metodología para inoculación de las placas, aplicación a los discos y lectura de las placas.. | 32 |
| Figura 5. a) Imagen AFM de FeNPs obtenidas bajo [Fe] 1mM, [E. robusta] 1g/200mL, [Fe]: [extracto] 1:1. b) Representación 3D. c) Perfil de altura a lo largo de la línea indicada en a..... | 45 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Condiciones usadas en el ajuste de parámetros de la síntesis de nanopartículas de hierro..... | 37 |
| Tabla 2. Condiciones de síntesis favorables para la síntesis de nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de hojas de <i>E. robusta</i> | 44 |
| Tabla 3. Comportamiento de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>B. subtilis</i> , frente a nanopartículas de hierro obtenidas a partir de <i>E. robusta</i> usando diferentes concentraciones de hierro y extracto en proporción 1:1..... | 47 |
| Tabla 4. Fenoles y flavonoides totales del extracto acuoso de las hojas de <i>E. robusta</i> | 50 |

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología se refiere a la ciencia que se ocupa de manipular materiales a escala atómica y molecular en una escala de tamaño de 1 a 100 nanómetros ^[1], esta ha traído consigo la aplicación de diferentes métodos para la síntesis de estos materiales que poseen propiedades físicas, químicas y biológicas únicas y han sido de gran importancia en diversas aplicaciones en campos multidisciplinarios. Los métodos generales de obtención de nanopartículas están agrupados en los bottom up (métodos químicos), donde se produce un auto-ensamblaje de átomos para formar un nuevo núcleo que crece dentro de una partícula en la nano-escala y los métodos top-down (métodos físicos), que consisten en la miniaturización de materiales macizos en partículas más finas por reducción del tamaño ^[2], sin embargo, los métodos biológicos surgen como una alternativa a los métodos químicos, entre sus ventajas se tienen: amigable con el ambiente, sencillez, rapidez, bajo costo, no requiere altas temperaturas, presión y energía, además posee el poder para auto-escalar la síntesis a nivel industrial ^[3]. Dichos métodos están basados en el uso de plantas o microorganismos y han sido ampliamente evaluados para generar nanopartículas con propiedades antimicrobianas y, en algunos casos, antioxidantes ^[3]. En la literatura existe una vasta investigación al respecto, siendo las nanopartículas de plata las más populares, no obstante, estas nanopartículas son de alta toxicidad y existe un compromiso entre la concentración límite que es tóxica para los microorganismos y su posible utilidad en modelos *in vivo* y en aplicaciones humanas ^[4].

De por sí las nanopartículas de óxidos de hierro tales como Fe_2O_3 y Fe_3O_4 presentan propiedades antimicrobianas, alta bio-compatibilidad, bajo costo y estabilidad, por lo que son comúnmente empleadas en aplicaciones biomédicas ^[5]. Dado que las nanopartículas de hierro se pueden obtener por síntesis verde y presentan una efectiva actividad antimicrobiana resulta de gran interés plantear estudios al respecto.

Entre los microorganismos patógenos de mayor incidencia en Venezuela vale destacar la *Escherichia coli* (*E. coli*), quien es el principal causante de infecciones urinarias y agravante de las condiciones de pacientes que poseen catéteres. En el año 2011 se reportó, según el Primer Consenso Venezolano de Infección Urinaria que estas infecciones representan más de 100.000 hospitalizaciones al año. Asimismo, representan aproximadamente el 40 % de todas las infecciones, que están asociadas a la colocación de catéteres [6].

La actividad antimicrobiana se puede considerar entonces como un tema de gran interés en el área de salud en Venezuela, siendo un punto importante el desarrollo de nuevas estrategias que permitan combatir diferentes patologías asociadas a la *E. coli* y otros microorganismos patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos como *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) se definen como agrupaciones de átomos de uno o varios compuestos que poseen al menos una de sus dimensiones en el rango de 1 a 100 nm^[1], tienen propiedades únicas como resultado de su tamaño pequeño y poseen características estructurales y morfológicas que los hacen ideales para cierto tipo de aplicaciones. Las propiedades fisicoquímicas de estas partículas nanométricas, en general, difieren drásticamente de las propiedades que muestra el mismo material a escala macroscópica. Para explicar las propiedades de las NPs se recurre principalmente a la mecánica cuántica. A la escala nanométrica, las propiedades dependen no solo del tamaño de la nanopartícula sino también de la forma en la que están acomodados los átomos. Aun cuando dos NPs están formadas por el mismo material y con el mismo número de átomos, si su estructura geométrica es diferente, sus propiedades serán distintas ^[7].

De forma general, las NPs son a menudo clasificadas en dos grupos:

- ❖ Orgánicas: como los fullerenos y los nanotubos de carbono.
- ❖ Inorgánicas: en las que se incluyen óxidos metálicos (óxido de zinc, óxido de hierro, dióxido de titanio, etc.), metales (oro, plata o hierro) y “quantum dots” (puntos cuánticos), entre las que se encuentran sulfuro de cadmio, seleniuro de cadmio, entre otras ^[8].

Las NPs de interés para efectos de la presente investigación serán las nanopartículas de hierro (FeNPs).

2.1.1 Hierro

El hierro (Fe), de número atómico 26 y masa atómica 55,8g/mol, es un metal brillante, maleable y reactivo, aunque se mantiene estable en atmósfera seca y en agua libre de CO₂. En otras condiciones el hierro se oxida a Fe²⁺ y Fe³⁺, formándose FeO, Fe₃O₄ y δ-Fe₂O₃, que son interconvertibles. La forma férrica (Fe³⁺) es muy propensa a sufrir hidrólisis dando lugar a un polímero insoluble de hidróxido de hierro. En determinadas condiciones pueden alcanzarse estados de oxidación mayores (Fe⁴⁺), sin embargo, las especies predominantes en las aguas son el Fe²⁺ y Fe³⁺ y los complejos orgánicos ferrosos y férricos. En condiciones aerobias y pH neutro las sales inorgánicas de hierro (III) son las especies más estables [9].

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, se extrae de diversos minerales como la hematita (Fe₂O₃), la magnetita (Fe₃O₄) o la limonita (FeO(OH)). Asimismo, es un elemento esencial para los procesos fisiológicos de los seres vivos. En plantas es necesario para la síntesis de la clorofila; en humanos, la deficiencia de hierro provoca anemia ferropénica que resulta en el desgaste de enzimas esenciales para los tejidos [9].

2.1.2 Nanopartículas de hierro

Las nanopartículas de hierro (FeNPs) suelen estar en las siguientes formas.

- ❖ Nanopartículas de hierro cero-valente (Fe⁰), las cuales exhiben típicamente una morfología núcleo-recubrimiento, donde el núcleo está compuesto de hierro metálico, y el recubrimiento se conforma de óxido de hierro [1].

- ❖ Nanopartículas de óxidos de hierro, las cuales contienen un núcleo de óxido de hierro de uno o más cristales incrustados y el recubrimiento ^[1]. El núcleo consiste en maghemita (Fe_2O_3) y magnetita (Fe_3O_4) ^[4]. La maghemita es la forma cúbica ferrimagnética del óxido de hierro III, y difiere de la estructura de espín inversa de la magnetita a través de vacancias en el sublátice del catión; presentan actividades catalíticas, antioxidantes y bacterianas, buena estabilidad y biocompatibilidad. Se utilizan para numerosas aplicaciones biomédicas, como agentes terapéuticos y de diagnóstico o administración de fármacos ^[5].

2.2 Métodos de síntesis de nanopartículas

Los métodos de síntesis de NPs suelen agruparse en dos categorías:

- ❖ Aproximaciones «de arriba hacia abajo». Involucra principalmente métodos físicos y consiste en la división de sólidos másicos en porciones más pequeñas. Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, evaporación térmica, depósito químico en fase vapor, preparación de clústeres gaseosos e implantación de iones y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados ^[2].
- ❖ Aproximaciones «de abajo hacia arriba». Agrupa principalmente métodos químicos y consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución. Este enfoque involucra los siguientes métodos: método coloidal, reducción fotoquímica o radioquímica, irradiación con microondas, método sol-gel y poliol ^[2].

Este último enfoque es mucho más popular en la síntesis de nanopartículas puesto que varios de los métodos que utilizan la aproximación «de arriba hacia abajo», salvo la molienda, requieren de instrumentación compleja y complicada, lo cual los hace

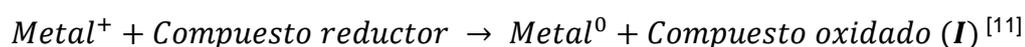
costosos [2], además, los métodos químicos han demostrado ser más efectivos en controlar tamaño y forma [8]. Sin embargo, el uso de los métodos químicos, como el coloidal que consiste en disolver una sal del precursor metálico o del óxido a preparar, un reductor y un estabilizante en una fase continua o dispersante (un líquido en este caso)[2] requiere agentes reductores químicos fuertes y débiles y agentes protectores (borohidruro de sodio, citrato de sodio y alcoholes) que son en su mayoría tóxicos, inflamables, no pueden desecharse fácilmente debido a problemas ambientales y también muestran una baja tasa de producción, además, en muchos casos, la síntesis se lleva a cabo a temperaturas elevadas, que generan una gran cantidad de calor [3], por tal motivo, este trabajo de investigación estará centrado en la obtención de las FeNPs por síntesis verde, el cual se basa en el uso de agentes biológicos como bacterias y hongos actinomicetos, levadura y plantas como materiales de partida, cuyos grupos funcionales actúan como agentes reductores de sales precursoras del metal, este método se caracteriza por ser ecológico y de bajo costo.

2.2.1 Síntesis verde de nanopartículas metálicas

La investigación comenzó con el descubrimiento de materiales magnéticos dentro de sistemas vivos, donde la presencia de magnetita (hierro como Fe (III)) en espacios intracelulares, llevó posteriormente a estudiar la presencia de Fe (II), que condujo a una revelación importante: los sistemas vivos son capaces de reducir el óxido férrico a través de un ciclo metabólico. Esta fue de hecho la primera evidencia de la capacidad de los sistemas vivos para reducir el metal a la forma cero-valente. También dio la primera indicación hacia la presencia de magnetita de tamaño nanométrico en la estructura celular [10,11].

Con base en lo anterior, hubo un gran interés en explorar las capacidades de bio-reducción de los microorganismos, de allí se desprende el método conocido actualmente como síntesis verde que está basado en el uso de metabolitos, extractos

vegetales, células, tejidos, semillas o estructuras para reproducción vegetativa, órganos y organismos completos para la síntesis de NPs, este método es conocido como “verde”, ya que al contrario que los métodos físicos y químicos no generan subproductos contaminantes y entre otras ventajas tienen un menor costo ya que no requieren de tanta infraestructura, reactivos y gasto de energía. Para la síntesis verde de NPs no se utilizan seres vivos, sino los extractos frescos o secos obtenidos de raíces, hojas, tallos, flores o frutos de diferentes especies vegetales o de sus semillas, de la biomasa remanente de procesos bioindustriales o biosólidos, o bien biopolímeros, carbohidratos, gomas y látex que se ponen en contacto con una solución de iones de metales para que el potencial reductor de los compuestos contenidos en el extracto lleve a cabo la reacción indicada en la ecuación (I) [10,11].



La síntesis verde de NPs metálicas es entonces una reacción redox y ocurre debido a la capacidad reductora de los componentes celulares o extracelulares como proteínas, carbohidratos, ácidos orgánicos, fenoles y otros metabolitos, los cuales aportan electrones a los cationes de los metales llevándolos a una forma metálica con carga cero y de escala nanométrica [11].

Cabe destacar que el compuesto reductor en la ecuación (I) representa tanto a un único metabolito o compuesto químico como a un conjunto de varios de ellos provenientes de un extracto vegetal o de células vivas. Los grupos funcionales que han sido reportados como interventores de la síntesis de NPs son los alcoholes, aldehídos, aminos, carboxilos, cetonas, hidroxilos, sulfhidrilos, por lo que puede suponerse que prácticamente cualquier compuesto biológico que aporte dichos grupos es utilizable para transformar iones de metales en NPs. Sin embargo, algunos compuestos como los terpenoides, flavonoides, heterocíclicos diversos, polifenoles, azúcares reductores y ascorbato se involucran directamente en la síntesis, mientras

que otros, como las proteínas funcionan como agentes estabilizantes, formando por adsorción una cubierta orgánica denominada corona ^[11].

Otro aspecto importante de señalar en la ecuación (I) es que el modelo de obtener el metal en su forma cerovalente se adapta muy bien a metales como Cu, Ag, Pd, Au, Ni, Ce, entre otros, sin embargo, para las FeNPs, se debe tener en cuenta que el mecanismo de síntesis no está del todo esclarecido, ya que se han reportado bajo una misma ruta sintética NPs de hierro cerovalente, de óxidos de hierro y mezcla de ambas ^[11,12].

2.3 Eucalyptus

El *Eucalyptus spp.*, posee más de 800 especies, sin embargo, en Venezuela solo se cultivan 4 de ellas, dentro de las que se encuentra *Eucalyptus robusta* J. E. Smith ^[13,14].

El *Eucalyptus robusta* es una planta de la familia Myrtaceae, oriundo de Australia, se cultiva ampliamente en Venezuela y en la mayoría de los países tropicales de América. Se reproduce por semilla, presentan crecimiento rápido, posee sistema radical bastante superficial, se adapta bien a las diferentes condiciones de suelos y es de vida corta. Sus hojas son ovalado-lanceoladas con el ápice largo, miden de 12 a.20 cm de largo por 4 a 8 cm de ancho ^[14].

Entre sus distintas aplicaciones destaca su actividad medicinal y terapéutica. Las hojas de esta planta contienen mayoritariamente compuestos orgánicos polifenólicos; bajo el término de polifenoles o compuestos fenólicos se engloba un gran número de

sustancias sumamente heterogéneas, caracterizadas por poseer en su estructura uno o varios anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo, como sustituyentes ^[13].

2.4 Caracterización de las nanopartículas

Dentro de las técnicas de caracterización de las FeNPs se encuentran: Dispersión Dinámica de la Luz (DLS), espectroscopía Ultravioleta visible (UV-vis) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

2.4.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Es una técnica espectroscópica para determinar el tamaño, la condición de agregación, y movilidad electroforética de las nanopartículas. De acuerdo con su tamaño, las nanopartículas adquieren una movilidad diferente que se conoce como diámetro hidrodinámico. DLS mide el movimiento browniano de las nanopartículas suspendidas en un líquido y se utiliza particularmente para establecer el tamaño de las NPs y sus aglomerados en soluciones ^[8].

2.4.2 Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-vis)

Esta técnica mide la concentración de analitos en solución a través de la absorbancia a una cierta longitud de onda, aplicando la Ley de Lambert-Beer. El método se conoce como colorimetría; la cual se aplica a los compuestos que poseen un espectro de absorción en esa región espectral y también a todos los compuestos que, después de la modificación por reactivos específicos, conducen a derivados que permiten medidas de absorción ^[15].

En el caso de las nanopartículas metálicas, como consecuencia de su pequeño tamaño, destaca la presencia de electrones libres en la banda de conducción de la superficie de las mismas, que reciben un haz de luz incidente, induce una excitación colectiva de estos electrones libres, como consecuencia de la fuerte interacción con la luz incidente, se produce una oscilación coherente deslocalizada de los electrones confinados en la superficie de las nanopartículas metálicas, en la interfaz metal-dieléctrico o metal-semiconductor; la excitación electromagnética se llama polaritón del plasmón de superficie; el polaritón es una casi-partícula híbrida resultante del fuerte acoplamiento entre la luz y los electrones libres en la superficie de una nano partícula ^[16,17].

Para determinadas frecuencias de la energía incidente, se produce un acoplamiento entre las frecuencias de la onda incidente y de la oscilación del polaritón; este fenómeno se llama resonancia del plasmón de superficie (RPS) y tiene la capacidad de absorber determinadas frecuencias de la luz incidente y de transmitir las frecuencias no absorbidas que se asocian a un determinado color ^[17].

La porción del espectro electromagnético, designada como 'UV-Vis' (ya que incluye radiación perceptible para el ojo humano) abarca el rango de longitudes de onda comprendidas entre 200 y 1200 nanómetros ^[15].

2.4.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica es usada principalmente para evaluar tamaño y morfología de las partículas. Se basa en la interacción entre una punta muy fina y la superficie de la muestra, se puede operar en diferentes modos, en el modo de contacto, la punta se arrastra a través de la superficie con una fuerza constante. Se trata de provocar un desplazamiento relativo entre punta y muestra mediante un barrido fino basado en materiales piezoeléctricos. Manteniendo la interacción punta - muestra constante, se obtienen mapas tridimensionales de resolución nanométrica en

los tres ejes. El uso de puntas especiales con propiedades eléctricas, térmicas o mecánicas permite asimismo la caracterización de la muestra con respecto a estas interacciones ^[18].

2.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos

Una de las particularidades que hacen la síntesis verde de NPs un método interesante, es la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos, por lo que se hace necesario introducir las definiciones de actividad antimicrobiana y microorganismos patógenos, para efectos de este trabajo.

2.5.1 Actividad antimicrobiana

Se definen como aquellas sustancias capaces de inhibir la supervivencia de microorganismos y son clasificadas según su origen en naturales y sintéticas ^[19]. Las sustancias antimicrobianas poseen distintos mecanismos de acción, entre los que destacan los siguientes.

- ❖ **Inhibición de la síntesis de la pared celular del microorganismo.** La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna (mayor en las bacterias grampositivas). La ausencia de esta estructura condicionaría la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano. La síntesis de la pared celular se desarrolla en 3 etapas, sobre cada una de las cuales pueden actuar diferentes compuestos: la etapa citoplásmica, donde se sintetizan los precursores del péptidoglucano; el

transporte a través de la membrana citoplásmica, y la organización final de la estructura del péptidoglucano, que se desarrolla en la parte más externa de la pared [20].

- ❖ **Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.** En la síntesis de bases que forman parte de los ácidos nucleicos, el ácido fólico representa la vitamina fundamental. A partir de este, y a través de una serie de pasos enzimáticos, se producen los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN). Los antimicrobianos que siguen este mecanismo de acción pueden interferir en los pasos metabólicos que conllevan a la producción del ácido fólico, inhibir la acción de enzimas y competir en la síntesis del ADN [21].

- ❖ **Bloqueo de los mecanismos de resistencia de los microorganismos.** Los antimicrobianos que siguen este mecanismo carecen (habitualmente) de acción antimicrobiana intrínseca de verdadera importancia clínica, pero se unen irreversiblemente a algunas β -lactamasas, inhibiendo su acción de resistencia [20].

- ❖ **Interferencia en la síntesis proteica.** La síntesis de proteínas requiere mecanismos intactos de interacción entre ribosoma, ácido ribonucleico mensajero (ARNm), de transferencia (ARNt), y aminoácidos. Los antimicrobianos que ejercen este mecanismo impiden la unión de porciones específicas de ribosomas e inhiben síntesis de péptidos [21].

La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es atribuida a compuestos fenólicos presentes en sus extractos, además como reporta Davidson (1993) a compuestos alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavinas [22].

El modo de acción de éstos compuestos fenólicos no ha sido determinado, éstos pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético y se ha observado que las grasas, proteínas, concentraciones de sal, pH y temperatura afecta la actividad antimicrobiana de estos compuestos [22].

2.5.2 Microorganismos y su clasificación

Un microorganismo se define generalmente como un ser vivo o un sistema biológico que solo puede ser observado en un microscopio, y como microorganismo patógeno aquel que tiene la capacidad de causar enfermedad en un individuo. Etimológicamente es correcto; sin embargo, excluye a los microorganismos infecciosos que no causan signos clínicos aparentes. Casadevall y Pirofski proponen la definición de microorganismo patógeno como aquel con la capacidad de producir daño en un hospedero. Esta capacidad es la patogenicidad [23].

Una característica taxonómica importante de las bacterias es su respuesta a la tinción de Gram, un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para su visualización, se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera diferenciación [24].

Los procedimientos de tinción de Gram inician con la aplicación de un colorante básico, violeta de genciana. A continuación se aplica una solución de yodo; todas las bacterias se tiñen de color azul en este punto del procedimiento. Luego la célula se trata con alcohol. Las células grampositivas que conservan el complejo de violeta de genciana-yodo adquieren un color azul y las células gramnegativas se decoloran por completo con la adición de alcohol. Como último paso se aplica otro colorante (como rojo de safranina) de forma que las células gramnegativas decoloradas adquieran un

color contrastante. La base de la reacción diferencial a la tinción de Gram es la estructura de la pared celular ^[24].

La diferencia más importante entre bacterias Gram positivas y Gram negativas es la composición y estructura de la pared celular. En ambas, la pared celular consta de la membrana citoplasmática o membrana celular que rodea al espacio interno de la célula. Luego hay una capa de peptidoglicano, y entre la membrana y el peptidoglicano un pequeño espacio llamado espacio periplasmático o periplasma ^[25].

En las bacterias gram positivas, la capa de peptidoglicano es gruesa, mientras que en las bacterias gram negativas la capa de peptidoglicano es mucho más fina y está rodeada de otra membrana más, la membrana externa ^[25].

Dicho de otro modo, las bacterias gram positivas no tienen membrana externa y cuentan con una capa de peptidoglicano mucho más gruesa que las bacterias gram negativas [24,25].

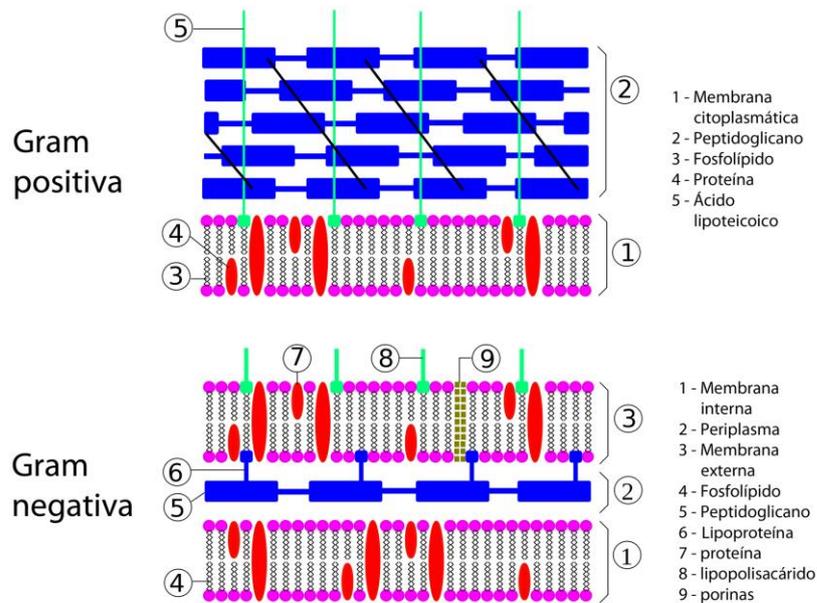


Figura 2. Comparación de la pared celular de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Fuente: <https://curiosoando.com/que-es-una-bacteria-gram-positiva>

Entre las bacterias Gram negativas se encuentran *E. coli* y *P. aeruginosa*, por su parte, dentro de la clasificación de bacterias Gram positivas se encuentran *B. subtilis* y *S. aureus* [24].

Existen varios métodos para evaluar la actividad antimicrobiana, sin embargo, se conoce que las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana y ofrece muchas ventajas sobre otros métodos, dentro de las que destacan su simplicidad, bajo costo, la capacidad de probar diferentes microorganismos y agentes antimicrobianos, y la facilidad para interpretar los resultados proporcionados, por lo que la evaluación de la actividad

antimicrobiana de las FeNPs frente a microorganismos patógenos se llevará a cabo usando el método de difusión en agar [26,27].

2.5.3 Método de difusión en agar

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y col., (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en agar o en disco fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, 1997), de Estados Unidos [26,28].

2.5.3.1 Principio de la prueba de difusión en agar

El Principio de la prueba de difusión en agar se basa en establecer de forma cuantitativa el efecto de una sustancia en estudio (en el caso de la presente investigación serán las FeNPs) sobre diferentes microorganismos, a través de la relación entre la concentración de la sustancia y el halo de inhibición formado en la superficie de una placa de agar [26,19].

El compuesto a estudiar difundirá por el agar produciendo un gradiente de concentración, de manera que, si el compuesto es efectivo contra el microorganismo probado se formará una zona o halo de inhibición alrededor del disco embebido; el tamaño de la zona de inhibición proporciona indicios de la actividad antimicrobiana de la sustancia (NCCLS, 1997) [29].

2.5.3.2 Factores que influncian la prueba de difusi3n en agar

Las siguientes variables son algunas de las de mayor importancia que se deben considerar, para evitar las posibles variaciones en la respuesta instrumental esperada:

- ❖ **Profundidad del agar.** la profundidad de la capa de agar afecta los resultados. Se debe procurar estandarizar el volumen medido de agar fundido antes de servirlo en las placas de petri, dado que existe una relaci3n inversamente proporcional entre el diámetro del halo formado y el grosor de la placa de agar solidificado. Esto quiere decir que si es adicionado un volumen grande de agar en la placa, pueden generarse halos con diámetros menores o viceversa, cuando las demás condiciones permanecen constantes ^[19].
- ❖ **Concentraci3n del in3culo.** Es una variable importante, con capacidad de modificar la respuesta (halo de inhibici3n), es la concentraci3n de suspensi3n del microorganismo seleccionado (in3culo). La magnitud del diámetro del halo que se obtiene guarda una proporcionalidad con la concentraci3n del in3culo manteniendo las demás concentraciones constantes. La suspensi3n utilizada debe ofrecer una concentraci3n del microorganismo conocida de 10^5 a 10^6 Unidades Formadoras de Colonia/mL (UFC/mL), bajo estas concentraciones se obtienen respuestas instrumentales dentro de valores razonables ^[19].
- ❖ **Temperatura de incubaci3n.** La temperatura que se emplea para la incubaci3n de las placas, debe ser la adecuada para el microorganismo inoculado, de esta forma, se incuba el microorganismo a su temperatura optima de crecimiento para que sea la sustancia antimicrobiana quien ejerza su efecto inhibidor del crecimiento y no otra condici3n, como en este caso, la temperatura, que para bacterias debe tener un valor de 37°C seg3n la recomendaci3n del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) ^[19,27].

Por otra parte, es importante tener en cuenta que el apilamiento de placas genera gradientes de temperatura, por lo que en las placas más externas, podría presentarse un crecimiento más acelerado que en las placas que se encuentran en el centro del apilamiento, lo que finalmente ocasionaría respuestas diferentes, no comparables ^[19].

- ❖ **Naturaleza del borde del halo de inhibición.** Dado que en gran medida, cualquier conclusión tomada a partir de las pruebas de difusión en agar para determinar la potencia de un antimicrobiano, depende de los halos de inhibición medidos, se deben determinar de tal modo que el valor experimental, sea lo más aproximado posible al borde real del halo. Sin embargo, en la práctica se observan halos con bordes: difusos, indefinidos, dobles, difíciles de medir; esto se debe a que el microorganismo inoculado en el medio de agar se enfrenta a un gradiente de concentración del antimicrobiano, generalmente menor a medida que se aleja de la fuente (disco) lo que da lugar a la formación de una zona de inhibición parcial, generando la sensación de degradación en los bordes del halo, como una zona difusa difícil de medir, a esto se le adiciona el hecho que el diámetro de los halos son características que se miden en función del tiempo ya que no son estáticos y después de determinado tiempo de incubación generan cambios como sobrecrecimiento que distorsiona y dificulta la lectura ^[19].

En algunos casos, se presenta el fenómeno de la formación del doble halo siendo el halo interno el que manifiesta completa inhibición, lo que se observa mediante un halo bien definido en su borde y transparente hasta donde las características del medio lo permitan. Por su parte el halo externo se ve menos transparente y con bordes poco definidos, lo que dificulta su lectura. Para efectos prácticos, la medición de los tipos de halo para la determinación de la potencia relativa, es indiferente ya que se conserva las proporciones y queda a criterio del experimentador una decisión en función de la facilidad de su lectura, siendo fundamental que el halo seleccionado sea el mismo tanto para el patrón como para

la muestra analizada. El halo externo presenta mayor dificultad en su lectura y genera errores de apreciación experimental ^[19].

- ❖ **Composición química del medio de agar.** Se debe verificar el contenido de ciertas sustancias, especialmente electrolitos, que pueden afectar la difusión de la sustancia antimicrobiana cuando esta sufre algún tipo de interacción por cargas, lo que finalmente obstaculiza el efecto inhibitorio del antimicrobiano frente al microorganismo ya que el mismo no difunde libremente a través del centro del líquido por sus repulsiones de naturaleza eléctrica. Los medios de inoculación más utilizados son el agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras; el medio que se usará en la presente investigación será el agar de Mueller Hinton ^[19,26].

- ❖ **Tiempo de incubación.** Dado que el halo de inhibición formado, depende de tiempo de incubación, se debe tener un tiempo de lectura fijo, para evitar errores en las determinaciones de los diámetros de los halos formados, ya que después de pasado el tiempo adecuado de lectura se presentan problemas como sobrecrecimiento; el tiempo de incubación para bacterias según el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) es de 24 a 48 horas, dependiendo del microorganismo ^[19,27].

- ❖ **Concentración crítica (CC).** Se define como la concentración del agente antimicrobiano por debajo de la cual no se puede evitar el crecimiento del microorganismo. Se obtiene a partir de la utilización de la técnica de difusión en agar, a través de la determinación de una respuesta medible (halos de inhibición), dada por los distintos niveles de concentración del antimicrobiano evaluado, en un medio sólido inoculado con un microorganismo genéticamente conocido (Cepa ATCC) ^[19].

✿ **Volumen de la concentración del antimicrobiano a servir.** El volumen de la concentración de la sustancia en estudio a servir en el disco debe siempre ser el mismo, para que actúe como un reservorio de concentración constante. En el desarrollo experimental se emplean volúmenes estándar, normalmente se aplica en cada disco un volumen de 100 μ l, de las diferentes concentraciones de las diluciones de la sustancia en estudio ^[19].

2.6 Antecedentes

A continuación se presenta una revisión de trabajos previos realizados en esta área, vinculados al uso de extractos de plantas para la obtención de nanopartículas y a la evaluación de la actividad antimicrobiana tanto de los extractos vegetales como de las nanopartículas obtenidas mediante síntesis verde.

En estudios anteriores, como el realizado por Arunachalama, R. y col., 2012, titulado Fitosíntesis de nanopartículas de plata usando extractos de hoja de *Coccinia grandis* y su aplicación en la degradación fotocatalítica, obtuvieron nanopartículas de plata (AgNPs) mediante una biosíntesis, a partir de AgNO_3 acuoso y el extracto de hoja de la calabaza hiedra (*Coccinia grandis*). Las partículas mostraron un rango de tamaño de 20-30 nm y presentaron propiedades fotocatalíticas exitosas en la degradación del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 bajo luz UV ^[30].

En 2013, Ramírez-Rueda, R. y col., llevaron a cabo una investigación titulada Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas frente a cepas bacterianas multiresistentes, donde evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos y diclorometánicos de seis plantas contra bacterias multiresistentes. Para evaluar la actividad antimicrobiana utilizaron la técnica de difusión en agar, donde determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) probando distintas concentraciones contra las cepas bacterianas *S. aureus* y *E. faecalis*, obteniendo como resultado que los extractos de *Helichrysum italicum* (conocida como curry) inhibieron las bacterias grampositivas en estudio. En este caso el tamizaje de seis especies vegetales dio lugar al hallazgo de un ejemplar cuyos extractos metanólicos y diclorometánicos inhiben en bajas concentraciones dos cepas bacterianas multiresistentes ^[31].

Por su parte, Carvajal, Z. y col., 2013, realizaron el estudio Actividad biológica de extractos de tres plantas sobre bacterias patógenas para el humano en la Universidad Central de Venezuela, donde se determinó la citotoxicidad de extractos de *Parinari sprucei*, *Couepia paraensis* y *Lantana camara L.* y evaluaron la actividad estos posibles agentes antimicrobianos por el método de difusión en agar de Kirby-Bauer sobre *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter haemolyticus*, resultando que los extractos de la familia Verbenaceae no poseen actividad antibacteriana, mientras que los de la familia Chrysobalanaceae inhibieron la replicación de bacterias grampositivas [32].

E. Mohammed, A., 2015 llevó a cabo una investigación titulada Síntesis verde, efectos antimicrobianos y citotóxicos de nanopartículas de plata obtenidas por extracto de hoja de *Eucalyptus camaldulensis*, en este trabajo se utilizó la técnica de biosíntesis extracelular para la producción de nanopartículas de plata (AgNPs), usando el extracto de hoja del *Eucalyptus camaldulensis* (*E. camaldulensis*) y se evaluaron los efectos antimicrobianos y citotóxicos de las AgNPs contra cuatro tipos de bacterias patógenas, incluyendo dos bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) y dos bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) a través del método de difusión en agar, obteniendo una actividad bactericida eficiente contra las especies probadas. No obstante, el mecanismo exacto de la biosíntesis extracelular de NPs de metales necesita más estudios para resaltar el proceso de biosíntesis de las AgNPs y también para caracterizar el efecto de toxicidad de estas nanopartículas [33].

Carrillo, M., y col., 2016, realizaron un estudios sobre la Fortificación de harina de maíz con nanopartículas de fierro sintetizadas con extracto de moringa (*Moringa oleifera*), en este trabajo se propuso un tratamiento de la anemia ferropénica tras el uso de la nanotecnología, para tal fin se fortificaron tortillas de harina de maíz con nanopartículas de hierro (FeNps) sintetizadas con el extracto de *M. oleifera* y una

solución de FeSO_4 . El contenido de minerales en la tortilla elaborada con harina adicionada y sin adicionar FeNps fue de 2.1 y 1.6 % respectivamente. Estas tuvieron buena aceptación sensorial e incrementaron su vida útil hasta por 23 días. Finalmente, se concluyó que la fortificación de harina de maíz con FeNps para elaborar tortillas es una alternativa viable para la prevención de la anemia ferropénica [34].

Esta investigación muestra un efecto importante de las nanopartículas sintetizadas a partir de extractos de plantas, debido a que promueven la inhibición de crecimiento de microorganismos en las tortillas fortificadas con las FeNPs, lo que indican que estas partículas presentan una actividad biológica que puede estar asociada a los componentes presentes en el extracto de la *M. oleífera*.

González-Vargas, N. y col., 2017, realizaron un trabajo de investigación sobre la Actividad Antibacteriana De Nanopartículas Metálicas Sobre Bacterias Resistentes A Antibióticos Convencionales, este trabajo se enfocó en la evaluación de la actividad antibacteriana de NPs metálicas (Ag y Cu) sobre cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, aisladas de pacientes del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío, y clasificadas como sensibles y resistentes por el Laboratorio de Microbiología de Análisis Clínicos de León (México). Se realizaron antibiogramas para todas las cepas usando de 14 a 17 antibióticos diferentes empleando la técnica de Kirby-Bauer y se determinó la sensibilidad y resistencia para cada antibiótico evaluado, luego se realizó la evaluación de la actividad antibacteriana de las NPs de Cu y Ag sobre las cepas sensibles y resistentes, encontrando que ambos tipos de bacterias son igualmente sensibles a las NPs metálicas [35].

Gopalu, K., y col., 2017, trabajaron en una investigación titulada Biosíntesis floral de nanopartículas de Mn_3O_4 y Fe_2O_3 usando extractos de flores *Chaenomeles sp.* para aplicaciones medicinales eficientes, en este trabajo de investigación se dio paso al primer enfoque para sintetizar nanopartículas a partir de extractos de flor

Chaenomeles sp y se encontró que las moléculas orgánicas presentes en los extractos de flores involucradas en la síntesis de las nanopartículas de Mn_3O_4 y Fe_2O_3 fueron glucósidos, alcaloides, terpenoides, saponinas, flavonoides, quininas y esteroides, las cuales se identificaron utilizando diferentes análisis fitoquímicos y cromatografía de gases-espectrometría de masas. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión mostraron la formación de nanopartículas esféricas con un tamaño promedio de 30-100 nm y el análisis antioxidante mostró que las nanopartículas sintetizadas tenían excelente potencial antioxidante. Además, el estudio antibacteriano demostró que inhiben el crecimiento de bacterias dañinas tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*. Por lo tanto, este estudio propone un nuevo método ecológico y no tóxico para sintetizar nanopartículas para aplicaciones medicinales [36].

Jagathesan, G., y col., 2018, publicaron la investigación titulada Biosíntesis y caracterización de Nanopartículas de óxido de hierro usando extractos de hoja de *Eichhornia crassipes* y evaluación de su actividad antibacterial, donde se elaboraron los procesos de formación de nanopartículas de óxido de hierro biogénicas a través de un enfoque de química verde y analizó su actividad antibacteriana frente a los microorganismos patógenos *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas fluorescens*, obteniendo buena actividad antibacteriana y se concluyó que pueden usarse en campos medicinales [37].

2.7 Justificación

La síntesis verde de nanopartículas metálicas es un método de obtención de nanopartículas alternativo al método químico, donde se excluye el uso de agentes reductores y estabilizantes que en su mayoría son tóxicos, es sencillo, rápido y de bajo costo. Aunado a ello, el uso de extractos vegetales de especies que poseen alguna actividad biológica, como el *Eucalyptus robusta*, que es conocido por sus propiedades medicinales y terapéuticas, representaría una ventaja adicional en el uso de síntesis verde al permitir obtener nanopartículas metálicas con propiedades biológicas adicionales.

Además de las ventajas en cuanto a las propiedades biológicas que puede conferir el *Eucalyptus robusta*, vale destacar que este es ampliamente cultivado en Venezuela, lo que incrementa la viabilidad económica del proceso planteado.

Es importante mencionar que de alguna manera somos vulnerables a los microorganismos patógenos, ya que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, agua, suelo, aire, materia fecal, entornos de producción de alimentos, y entornos hospitalarios. En Venezuela, entre los microorganismos patógenos de mayor incidencia destaca *E. coli*, siendo este el principal causante de infecciones urinarias y agravante de las condiciones de pacientes que poseen catéteres, presentando altos porcentajes de resistencia a los antibióticos como ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico^[38], lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico cuando este es requerido, asimismo, el *S. aureus* es el principal agente causal de Enfermedades de Transmisión por Alimentos (ETAs), responsable de intoxicación alimentaria estafilococcica e infecciones severas como septicemia, neumonía, meningitis y endocarditis ^[39]. Por otra parte, la *P. aeruginosa*, presente en el suelo y agua, es causante de infecciones que pueden ser externas y leves (que afectan el oído o los folículos pilosos) o bien

infecciones internas graves (que afectan los pulmones, el torrente sanguíneo o las válvulas cardíacas) ^[40]. Asimismo, vale resaltar al *Bacillus*, género dentro del cual se encuentran especies productoras de intoxicaciones e infecciones clínicas, tales como la bacteremia, septicemia, infecciones del sistema nervioso, sistema respiratorio, meningitis, endocarditis, pericarditis, abscesos, infecciones oculares, entre otras ^[41].

El aporte principal de este trabajo es precisamente el estudio de un posible antimicrobiano mediante la síntesis de nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta*, lo que permitiría en un futuro el desarrollo de estrategias alternativas que ayuden en el tratamiento contra microorganismos patógenos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Sintetizar nanopartículas de hierro a partir de extracto acuoso de hojas de *Eucalyptus robusta* Sm para su posterior evaluación de actividad antimicrobiana.

3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Ajustar los parámetros de síntesis de las nanopartículas de hierro a partir de extracto acuoso de las hojas de *Eucalyptus robusta* Sm.
- ❖ Caracterizar las nanopartículas de hierro vía dispersión dinámica de la luz y espectroscopía ultravioleta visible.
- ❖ Evaluar la capacidad antimicrobiana de nanopartículas de hierro frente a microorganismos patógenos mediante el método de difusión en agar.

4. METODOLOGÍA

4.1 Ajuste de parámetros de síntesis de las nanopartículas de hierro

4.1.1 Extracto acuoso de las hojas de *E. robusta*

La síntesis de nanopartículas de hierro requirió del extracto acuoso de las hojas de *Eucalyptus robusta* Sm, las cuales fueron recolectadas en los alrededores de la Urbanización Los Geranios en la Av. Principal El Hatillo, La Boyera, sector los pinos, Caracas e identificadas en el Herbario "Victor Manuel Ovalles" (MYF) bajo el N° 29523, donde reposa un ejemplar. Para la obtención del extracto se lavaron las hojas con agua destilada y se dejaron secar al aire durante 48 horas. Una vez secas, se sometieron a molienda en un molino de bolas hasta obtener un polvo fino, seguido de ello se pesaron distintas cantidades para la obtención de extractos de distintas concentraciones (10g/100mL de agua, 1g/100mL de agua y 1g/200mL de agua) tras la disolución de las hojas molidas en agua destilada y calentamiento a 40°C en ultrasonido durante 30 minutos. Los distintos extractos obtenidos se dejaron enfriar y se filtraron usando lana de vidrio, finalmente fueron almacenados bajo refrigeración para su utilización posterior.

4.1.2 Síntesis de las nanopartículas de hierro

La síntesis de nanopartículas de hierro se realizó considerando ciertos ajustes de los parámetros de síntesis, entre los cuales se incluyó la proporción extracto: solución precursora de hierro, donde se ensayaron proporciones 1:1, 2:1 y 1:2, la concentración del extracto, donde se probó con 10g/100mL de agua, 1g/100mL de agua y 1g/200mL de agua, y la concentración de hierro, utilizando 0,1M, 0,01M, 1mM y 5mM. El procedimiento general involucró la mezcla de extracto y solución precursora de hierro, para ser sometida a calentamiento a 40°C en ultrasonido durante 30 minutos. La

formación de nanopartículas se evidenció por la aparición del color negro en la solución y se almacenaron bajo refrigeración hasta su caracterización. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se liofilizaron las nanopartículas.

En la figura mostrada se resume el procedimiento de la síntesis de nanopartículas de hierro.

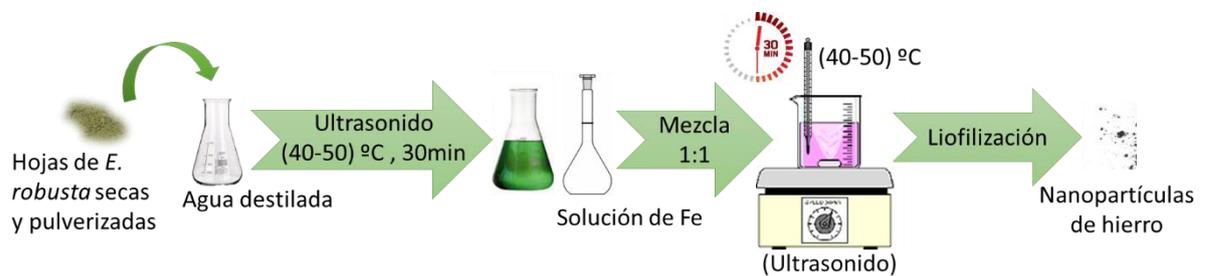


Figura 2. Esquema de metodología de síntesis de FeNPs. Fuente: elaboración propia

4.2 Caracterización de las nanopartículas de hierro

4.2.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La distribución de tamaño de las partículas fue evaluada con un equipo diseñado en el laboratorio de espectroscopía láser (Facultad de Ciencias, UCV) basado en la técnica de dispersión dinámica de la luz; el equipo consta de un láser de He-Ne de longitud de onda: 635 nm, dos polarizadores para atenuar el haz del láser, una lente para enfocar el haz sobre la muestra y un fotomultiplicador colocado a un ángulo variable respecto a la luz incidente que la convierte en corriente eléctrica. Las condiciones de trabajo fueron: longitud de onda del láser empleado 630 nm, el ángulo fue 90 °, temperatura 298 K.

4.2.2 Espectroscopía UV-vis

Las propiedades ópticas de resonancia de plasmón superficial, SPR, de las nanopartículas de hierro fueron monitoreadas mediante un espectrofotómetro *Ocean Optics* de *UV-Visible*, modelo. *LS-I* y la adquisición de datos se obtuvo con el programa *OOI Base32*, versión *2.0.1*.

4.2.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Se usó el microscopio de fuerza atómica (*Dimensions Edge*, Bruker) en CONTACT MODE para determinar el tamaño y la morfología de las FeNPs. Las condiciones del registro de medida fueron Set Point: 2.90V; P: 2,0024; I: 1,0087; D: 0.0; Muestras: 512; Líneas: 512; Velocidad de escáner: 0,7 Hz; Rango de escáner: 2.49 μm ; Punta: modelo SNL- 10.

4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos

Para determinar la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de hierro se siguió el método de difusión en agar actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, 1997), de Estados Unidos, para lo cual se usaron cultivos puros de *E. Coli*, *S. aureus*, *P. fluorescens* y *B. subtilis* provenientes del Centro Venezolano de Cultivos de Microorganismos (CVCM) y el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR). Las cepas que se usaron fueron *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC15442, *B. subtilis* ATCC 6636 y *S. aureus* ATCC 6538.

Los microorganismos fueron crecidos en Caldo Tripticasa Soya alcanzando un nivel máximo de 10^7 UFC/mL, lo cual se verificó por recuento de colonias realizando diluciones seriadas hasta obtener cultivos de 10^7 UFC/mL.

Para el método de difusión con discos en placas, se usó Agar Muller Hinton, los discos impregnados con soluciones de nanopartículas de hierro obtenidas bajo distintas condiciones de síntesis fueron colocados sobre las placas inoculadas individualmente con cada microorganismo, las cuales fueron luego incubados a 37°C x 24 horas, realizándose finalmente la medición de los halos de inhibición con un vernier, estas pruebas se realizaron por duplicado para cada microorganismo. Agua destilada fue utilizada como control negativo y el antibiótico gentamicina (0.01 g/mL) como control positivo.

A continuación se ilustra lo anteriormente descrito en dos figuras que contemplan los siguientes pasos generales:

- 1- Preparación del inóculo.
- 2- Inoculación de las placas, aplicación a los discos y lectura de las placas.

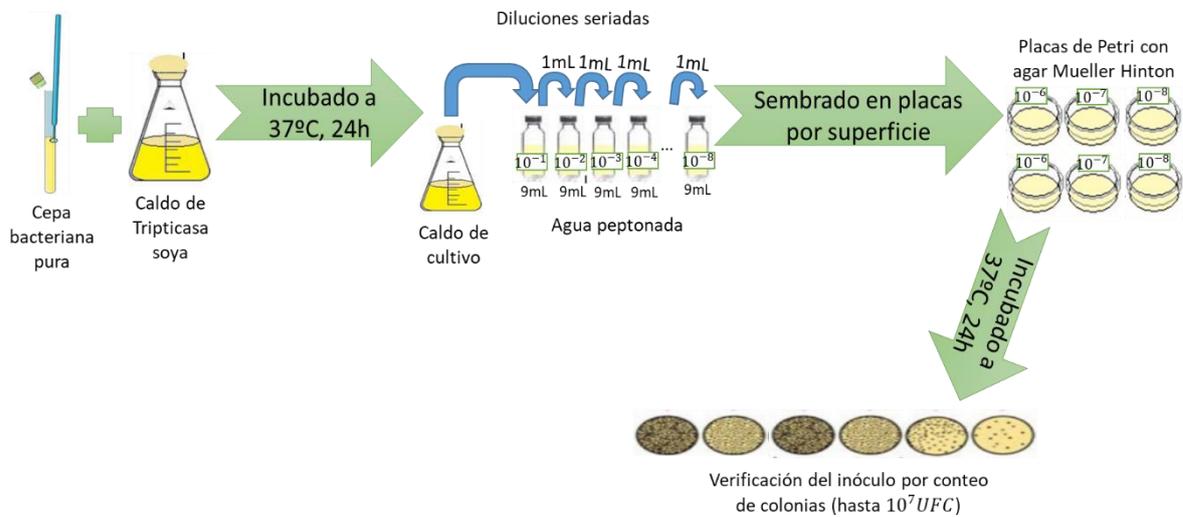


Figura 3. Metodología para preparación del inóculo. Fuente: elaboración propia.

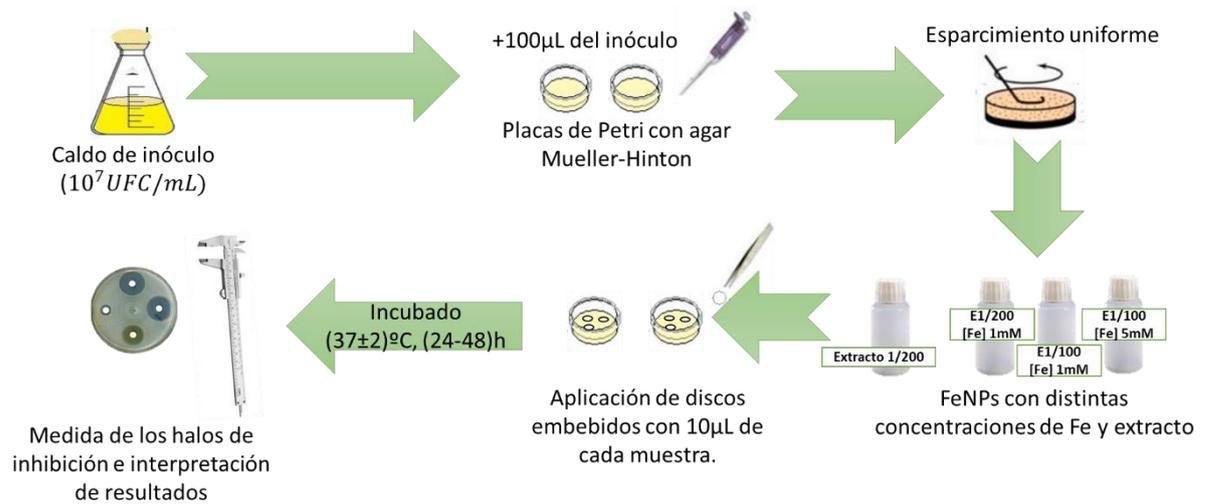


Figura 4. Metodología para inoculación de las placas, aplicación a los discos y lectura de las placas. Fuente: elaboración propia.

4.3.1 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos fueron analizados manejando el programa Statgraphics centurión XV, aplicando un análisis de varianza de una vía ANOVA, para determinar diferencias estadísticas entre las condiciones de síntesis de nanopartículas evaluadas y los microorganismos estudiados.

4.4 Caracterización del extracto acuoso de las hojas de *Eucalyptus robusta* Sm y evaluación de su actividad antioxidante

4.4.1 Fenoles totales

El contenido de fenoles totales del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta* fue determinado por espectroscopía, utilizando ácido gálico como estándar, a través del método de Folin-Ciocalteu's descrito por Medina M^[42] (2011). El procedimiento se basó en verter 50 µL del extracto diluido en un Ependorf que contenía 430 µL de agua, seguido de ello se adicionaron 20 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu's, se dejó reposar 1 min y se vertieron 50 µL de carbonato de sodio (7 % p/v) y 450 µL de agua. La mezcla se mantuvo en reposo a temperatura ambiente durante 20 minutos y la absorbancia se midió a 595 nm.

4.4.2 Flavonoides totales

El contenido total de flavonoides del extracto se determinó mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio, a través del procedimiento descrito en Lamaison J^[43], (1990) con algunas modificaciones. En resumen, 100 µL del extracto fueron mezclados con 100 µL de solución de AlCl₃ al 2% m/v y se dejó en reposo durante 10 min, posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm. El contenido total de flavonoides se calculó a partir de una curva de calibración utilizando concentraciones crecientes de quercetina, y el resultado se expresó como mg equivalentes de quercetina por g extracto.

4.4.3 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta* fue determinada mediante el ensayo de atrapamiento del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH.), descrito por Villano y col^[44] (2007) con algunas modificaciones.

Para tal fin, fueron mezclados 100 μ L del extracto con 100 μ L de etanol y 50 μ L de solución de DPPH, posteriormente fueron incubados en oscuridad a temperatura ambiente 30 min. La absorbancia de la mezcla fue registrada a 595 nm. La quercetina fue utilizada como antioxidante de referencia. La capacidad de la muestra para captar el DPPH (% de inhibición o atrapamiento) se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ atrapamiento de DPPH} = \frac{(A_i - A_t)}{A_i} \times 100\%$$

Donde A_i es la absorbancia control y A_t la absorbancia de la muestra.

4.4.4 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos fueron analizados usando el programa Prism 7 (Graph Pad, San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Ajuste de parámetros de síntesis de nanopartículas de hierro y caracterización.

La síntesis de nanopartículas a partir de extractos vegetales no sigue un procedimiento único sino que por el contrario se han propuesto diferentes rutas para la obtención de estas, por ejemplo, se ha dicho que para la estabilidad de las nanopartículas se requiere una duración de incubación óptima para completar la nucleación^[45] por lo que en muchos procesos de síntesis verde a partir de extractos vegetales se incluye como parte del procedimiento un tiempo que por lo general oscila entre 10 y 120 minutos durante el cual se somete la mezcla de reacción conformada por el extracto vegetal y la solución precursora del metal a temperaturas entre 40°C y 100°C [11, 33, 34]. Sin embargo, también se ha dicho que la reacción suele ocurrir espontáneamente a temperatura ambiente y que la velocidad de reacción es rápida y generalmente se completa en pocos minutos [12, 46].

Con lo anteriormente expuesto, pudiese interpretarse el suministro de energía a través de la incubación, planteada anteriormente como requisito durante la síntesis de nanopartículas, como un catalizador opcional de la reacción de formación de nanopartículas, tomando entonces para efectos de la presente investigación un tiempo de calentamiento y temperatura que estuviesen lo más cercano al extremo inferior del rango de oscilación general de dichos parámetros, quedando los mismos en 30 minutos y una temperatura entre (40-50)°C.

Además, se incluyó un equipo de ultrasonido, que según algunos estudios es capaz de acelerar reacciones químicas y compensar el uso de condiciones menos severas de temperatura y presión. Las condiciones drásticas que genera la compresión y expansión de una burbuja de cavitación producto del choque de las ondas acústicas

en la fase gaseosa de la burbuja, conduce la posibilidad de disminuir el tamaño de partícula de los sólidos obtenidos, ventaja que es muy importante ya que conduce al aumento de la superficie de contacto que se traduce en el aumento de la actividad de la partícula ^[47].

Por otra parte, se ha dejado claro que la naturaleza del extracto de la planta, su concentración, la concentración de la sal metálica, la temperatura y el tiempo de contacto afectan la velocidad de producción de las nanopartículas, su cantidad y otras características ^[43], lo que es evidenciado en las diferentes rutas sintéticas de nanopartículas a partir de extractos vegetales que plantean distintos investigadores, donde el uso de concentraciones y proporciones tanto de extracto como de solución precursora del metal suelen variar cuando se modifica el género de la planta^[33, 34, 27, 36, 37] e incluso la especie, dentro del mismo género^[33, 48], lo cual pudiese ser consecuencia de la composición fitoquímica variable ^[49], por lo que se realizaron diferentes ensayos en función de los siguientes parámetros.

- ✓ Concentración del extracto
- ✓ Concentración de la solución precursora de hierro
- ✓ Proporción solución de hierro : extracto

En la siguiente tabla se presentan las diferentes condiciones de síntesis ensayadas experimentalmente.

Tabla 1. Condiciones usadas en el ajuste de parámetros de la síntesis de nanopartículas de hierro.

| Condición de síntesis | Concentración del extracto (g hojas / mL agua) | Concentración Fe (M) | Proporción (Fe:Extracto) |
|-----------------------|--|----------------------|--------------------------|
| c1 | 10/100 | 0,1 | 1:1 |
| c2 | 10/100 | 0,1 | 2:1 |
| c3 | 1/100 | 0,1 | 1:1 |
| c4 | 1/200 | 0,1 | 1:1 |
| c5 | 1/200 | 0,1 | 1:2 |
| c6 | 1/200 | 0,1 | 2:1 |
| c7 | 1/200 | 0,01 | 1:1 |
| c8 | 1/200 | 0,001 | 1:1 |
| c9 | 1/100 | 0,001 | 1:1 |
| c10 | 1/100 | 0,005 | 1:1 |

Al mezclar la solución de hierro con el extracto acuoso de *E. robusta* se observó un cambio inmediato de color, tornándose la solución de color negro, lo que indicó la reducción del Fe^{2+} a Fe^0 , que se asocia a la reacción de obtención de las nanopartículas de hierro ^[50], además, la permanencia del color negro indica que no sufrieron oxidación ^[51]. Sin embargo, las condiciones c1, c2 y c3 no pudieron ser medidas por DLS debido a que se encontraba muy concentrada la solución que contenía las nanopartículas redispersas, hecho que sugiere posibles hipótesis en las que por un lado se plantea, con base en la concentración del extracto, que al ser alta dicha concentración hubo un exceso de nanopartículas con poca estabilidad y en consecuencia se aglomeraron, provocando una distribución de tamaños que en su mayoría estuvo muy por encima de la escala nano, y, por otro lado, con base en la concentración del extracto usada para el caso de c1 y c2, que la elevada concentración de los metabolitos secundarios de la planta pudo haber ocasionado la aglomeración de las nanopartículas recubiertas por los grupos estabilizadores que

contienen las plantas entre los que se encuentran mayormente las proteínas^[11], que suelen ser moléculas volúminosas.

En respuesta a la última hipótesis planteada se disminuyó 10 veces la concentración del extracto, obteniendo de igual forma un producto fuera de la escala nano que no pudo ser medido por DLS, por ende se diluyó a la mitad la concentración del extracto usado en c3 y se probaron distintas proporciones solución de hierro : extracto manteniendo la concentración de hierro en 0,1M.

Las últimas variaciones mencionadas estuvieron enmarcadas por los experimentos c4, c5 y c6, donde se obtuvieron las siguientes respuestas ante el análisis de DLS.

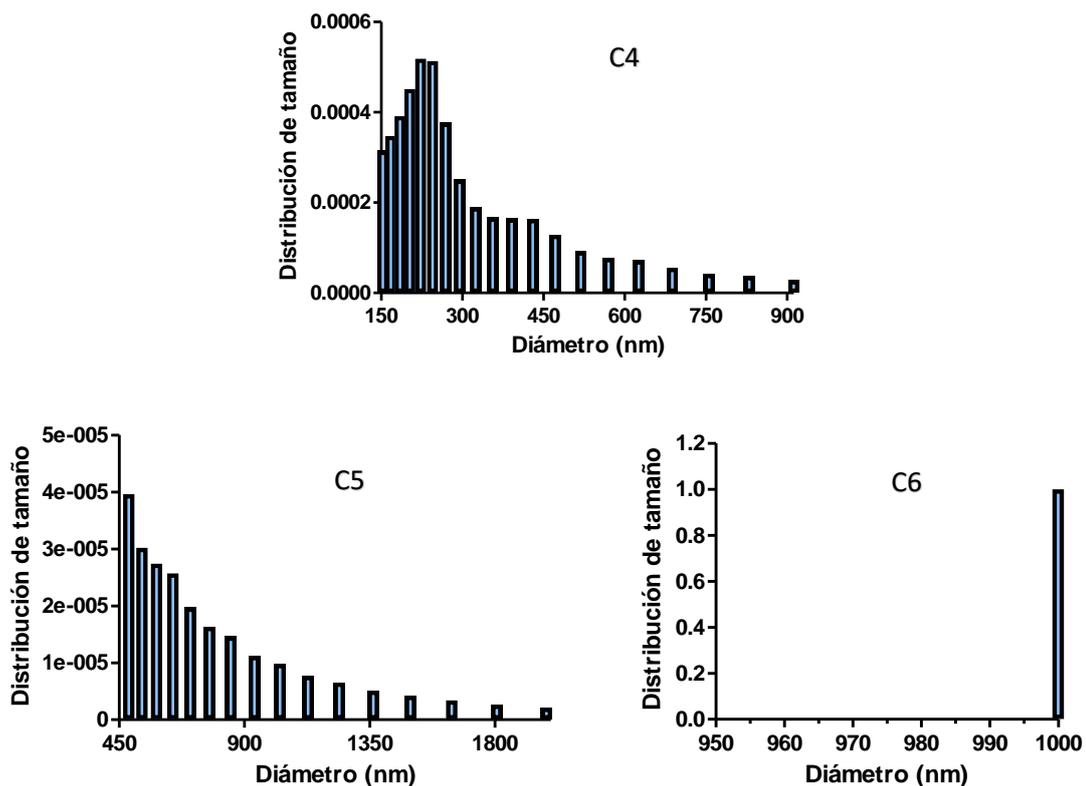


Gráfico 1. Distribución de tamaño vs Diámetro de nanopartículas de hierro elaboradas a partir de c4([Fe] 0,1M, [extracto] 1g/200mL, [Fe]: [extracto] 1:1), c5([Fe] 0,1M, [extracto] 1g/200mL, [Fe]: [extracto] 1:2) y c6([Fe] 0,1M, [extracto] 1g/200mL, [Fe]: [extracto] 2:1).

Se puede observar que la distribución de tamaño de partículas más pequeña fue la obtenida para el experimento c4, donde la proporción solución de hierro : extracto fue 1:1, mientras que la distribución de tamaño más alejada del límite de la escala nano (100nm) fue la obtenida para el experimento c6, donde la proporción era 2:1, por lo que se dejó el parámetro proporción fijo en 1:1 (Gráfico 1, tabla 1).

Puesto que el experimento c4 mostró una distribución de tamaño de partículas sobre los 150nm, se optó por bajar la concentración de hierro a 0,01M mediante el ensayo c7, obteniendo como resultado la distribución de tamaño que se muestra en el gráfico 2, con este resultado se pudo evidenciar la existencia de partículas en la nanoescala con la condición de síntesis c7, donde se utilizó una concentración de extracto de 1g/200mL, una solución de hierro de concentración 0,01M y proporción 1:1.

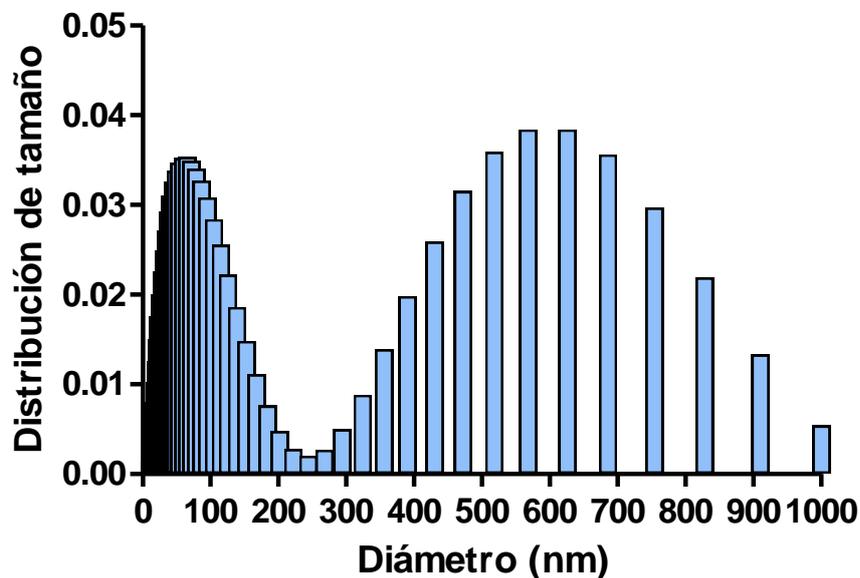


Gráfico 2. Distribución de tamaño vs Diámetro de nanopartículas de hierro elaboradas a partir de c7 ([Fe] 0,01M, [extracto] 1g/200mL, [Fe]: [extracto] 1:1).

En vista del comportamiento observado al disminuir la concentración de la solución precursora de hierro, se realizó un experimento c8 dejando la concentración de extracto en 1g/200mL y disminuyendo la concentración de hierro a 1mM. El resultado de este experimento se presenta en el gráfico 3.

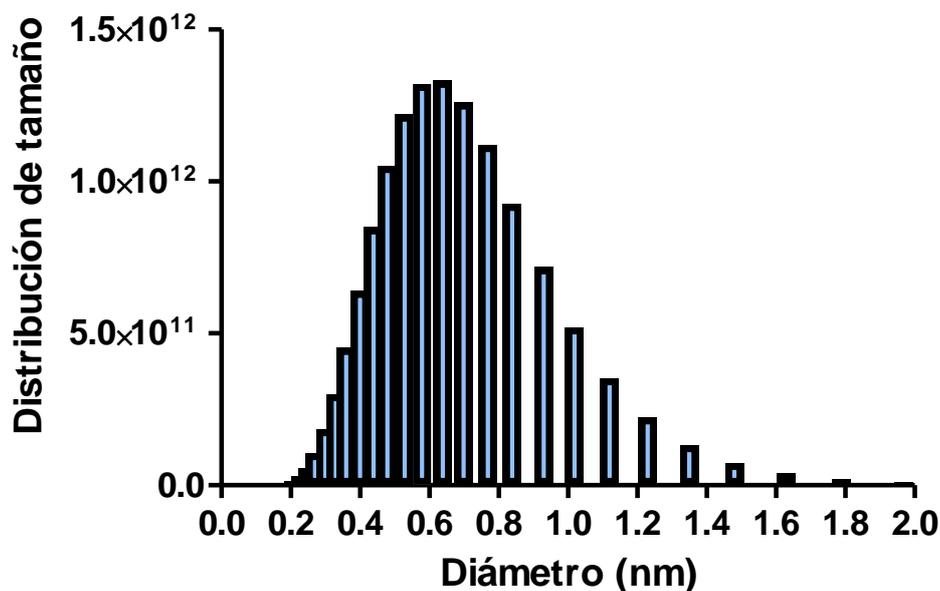


Gráfico 3. Distribución de tamaño vs Diámetro de nanopartículas de hierro elaboradas a partir de c8 ([Fe] 1mM, [extracto] 1g/200mL, [Fe]: [extracto] 1:1).

En el gráfico 3 se observa una distribución de tamaño de partícula que en su mayoría se encuentra por debajo de 1nm, lo que significa una síntesis de nanopartículas muy estables y permite entonces establecer como parámetros fijos para la obtención de nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de hojas de *E. robusta* Sm los siguientes.

- ✓ Concentración del extracto; 1g de hojas en 200mL de agua.
- ✓ Concentración de la solución precursora de hierro; 1mM.
- ✓ Proporción solución de hierro: extracto; 1:1.

Sin embargo, desde el experimento c4 hasta este último (c8) se varió solo la concentración de hierro y, en consecuencia, se dejó fija la concentración del extracto, por lo que se realizó el experimento c9, donde se aumentó la concentración del extracto a 1g de hojas en 100mL. Esto con la finalidad de estudiar los límites que rigen la síntesis eficiente (en cuanto al tamaño de partícula) de nanopartículas cuando se parte del extracto acuoso de hojas de *E. robusta*.

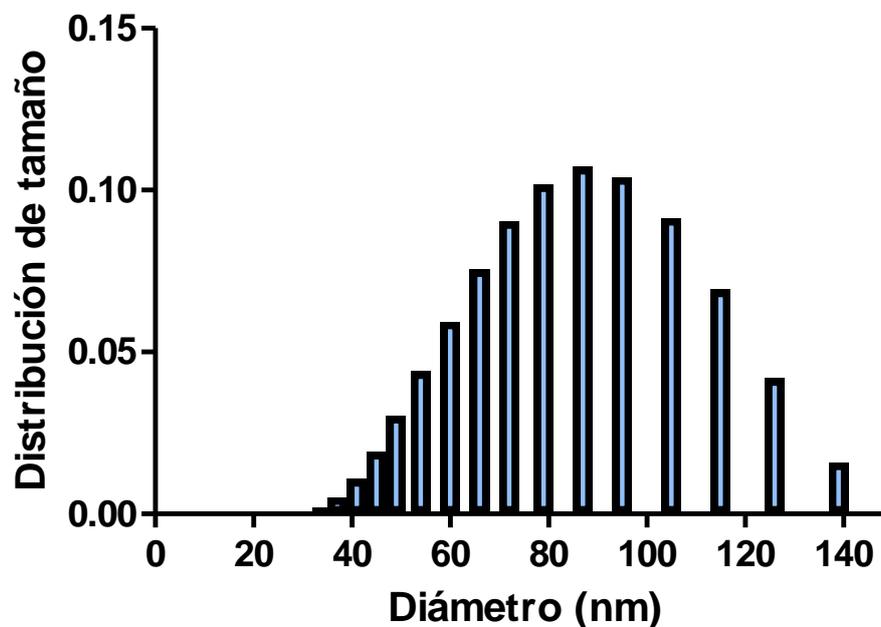


Gráfico 4. Distribución de tamaño vs Diámetro de nanopartículas de hierro elaboradas a partir de c9 ([Fe] 1mM, [extracto] 1g/100mL, [Fe]: [extracto] 1:1).

Del experimento c9 se obtuvo que las partículas presentaron una distribución de tamaño entre 40 y 140 nm, con un tamaño promedio alrededor de los 90 nm, por lo que se pueden tomar las condiciones de este experimento para evaluar las

propiedades de un segundo grupo de nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta*. Las condiciones de síntesis fueron:

- ✓ Concentración del extracto; 1g de hojas en 100mL de agua.
- ✓ Concentración de la solución precursora de hierro; 1mM.
- ✓ Proporción solución de hierro: extracto; 1:1.

Teniendo entonces dos condiciones de síntesis favorables donde se puede observar el efecto sobre el tamaño de partícula obtenido al dejar fija la concentración de la solución de hierro y aumentar la concentración del extracto, se decidió probar, a modo de comparación, un último experimento (c10) donde se dejó fija la concentración del extracto en 1g de hojas / 100mL y se aumentó la concentración de la solución de hierro a 5mM.

La intención de llevar la concentración de hierro a 5mM fue marcar los límites en cuanto a la concentración de la solución del metal que publicaron García y col. en 2004, describiendo la síntesis verde de nanopartículas como un proceso redox en el que se ponen en contacto extractos vegetales con una solución de concentración entre 1 y 5 mM de iones de metales para que el potencial reductor de los compuestos contenidos en el extracto o compuesto bioquímico lleve a cabo la reacción indicada en la ecuación (I) (Ver página 7) ^[11].

En el gráfico 5, se presenta la distribución de tamaño en función del diámetro de partícula obtenido para el experimento c10. Se observa que existe una distribución de tamaño asimétrica o bimodal, con partículas inferiores a 60nm y por otro lado agrupaciones más grandes centradas alrededor de los 220nm.

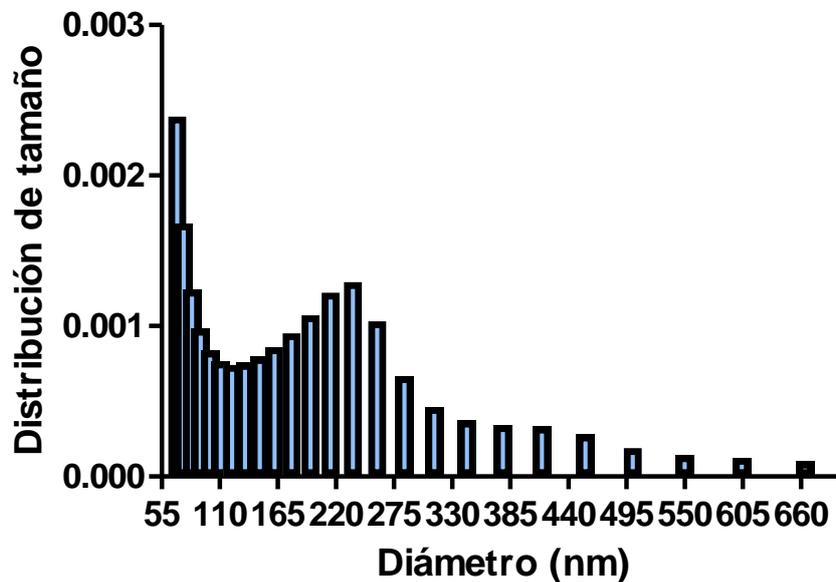


Gráfico 5. Distribución de tamaño vs Diámetro de nanopartículas de hierro elaboradas a partir de c10 ([Fe] 5mM, [extracto] 1g/100mL, [Fe]: [extracto] 1:1).

A pesar de haber obtenido una distribución de tamaño de partícula alejada de los 100nm, se tomó como una tercera condición para la síntesis de nanopartículas a partir del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta* agrupando los parámetros de la siguiente manera.

- ✓ Concentración del extracto; 1g de hojas en 100mL de agua.
- ✓ Concentración de la solución precursora de hierro; 5mM.
- ✓ Proporción solución de hierro: extracto; 1:1.

En la tabla 2 se agrupan las 3 condiciones de síntesis que se utilizaron para evaluar las propiedades de las nanopartículas obtenidas.

Tabla 2. Condiciones de síntesis favorables para la síntesis de nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de hojas de *E. robusta*.

| Condición de síntesis | Concentración del extracto (g hojas / mL agua) | Concentración Fe (mM) | Proporción (Fe:Extracto) |
|-----------------------|--|-----------------------|--------------------------|
| c8 | 1/200 | 1 | 1:1 |
| c9 | 1/100 | 1 | 1:1 |
| c10 | 1/100 | 5 | 1:1 |

En el gráfico 6 se presenta el espectro UV-visible obtenido para las nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta*, donde se observa una banda de absorción entre longitudes de onda 250nm y 370nm con un máximo alrededor de los 280 nm. Esta banda corresponde a la resonancia de plasmon superficial típica de las nanopartículas de hierro, la cual coincide con la reportada por algunos autores; por debajo de los 300nm, asociando dichas desviaciones leves en los valores máximos de absorción al tamaño de partícula, el cual suele influir en el desplazamiento de la banda SPR. La banda de resonancia del plasmón superficial de las nanopartículas de hierro suele estar reportada en la literatura en un rango de 300nm a 500nm, que es idéntica a las características de análisis espectral UV-vis para el hierro metálico [52].

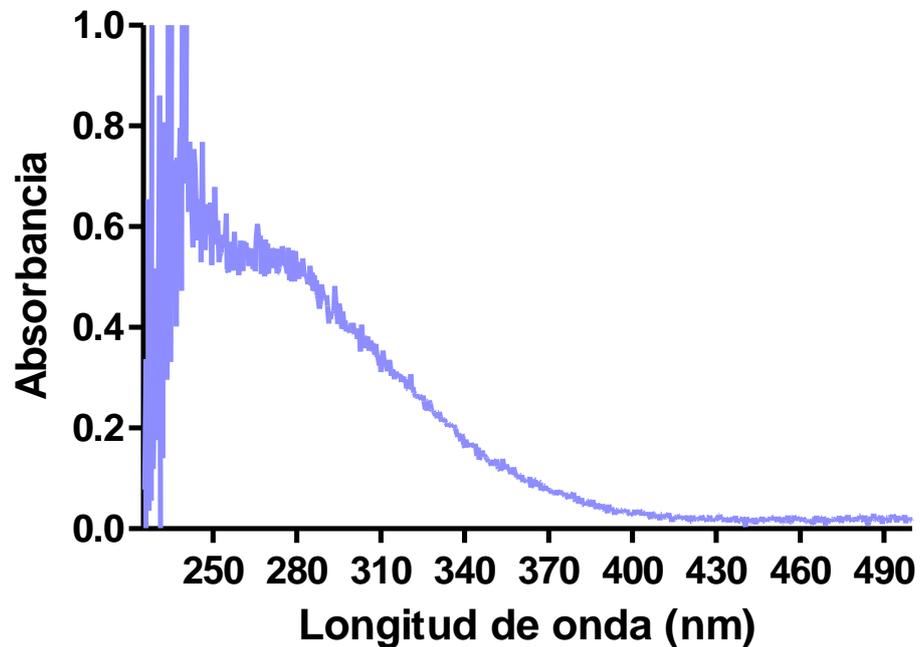


Gráfico 6. Espectro UV visible de nanopartículas de hierro obtenidas a partir del extracto acuoso de hojas de *E. robusta*.

Por último en cuanto a la caracterización de las nanopartículas, se usó AFM para evaluar la morfología y el tamaño de las mismas. Las nanopartículas de hierro ilustradas en la imagen AFM exhiben forma esférica (Figura 5). Se observan nanopartículas individuales así como aglomeradas. El diámetro de las FeNPs es de aproximadamente 8 nm, de acuerdo con el perfil de altura. El ancho era de alrededor de 70 nm, este valor es demasiado grande y en este caso podría atribuirse al proceso de aglomeración de las nanopartículas, esto puede ocurrir durante el proceso de deposición sobre el sustrato o durante la síntesis ^[53].

Este resultado presenta concordancia con el obtenido por DLS, donde las variables de síntesis determinan el tamaño final de las nanopartículas.

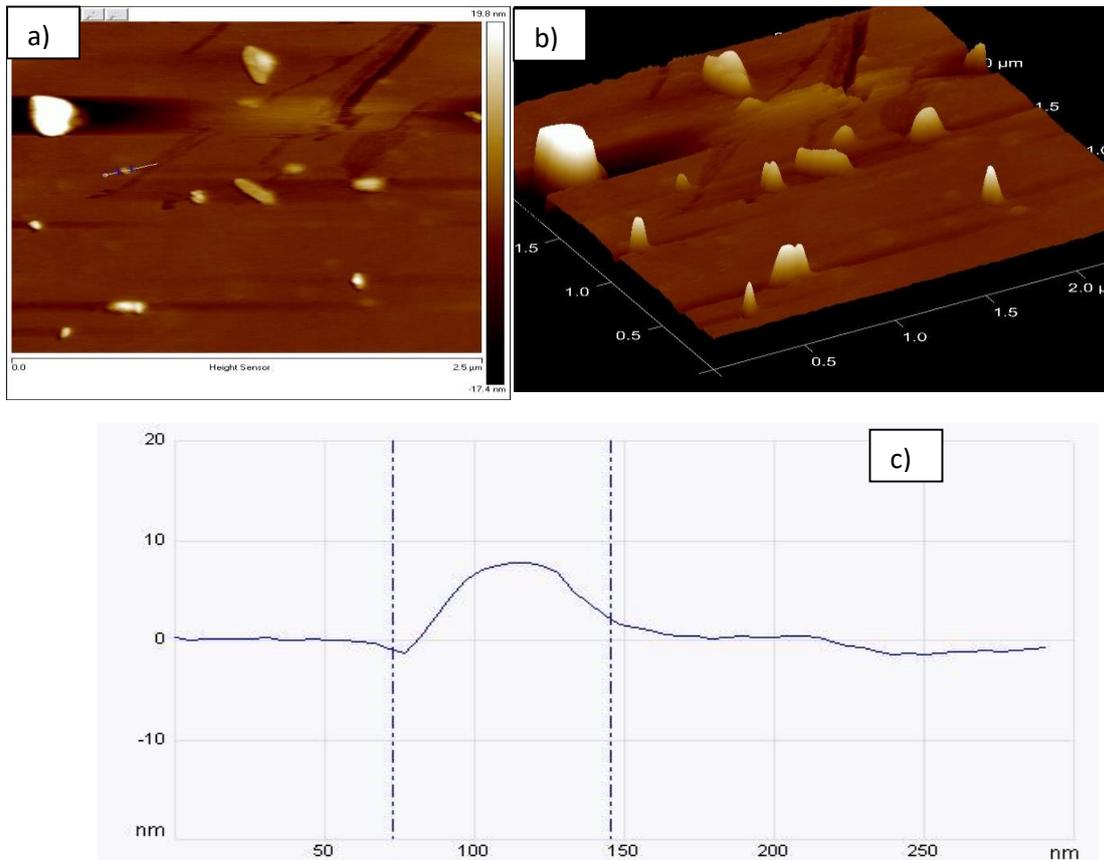


Figura 5. a) Imagen AFM de FeNPs obtenidas bajo [Fe] 1mM, [E. robusta] 1g/200mL, [Fe]: [extracto] 1:1. b) Representación 3D. c) Perfil de altura a lo largo de la línea indicada en a.

5.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos

El comportamiento de diferentes microorganismos frente a nanopartículas de hierro sintetizadas a partir del extracto acuoso de *E. robusta* fue evaluado y a continuación se presentan los resultados obtenidos en la Tabla 3.

Tabla 3. Comportamiento de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis*, frente a nanopartículas de hierro obtenidas a partir de *E. robusta* usando diferentes concentraciones de hierro y extracto en proporción 1:1.

| Muestra | <i>E. coli</i> (mm) | <i>S. aureus</i> (mm) | <i>P. aeruginosa</i> (mm) | <i>B. subtilis</i> (mm) |
|--------------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Extracto <i>E. robusta</i> | 1,10 ± 0,10 aA | 1,15 ± 0,05 aA | 0,45 ± 0,05 aA | 3,60 ± 0,40 aB |
| FeNPs c8 | 1,60 ± 0,40 aA | 1,90 ± 0,10 aA | 1,00 ± 0,00 bA | 5,05 ± 0,05 aB |
| FeNPs c9 | 1,35 ± 0,15 aA | 1,00 ± 0,00 bA | 0,60 ± 0,00 cA | 4,00 ± 0,00 aB |
| FeNPs c10 | 1,75 ± 0,25 aA | 1,75 ± 0,25 bA | 1,00 ± 0,00 cA | 3,90 ± 0,10 bB |
| Control I (+) Gentamicina | 4,00 ± 0,05 bA | 5,00 ± 0,10 cA | 2,85 ± 0,15 dA | 7,00 ± 0,10 cB |
| Control II (-) | 0,00 ± 0,00 cA | 0,00 ± 0,00 dA | 0,00 ± 0,00 eA | 0,00 ± 0,00 dB |

Agua destilada

C8 hace referencia a las nanopartículas sintetizadas con [Fe] 1mM [extracto] 1g/200mL, c9 a [Fe] 1mM [extracto] 1g/100mL y c10 a [Fe] 5mM [extracto] 1g/100mL. Los valores representan el promedio de dos determinaciones ± el error estándar. Letras minúsculas diferentes en una misma columna, representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para la actividad inhibitoria respecto a las distintas muestras sobre un determinado microorganismo. Letras mayúsculas diferentes entre distintas columnas, representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en cuanto a la actividad inhibitoria de las muestras entre microorganismos.

Todas las condiciones evaluadas ([Fe] 1mM [extracto] 1g/100mL; [Fe] 5mM [extracto] 1g/100mL; [Fe] 1mM [extracto] 1g/200mL) mostraron actividad antimicrobiana frente a los diversos microorganismos ensayados (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis*). Sin embargo, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) fueron encontradas para la actividad inhibitoria sobre cada microorganismo respecto a las distintas condiciones estudiadas, siendo c8 y c10 las que mostraron mayor inhibición de los microorganismos (Tabla 3).

Por otra parte, al comparar la actividad inhibitoria de las muestras entre los cuatro microorganismos evaluados, se encontró que existen diferencias estadísticamente

significativas ($p < 0,05$) en cuanto al comportamiento de cada microorganismo, así tenemos que, las condiciones estudiadas, mostraron mayor poder antimicrobiano sobre el *B. subtilis*, no obstante, no fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) para los microorganismos *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* evidenciándose una actividad antimicrobiana moderada de las muestras sobre ellos (Tabla 3, Gráfico 7).

El comportamiento observado sugiere que se hace significativa la relación de tamaños al llevar a escala nano y por ende que posiblemente el mecanismo de acción antimicrobiana tenga que ver con algún tipo de penetración celular donde el tamaño de partícula juega un papel fundamental, recordando que las nanopartículas c8 fueron las que exhibieron el menor tamaño.

Por su parte, el tipo de nanopartícula de hierro obtenida, también pudiese estar teniendo influencia en el comportamiento observado tras la evaluación de la actividad antimicrobiana, ya que las nanopartículas de óxido de hierro exhiben poder antimicrobiano de por sí y que el mecanismo de síntesis de nanopartículas de hierro a partir de extractos vegetales no sigue una ruta esclarecida, es decir, no se asegura la completa obtención de nanopartículas de hierro cerovalentes, puesto que se han reportado bajo una misma ruta sintética NPs de hierro cerovalente, de óxidos de hierro y mezcla de ambas ^[12].

De lo anterior se deja entonces en evidencia que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de hierro sintetizadas a partir del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta* tiene una relación estrecha con la condición de síntesis, ya que esta última influye directamente sobre el tamaño y tipo de partícula a obtener.

Asimismo, vale resaltar que la actividad antimicrobiana ha sido relacionada en distintas investigaciones al contenido de fenoles y flavonoides de la planta. Los metabolitos secundarios mencionados son también responsables de la actividad antioxidante, por tal razón, más adelante se somete a caracterización el extracto acuoso de *E. robusta*, en el que se cuantifican fenoles y flavonoides totales.

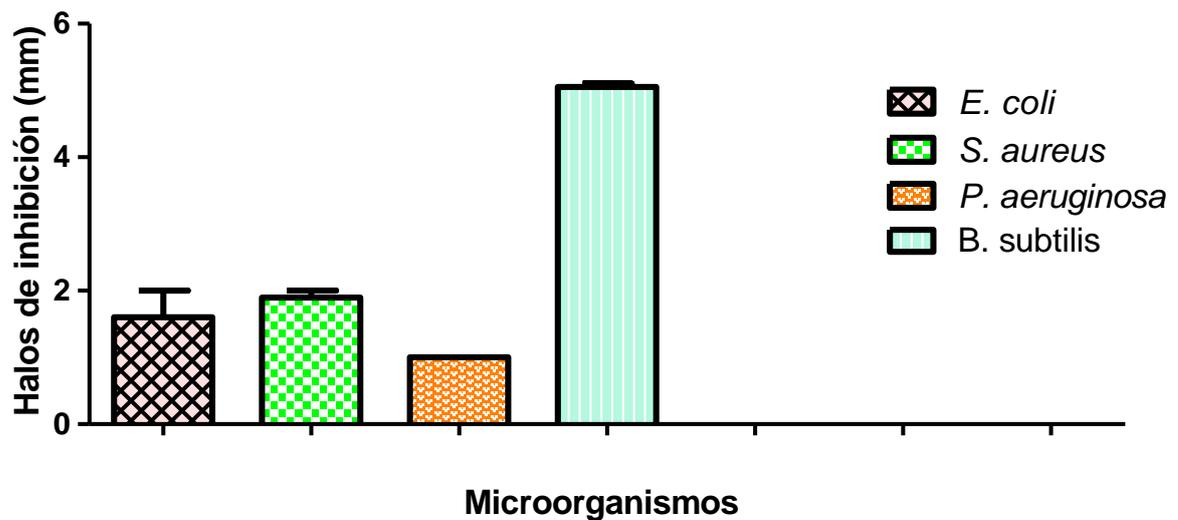


Gráfico 7. Comportamiento de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* frente a las nanopartículas de hierro obtenidas a partir de c8.

El comportamiento antimicrobiano observado sobre el *B. subtilis*, tiene concordancia con lo presentado en el trabajo de Carrillo, M., y col., donde se observó la inhibición de microorganismos en tortillas de maíz fortificadas con nanopartículas de hierro, sabiendo que el género *Bacillus* suele estar asociado a las harinas y es capaz de producir deterioro e incluso enfermedad en el caso de la especie *B. cereus*. Este resultado podría destacarse en futuras aplicaciones de las nanopartículas de hierro sintetizadas a partir de extracto de *E. robusta*.

5.3 Caracterización del extracto acuoso de las hojas de *Eucalyptus robusta* Sm y evaluación de su actividad antioxidante

Las referencias bibliográficas consultadas^[13, 22, 52] responsabilizan de la actividad antimicrobiana en extractos vegetales acuosos a los fenoles y flavonoides, por tal razón se presenta a continuación la cuantificación de fenoles y flavonoides totales del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta*.

Tabla 4. Fenoles y flavonoides totales del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta*.

| | |
|---|----------------------|
| Fenoles totales (mg Eq Ac. Gálico / g) | 158,47 ± 0,64 |
| Flavonoides totales (mg Eq Quercetina / g) | 131,12 ± 4,49 |

* Los valores representan el promedio de cuatro determinaciones ± el error estándar.

El resultado confirma la presencia de derivados fenólicos y flavonoides, que están asociados a la actividad antimicrobiana ^[52], lo que podría terminar de adjudicarle la mayor responsabilidad al extracto como dador de dicha actividad a las nanopartículas sintetizadas a partir del mismo. Además, estos metabolitos secundarios son esenciales para la capacidad de eliminación de radicales libres ^[50], que suele estudiarse como actividad antioxidante y a la que se le ha asociado importancia medicinal. En este sentido se presenta a continuación la evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso de *E. robusta* usando como antioxidante de referencia la quercetina.

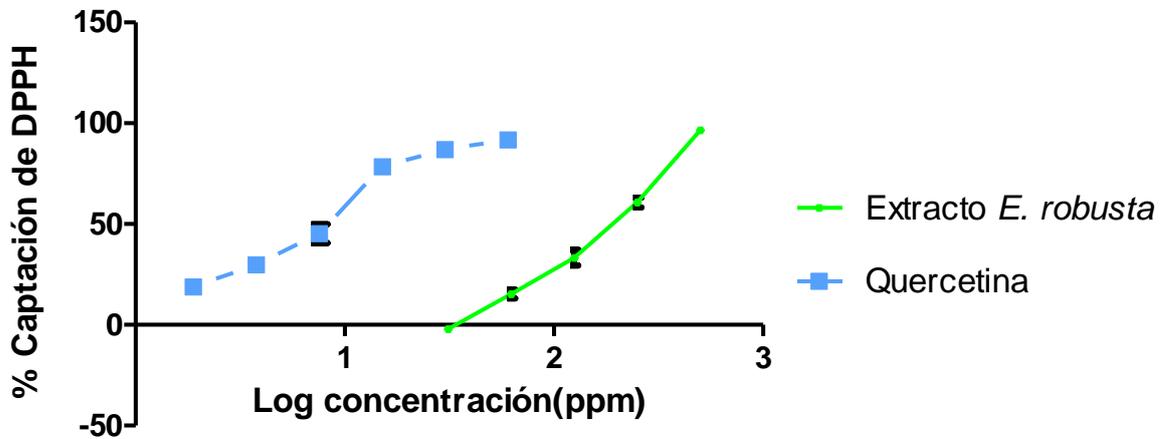


Gráfico 8. Captación de DPPH del extracto acuoso de hojas *E. robusta* (1g hojas/200mL agua). La quercetina fue utilizada como antioxidante de referencia.

El radical DPPH· fue captado por el extracto acuoso de las hojas de *E. robusta* en concentración de 1g hojas/200mL agua, la menor concentración probada en las condiciones de síntesis implementadas, lo que sugiere que la condición de síntesis en la que se usó como concentración de extracto 1g hojas/100mL agua pudo haber exhibido una mayor capacidad antioxidante, puesto que la misma depende de la concentración [54]. Por otro lado, se obtuvo que la concentración media inhibitoria del extracto fue $IC_{50} = 423,14 \pm 73,27 \mu\text{g} / \text{mL}$. En comparación con una fuerte capacidad antioxidante comparable a la del ácido ascórbico, obtenida en estudios previos, el nivel de fenoles totales fue de 407 mg equivalentes de ácido gálico / g en el extracto acuoso de hojas de *E. robusta* bajo un procedimiento de extracción óptimo [55].

Sin embargo, la actividad antioxidante del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta* ha sido poco estudiada.

Los resultados de esta investigación pueden ser un punto de partida para el desarrollo en la producción de nanopartículas con un gran potencial para la eliminación de radicales libres y, por lo tanto, poder ser utilizado contra diferentes procesos del estrés oxidativo asociado a enfermedades degenerativas, sin dejar atrás el poder

antimicrobiano que estas nanopartículas exhiben, que pudiese ser aprovechado en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

6. CONCLUSIONES

- ✿ En la síntesis de nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de hojas de *E. robusta*, las condiciones de síntesis están estrechamente relacionadas al tamaño de partícula que se obtiene.
- ✿ Se encontraron tres condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta*, siendo estas las siguientes:
 - a) [Fe] 1Mm / [Extracto] 1/100 g hojas / mL agua
 - b) [Fe] 5Mm / [Extracto] 1/100 g hojas / mL agua
 - c) [Fe] 1Mm / [Extracto] 1/200 g hojas / mL agua.
- ✿ El extracto acuoso de las hojas de *E. robusta* presentó, tanto actividad antimicrobiana como inhibición del radical DPPH, lo que puede estar relacionado con el contenido de flavonoides y fenoles del extracto, pues a estos se les atribuye actividades antimicrobiana y antioxidante.
- ✿ Las nanopartículas de hierro presentaron actividad antimicrobiana frente a los microorganismos *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* y *B. subtilis*.
- ✿ Se evidenció una mayor sensibilidad a las nanopartículas del microorganismo *B. subtilis*, seguida por *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.
- ✿ Las condiciones de síntesis evaluadas mostraron nanopartículas con diferentes tamaños, asimismo, la actividad antimicrobiana de las distintas nanopartículas obtenidas exhibieron diferencias, siendo mayor la actividad antimicrobiana para las nanopartículas de menor tamaño, lo que sugiere que las condiciones de síntesis tienen una estrecha relación con la actividad antimicrobiana.

- ❖ La cuantificación de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto acuoso de las hojas de *E. robusta* fue de $158,47 \pm 0,64$ mg equivalentes de ácido gálico/ g y $131,12 \pm 4,49$ mg equivalentes de quercetina/ g respectivamente.
- ❖ La concentración media inhibitoria del extracto fue $IC_{50} = 423,14 \pm 73,27$ μ g / mL.

7. RECOMENDACIONES

- ❖ Explorar más a detalle las condiciones de síntesis de nanopartículas de hierro a partir del extracto acuoso de las hojas de *E. robusta* para lograr una mejor optimización.
- ❖ Realizar otros análisis de caracterización para discernir si se está en presencia de nanopartículas de hierro cerovalente, óxidos de hierro o mezcla de ambas y así esclarecer lo conseguido tras la evaluación de la actividad antimicrobiana.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Chamé, K. (2013). Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Magnéticas (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones en Óptica, A. C., México. Páginas 21-30.
- [2] Zanella, R. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*. 2012; Volumen 5 (1): Páginas 70-75.
- [3] Mahendra R, Nelson D. *Metal Nanoparticles in Microbiology*, Editorial Springer Heidelberg Dordrecht London New York. 2011. Páginas 2-5.
- [4] Ávalos, A., Haza, A., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense De Ciencias Veterinarias*, 7(2), 1-23. [Consultado el 12 de Junio de 2019] Disponible en https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2013.v7.n2.43408
- [5] Morteza Mahmoudi, Sophie Laurent. *Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: Synthesis, Functionalization and Application*, Editorial Elsevier, Estados Unidos. 2018. Páginas 3-5.
- [6] Borregales L, et al. *Primer Consenso Venezolano de Infección Urinaria*, Editorial ATEPROCA C.A., Caracas, Venezuela. 2011. Página 3.
- [7] Brenda AR, Francisco CF, Oscar CL, José CB, Mario CA, Miguel E, et al. *Preguntas y Respuestas Sobre El Mundo Nano*, Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNyN-UNAM), Ensenada, Baja California. 2008. Página 2.
- [8] Jose R. Peralta-Videaa, Lijuan Zhao, Martha L. Lopez-Moreno, Guadalupe de la Rosa, Jie Hong, Jorge L. Gardea-Torresdey. *Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010*. *Journal of Hazardous Materials*. 2011 [consultado el 02 de Abril de 2018] Volumen 186 (1) Páginas 5-6. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389410014305>

- [9] Merian, E. and T. W. Clarkson. Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis, and biological relevance, WILEY-VCH. 1991.
- [10] Pradeep, T., Anshup. Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review. Thin Solid Films, India. 2009 [consultado el 02 de Abril de 2018] Volumen 517 (24), Páginas 6441-6478. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004060900900683X>
- [11] Morales-Díaz, A., et al. Biofabricación de nanopartículas de metales usando células vegetales o extractos de plantas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, vol. 7, núm. 5, junio-agosto, 2016, pp. 1211- 1224. [Consultado el 18 de Mayo de 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263146723020>
- [12] Alireza Ebrahiminezhad et al. Plant-Mediated Synthesis and Applications of Iron Nanoparticles. Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2017. [consultado el 12 de Abril de 2018] Molecular Biotechnology <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0053-4>
- [13] Jhon J. W. Coppen. Eucalyptus, the genus *Eucalyptus*. Taylor & Francis Group. London. 2002. Páginas 7, 110-114.
- [14] Hoyos F., Jesús. Guía de Árboles de Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N°32, Caracas, Venezuela. 1994. Página 384.
- [15] Rouessac, F., Rouessac, A. Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques, Wiley Editorial, Second Edition. University of Le Mans, France. 2007. Páginas 167-169.
- [16] Cruz, D., et al. Nanopartículas Metálicas y Plasmones de Superficie: Una Relación. España. Av. cien. ing.: 3(2), 67-78 (Abril/Junio, 2012).
- [17] Nuevas tecnologías y materiales [Internet]. España: Cornejo; 2015 [consultado el 28 de mayo de 2019]. Resonancia del plasmón de la superficie (RPS); propiedades optoelectrónicas. Disponible en: <http://nuevatecnologiasymateriales.com/resonancia-del-plasmon-de-la-superficie-rps-propiedades-optoelectronicas/>

- [18] Tański, T., et al. Atomic-force Microscopy and Its Applications. ItenchOpen. Pp 27-29. 2019. Londres.
- [19] Pedraza, P., Castellanos H. (2009). Estudio Comparativo De Actividad Antimicrobiana De Diferentes Presentaciones Comerciales De Antibióticos De Administración Intravenosa A Través De Métodos In Vitro (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. Páginas 6, 13-19.
- [20] J. Calvo, L. Martínez-Martínez. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; [consultado el 20 de Junio de 2018] 27(1): 44–52. Disponible en <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-accion-los-antimicrobianos-S0213005X08000177>
- [21] Morales, M. Antimicrobianos: Una revisión sobre mecanismos de acción y desarrollo de resistencia. Acta Médica Costarricense [consultado el 20 de Junio de 2018] Vol. 28: No. 2: 79 – 83. Disponible en <http://www.binasss.sa.cr/revistas/amc/v28n2/art3.pdf>
- [22] García Ruiz, M. I. (2004). Inhibición de *aspergillus parasiticus* y *penicillium digitatum* con mezclas sinérgicas de antimicrobianos naturales y sintéticos en sistemas modelo de puré de manzana mínimamente procesado. (Tesis de grado). Universidad de las Américas Puebla. Capítulo 4: Revisión bibliográfica, sección 4.3.3 Antimicrobianos derivados de plantas.
- [23] Soriano, E., Salgado, C., et al. Patogenia microbiana: Conceptos básicos en la interacción hospedero-microorganismo, Vet. México. 2006 [consultado el 08 de Abril de 2018] Volumen 37 (4) Páginas 457-465. Disponible en <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2006/vm064e.pdf>
- [24] Brooks, G., et al. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. Mc Graw Hill. 25ª edición. México. 2011. Página 36.

- [25] Curiosoando.com [Internet]. España: Cornejo; 2015 [actualizado 31 de julio 2018, consultado el 25 de mayo de 2019]. "¿Qué es una bacteria Gram positiva?" Disponible en: <https://curiosoando.com/que-es-una-bacteria-gram-positiva>
- [26] Ramírez, L., et al. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* Año XV, N8 42, Agosto de 2009. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701
- [27] Balouiri, Mounyr, et al. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6 (2016) Páginas: 71–79.
- [28] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1997). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. 17, 234-8.
- [29] Calderón-Gabaldón M., Raybaudi-Massilia R., Suárez-Hernández A., Zambrano-Durán, A. y Mosqueda-Melgar J. 2014. Determinación de la capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de romero, cilantro, perejil y ají dulce. Libro "In Extensos" V Congreso Venezolano de Ciencia y Tecnología de Alimentos del 29 al 31 de mayo. Caracas, Venezuela. Pp. 49-54
- [30] Arunachalama, Rajeswari; et al. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Coccinia grandis* leaf extract and its application in the photocatalytic degradation. Central Leather Research Institute, India. [consultado el 27 de febrero de 2018] *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 94 (2012) Páginas 226– 230.
- [31] Ramírez-Rueda, Román Y; Pedraza, Adriana; et al. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas frente a cepas bacterianas multiresistentes. 2013. [consultado el 08 de abril de 2018] Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/236026629>

- [32] Carvajal, Zaida; Cabrera, Gustavo; et al. Actividad biológica de extractos de tres plantas sobre bacterias patógenas para el humano. Universidad Central de Venezuela [consultado el 12 de abril de 2018] Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2013; 33:35-39 Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000100008
- [33] Eltayeb Mohammed, Afrah. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles mediated by *Eucalyptus camaldulensis* leaf extract. Saudi Arabia [consultado el 14 de marzo de 2018] Asian Pac J Trop Biomed 2015; 5(5): 382-386 Disponible en [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30373-7](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30373-7)
- [34] Carrillo, María; et al. Fortificación de harina de maíz con nanopartículas de hierro sintetizadas con extracto de moringa (*Moringa oleifera*). [Consultado el 25 de febrero de 2018] Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias Volumen 3, Número 8 – Julio – Septiembre – 2016: 39-45. Disponible en http://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Ciencias_Naturales_y_Agropecuarias/vol3num8/Revista_Ciencias_Naturales_V3_N8_6.pdf
- [35] González-Vargas, Nancy Celene; et al. Actividad Antibacteriana De Nanopartículas Metálicas Sobre Bacterias Resistentes A Antibióticos Convencionales. Universidad de Guanajato, México. [Consultado el 15 de marzo de 2018] Vol. 3 no. 2, Verano de la Investigación Científica, 2017. Pág 913-917. Disponible en <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/2189>
- [36] Gopalu, Karunakaran; et al. Floral Biosynthesis of Mn₃O₄ and Fe₂O₃ Nanoparticles Using Chaenomeles sp. Flower Extracts for Efficient Medicinal Applications. 2017. JOM, The Minerals, Metals & Materials Society.

- [37] G. Jagathesan, P. Rajiv. Biosynthesis and characterization of iron oxide nanoparticles using *Eichhornia crassipes* leaf extract and assessing their antibacterial activity. India [Consultado el 24 de febrero de 2018] Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 13 (2018) 90–94. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.014>
- [38] Mosquito, S., Ruiz, J. et al. Mecanismos Moleculares de Resistencia Antibiótica en *Escherichia Coli* Asociadas a Diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2011; 28(4):648-56.
- [39] Cervantes, E., et al. Características generales del Staphylococcus aureus Rev Latinoam Patol Clin Med Lab 2014; 61 (1): 28-40
- [40] Manual MSD versión para público general [internet] Estados Unidos: Bush, L; 2015. [actualizado abril 2015, consultado 30 de junio de 2019] Disponible en <https://www.msdmanuals.com/es-ve/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas/infecciones-por-pseudomonas>
- [41] Cortés, A., et. al., Bacillus cereus: ALIMENTOS, SALUD Y BIOTECNOLOGÍA. Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 10, octubre. 2017. pp: 3-9
- [42] Medina M. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. Journal of Functional Foods. Vol 3. 2011. pp 79-87.
- [43] Lamaison J, Carnet A. Teneurs en Principaux Flavonoids des Fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en Fonction de la Vegetation. Pharmaceutica Acta Helvetia, Vol. 65, 1990, pp. 315-320.
- [44] Villano D, Fernandez-Pachon M, Moya M, Troncoso A, Garcia-Parrilla M.C. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. Talanta. 71(1):230-235.
- [45] Mittal, K., et al. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. [Consultado el 15 de febrero de 2019]. JBA-06641; No of Pages 11. 2013. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>

- [46] Madhavi, V., et al. *Application of phytogetic zerovalent iron nanoparticles in the adsorption of hexavalent chromium*. [Consultado el 15 de febrero de 2019] *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 116 (2013) 17–25. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013.06.045>
- [47] Lippolis, L. (2007). *Síntesis de Nanopartículas de Sulfuros Bimetálicos Asistida por Ultrasonido para ser Empleadas como Posibles Catalizadores de Hidrotratamiento* (Tesis de doctorado). Universidad Central de Venezuela. Página 55.
- [48] Mohammad, G.; et al. *Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using Eucalyptus chapmaniana leaves extract*. [Consultado el 25 de febrero de 2019] *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* Volume 3, Issue 1, January 2013, Pages 58-63. Disponible en [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60024-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60024-6)
- [49] Dauthal, P.; Mukhopadhyay, M. *Noble Metal Nanoparticles: Plant Mediated Synthesis, Mechanistic Aspects of Synthesis and Applications*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2016. DOI: 10.1021/acs.iecr.6b00861
- [50] Pattanayak, M; Nayak, L. *Ecofriendly green synthesis of iron nanoparticles from various plants and spices extract*. *International journal of plant, animal and environmental sciences*,1:2231-4490. 2013.
- [51] Cañazaca, C.; Ccama, W. *Biosíntesis de nanopartículas de hierro cero Valente (nzvi) usando hojas de eucalipto (eucalyptus sp.) para la remoción de cromo hexavalente*. (Tesis de grado). Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Capítulo 2: Marco Teórico, sección 2.6.1 Factores a controlar durante la biosíntesis de nanopartículas.
- [52] Devatha, T; et al. *Green synthesis of iron nanoparticles using different leaf extracts for treatment of domestic wastewater*. *Journal of Cleaner Production*. Vol. XVI, 2016.
- [53] Carabias J., Q. A. (2006). *AFM Characterization of small metal nanoparticles*. *EnanoNewsLetter*.

- [54] Kuskoski, E. et al. *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos*. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 25(4): 726-732, out.-dez. 2005.
- [55] Vong Q., H. S. Physicochemical, antioxidant and anti-cancer activity of a *Eucalyptus robusta* (Sm.) leaf aqueous extract. *Industrial Crops and Products*, 167-174. 2015.