



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Evaluación biológica de extractos orgánicos y
nanopartículas de plata sintetizadas mediante ruta
verde a partir de *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth”**

Tesis que presenta

José Manuel Gutiérrez García

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis

Dra. Daphne Edith González Juárez

Dr. José Luis Sánchez García

San Luis Potosí, S.L.P., marzo de 2026



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Evaluación biológica de extractos orgánicos y nanopartículas de plata sintetizadas mediante ruta verde a partir de *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por José Manuel Gutiérrez García y aprobada el **20 de febrero del 2026** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Daphne Edith González Juárez
Codirectora de la tesis

Dr. José Luis Sánchez García
Codirector de la tesis

Dr. Rubén López Revilla
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Química farmacéutica de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. bajo la codirección de la Dra. Daphne Edith González Juárez y el Dr. José Luis Sánchez García

Durante la realización del trabajo, el autor recibió una beca académica de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación No. 1320873 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dedicatoria

A mis padres, sin ellos yo no podría estar aquí, a mi familia por todo el apoyo que siempre me han demostrado, este logro no solo es mío, es de ustedes.

Gracias por todo.

Agradecimientos

A mis codirectores, que sin su ayuda este trabajo no lo podría haber realizado.

Al laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria por prestarme equipos para la preparación de las muestras de nanopartículas.

A mis compañeros de laboratorio, Kate, Genessis, Gabo y Sofi, que ofrecieron su ayuda cuando tuve alguna duda sobre mi trabajo.

A mis compañeros de generación, en especial a Sam, Miguel, Anel, Lucero y Perla, que estuvieron en los momentos donde estuve más estresado y me sacaban una sonrisa.

A mis roomies Selma y Kelly, que se volvieron mi hogar lejos de casa y me escuchaban y ofrecían su ayuda a su forma, porque me escucharon, me vieron llorar, estresado, se volvieron parte fundamental de este trabajo, sin su cariño no podría haber concluido este trabajo.

A John, que me ha sacó risas y me distrajo en los días más pesados, el cariño que me ha demostrado es muy grande, por escucharme y aún sin entender sobre el tema, se interesaba en que le contara sobre lo que hacía.

En especial al apoyo incondicional de mi familia, sin su presencia durante este trabajo, yo no podría haber llegado aquí, gracias por todo lo que han hecho por mi.

Gracias a todos los que han estado en todo el proceso de mi trabajo, sin su ayuda, sin su amistad, sin su cariño, este trabajo no se habría podido realizar, así que gracias.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
2. Justificación, hipótesis y objetivos	5
2.1. Justificación	5
2.2. Hipótesis	5
2.3. Objetivos	6
2.3.1 <i>Objetivo general</i>	6
2.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	6
3. Materiales y métodos	7
3.1. Extractos orgánicos de <i>Tecoma stans</i>	7
3.1.1 <i>Recolección</i>	7
3.1.2 <i>Tratamiento del material vegetal</i>	7
3.1.3 <i>Elaboración de extractos</i>	7
3.2. Nanopartículas de plata (AgNPs)	8
3.2.1 <i>Síntesis de AgNPs</i>	8
3.2.2 <i>Síntesis verde</i>	8
3.2.3 <i>Análisis estructural</i>	9
3.2.4 <i>Cálculos de concentración teórica</i>	9
3.3. Evaluación de la toxicidad en <i>A. salina</i>	10
3.3.1 <i>Evaluación de viabilidad</i>	11
3.3.2 <i>Determinación de IC₅₀</i>	11
3.3.3 <i>Análisis de datos</i>	11
3.4. Determinación de la actividad antioxidante	12
3.4.1 <i>Preparación de las diluciones de los extractos</i>	14
3.4.2 <i>Ensayo en microplaca</i>	16
3.4.3 <i>Cálculo del porcentaje de inhibición</i>	16
3.5. Prueba de inhibición del crecimiento microbiano.	16
3.5.1 <i>Verificación de la pureza de las cepas bacterianas patógenas</i>	17

3.5.2	<i>Preparación de los inóculos de bacterias patógenas</i>	18
3.5.3	<i>Prueba cuantitativa de inhibición el crecimiento de bacterias</i>	18
4.	Resultados y discusión	19
4.1.	Extractos orgánicos de <i>Tecoma stans</i>	19
4.2.	Síntesis verde de AgNPs	20
4.3.	Toxicidad en <i>A. salina</i>	27
4.4.	Potencial antioxidante	35
4.5.	Inhibición del crecimiento microbiano	51
5.	Conclusiones	67
6.	Bibliografía	70

Lista de tablas

Tabla 1.	Cepas bacterianas patógenas y sus características	17
Tabla 2.	Rendimiento de extractos orgánicos de <i>T. stans</i>	19
Tabla 3.	EDS de AgNPs	20
Tabla 4.	Análisis EDS	26
Tabla 5.	Toxicidad en <i>A. salina</i> con extracto hexánico	27
Tabla 6.	Toxicidad en <i>A. salina</i> con extracto de acetato de etilo	28
Tabla 7.	Toxicidad en <i>A. salina</i> con extracto de diclorometano	28
Tabla 8.	Toxicidad en <i>A. salina</i> con extracto acético	29
Tabla 9.	Toxicidad en <i>A. salina</i> con extracto de MeOH	30
Tabla 10.	Toxicidad en <i>A. salina</i> utilizando AgNPs	30
Tabla 11.	Toxicidad en <i>A. salina</i> utilizando AgNPs con extracto hexánico	31
Tabla 12.	Toxicidad en <i>A. salina</i> utilizando AgNPs con extracto de CH ₂ Cl ₂	31
Tabla 13.	Toxicidad en <i>A. salina</i> utilizando AgNPs con extracto de AcOET	32
Tabla 14.	Toxicidad en <i>A. salina</i> utilizando AgNPs con extracto acético	33
Tabla 15.	Toxicidad en <i>A. salina</i> utilizando AgNPs con extracto de MeOH	33
Tabla 16.	IC ₅₀ extractos vs AgNPs	34

Lista de figuras

Figura 1.	Reacción del radical DPPH con un antioxidante (A-H)	13
Figura 2.	AgNPs observadas en SEM.	21
Figura 3.	Espectro Uv-vis de AgNPs.	21
Figura 4.	AgNPs sintetizadas de extracto hexánico.	22
Figura 5.	AgNPs de extracto CH₂Cl₂.	23
Figura 6.	AgNPs sintetizadas de extracto de AcOET.	24
Figura 7.	AgNPs de extracto acetónico.	24
Figura 8.	AgNPs sintetizadas de extracto metanólico.	25
Figura 9.	Espectro Uv-Vis de AgNPs con extracto metanólico.	25
Figura 10.	Espectro Uv-Vis de AgNPs con extracto hexánico.	26
Figura 11.	Capacidad antioxidante del extracto hexánico de <i>T. stans</i>.	36
Figura 12.	Capacidad antioxidante del extracto de <i>T. stans</i> con CH₂Cl₂.	37
Figura 13.	Capacidad antioxidante del extracto de <i>T. stans</i> con AcOET.	38
Figura 14.	Capacidad antioxidante del extracto de <i>T. stans</i> con acetona.	39
Figura 15.	Capacidad antioxidante del extracto de <i>T. stans</i> con MeOH.	40
Figura 16.	Capacidad antioxidante de AgNPs con extracto hexánico.	41
Figura 17.	Capacidad antioxidante de AgNPs con extracto de CH₂Cl₂.	42
Figura 18.	Capacidad antioxidante de AgNPs con AcOET.	43
Figura 19.	Capacidad antioxidante de AgNPs con extracto acetónico.	44
Figura 20.	Capacidad antioxidante de AgNPs con extracto metanólico.	45
Figura 21.	Actividad Antioxidante Extracto vs. AgNPs Hexano.	46
Figura 22.	Actividad Antioxidante Extracto vs. AgNPs CH₂Cl₂.	47
Figura 23.	Actividad Antioxidante Extracto vs. AgNPs AcOET.	48
Figura 24.	Actividad Antioxidante Extracto vs. AgNPs Acetona.	49
Figura 25.	Actividad Antioxidante Extracto vs. AgNPs MeOH.	50
Figura 26.	Actividad antimicrobiana en <i>K. pneumoniae</i> ATCC.	51
Figura 27.	Actividad antimicrobiana en <i>E. coli</i> ATCC.	52
Figura 28.	Actividad antimicrobiana en <i>E. coli</i> IMSS 105.	53
Figura 29.	Actividad antimicrobiana en <i>E. coli</i> IMSS 68.	54
Figura 30.	Actividad antimicrobiana en <i>P. aeruginosa</i> ATCC.	55
Figura 31.	Actividad antimicrobiana en <i>P. aeruginosa</i> 105.	56

Figura 32.	Actividad antimicrobiana en <i>P. aeruginosa</i> 77.	57
Figura 33.	Actividad antimicrobiana en <i>S. aureus</i> ATCC.	58
Figura 34.	Actividad antimicrobiana en <i>S. aureus</i> PEBP 6301.	59
Figura 35.	Actividad antimicrobiana en <i>S. aureus</i> 7837.	60
Figura 36.	Actividad antimicrobiana en <i>E. faecium</i> ATCC.	61
Figura 37.	Actividad antimicrobiana en <i>E. faecium</i> U2235.	62
Figura 38.	Actividad antimicrobiana en <i>K. pneumoniae</i> INP 8.	63
Figura 39.	Actividad antimicrobiana en <i>K. pneumoniae</i> INP 27.	64
Figura 40.	Actividad antimicrobiana en <i>A. baumannii</i> 15.	65
Figura 41.	Actividad antimicrobiana en <i>A. baumannii</i> 20.	66

Abreviaturas

Abs	Absorbancia
AcOEt / AcOET	Acetato de etilo
Ag	Plata (elemento químico)
AgNP / AgNPs	Nanopartículas de plata
CH₂Cl₂	Diclorometano
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDS	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy
LC50	Concentración letal media
LINAN	Laboratorio Nacional de Nanociencias y Nanotecnología
MeOH	Metanol
NP / NPs	Nanopartículas

Resumen

Evaluación biológica de extractos orgánicos y nanopartículas de plata sintetizadas mediante ruta verde a partir de *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth

La planta *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth, conocida como “tronadora” o “campanilla amarilla”, se ha utilizado principalmente en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 debido a sus propiedades hipoglucemiantes. Además, se le han atribuido propiedades como cardioprotector, antiulceroso, citotóxico, antiinflamatorio, hepatoprotector, cicatrizante, antiespasmódico, antimicrobiano, antifúngico, analgésico y anticanceroso, razón por la cual esta planta sigue siendo motivo de estudio para conocer sus compuestos activos. Actualmente, el uso de la nanotecnología ha impulsado el uso de nanopartículas (NPs) como estrategia terapéutica dirigida a diversos blancos farmacéuticos. Los estudios de toxicidad indicaron que los extractos orgánicos de *Tecoma stans* (*T. stans*) son mayoritariamente seguros, aunque ciertas nanopartículas de plata (AgNPs) mostraron toxicidad elevada dependiendo del disolvente y la concentración. Los ensayos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) demostraron que los extractos y nanopartículas obtenidos con disolventes polares (metanólico y acetónico) presentan mayor actividad antioxidante, atribuida a la presencia de metabolitos fenólicos. Dado el papel de las especies reactivas de oxígeno (EROs) en enfermedades crónico-degenerativas, estos sistemas representan una alternativa prometedora frente a antioxidantes convencionales. Adicionalmente, las nanopartículas de plata funcionalizadas mostraron una potente actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo patógenos clínicamente relevantes, destacando su potencial como alternativa terapéutica antioxidante y antimicrobiana.

PALABRAS CLAVE: Medicina tradicional mexicana; compuestos fitoquímicos; síntesis verde; nanotecnología; agentes reductores; aplicaciones terapéuticas; metabolitos secundarios.

Abstract

Biological evaluation of organic extracts and silver nanoparticles synthesized using a green route from *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth

The plant *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth, known as “tronadora” or “yellow bellflower”, has been used mainly in traditional Mexican medicine for the treatment of type 2 diabetes mellitus due to its hypoglycemic properties. In addition, it has attributed properties such as cardioprotective, anti-ulcer, cytotoxic, anti-inflammatory, hepatoprotective, healing, antispasmodic, antimicrobial, antifungal, analgesic, and anticancer, which is why this plant continues to be studied to know its active compounds. Currently, advances in nanotechnology have promoted the use of nanoparticles (NPs) as a therapeutic strategy directed toward diverse pharmaceutical targets. Toxicity studies indicated that the organic extracts of *Tecoma stans* (*T. stans*) are largely safe, although certain silver nanoparticles (AgNPs) exhibited high toxicity depending on the solvent and concentration. DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) assays demonstrated that extracts and nanoparticles obtained using polar solvents (methanolic and acetonic) showed higher antioxidant activity, attributed to the presence of phenolic metabolites. Given the role of reactive oxygen species (ROS) in chronic degenerative diseases, these systems represent a promising alternative to conventional antioxidants. Additionally, functionalized silver nanoparticles exhibited strong antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including clinically relevant pathogens, highlighting their potential as antioxidant and antimicrobial therapeutic alternatives.

KEY WORDS: Mexican traditional medicine; phytochemical compounds; green synthesis; nanotechnology; reducing agents; therapeutic applications; secondary metabolites.

1. Introducción

En las últimas tres décadas, el uso de productos y suplementos medicinales a base de plantas ha crecido de forma exponencial y más del 80% de la población mundial utiliza este tipo de suplementos para algún aspecto de la atención sanitaria primaria (Ekor, 2014).

El uso terapéutico de la flora vegetal en México ha despertado el interés por el estudio de las plantas medicinales como fuente de productos naturales, por los principios activos que contienen y se ha incrementado en las últimas décadas debido a la urgente necesidad de descubrir nuevos agentes terapéuticos y desarrollar nuevos medicamentos con el objetivo de mejorar la eficacia de las terapias, disminuir los efectos secundarios de los medicamentos existentes y mitigar el desarrollo de bacterias multirresistentes (Molina-Salinas, y otros, 2011; Vega-Menchaca, y otros, 2013.) Es importante tomar en cuenta que los múltiples compuestos y la variabilidad de las plantas depende principalmente de la estación de recolección y del origen del cultivo (Rios, Ocampo-Acuña, Ramírez-Cisneros, & Salazar-Rios, 2020).

Tecoma stans (L.) Juss. Ex Kunth (nombres comunes: amarillo-anciano o campana amarilla) es una planta medicinal popular utilizada a nivel mundial. En México se ha utilizado para tratar la diabetes mellitus tipo 2. Las revisiones exhaustivas han identificado su uso como un agente hipoglucémico, cardioprotector, citotóxico, anticanceroso, hepatoprotector, antimicrobiano, antinociceptivo, antiinflamatorio, antiartrítico, antiespasmódico, antidiarreico y antiulceroso. (Mukul & Basavaraju, 2021). (Mukul & Basavaraju, A review on phytochemistry and pharmacological uses of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth, 2021)El extracto acuoso muestra propiedades antidiabéticas, lo que refleja sus usos tradicionales (Taher, Dawood, & Sanad, 2016; Aguilar-Santamaría, Ramírez, Nicasio, Alegría-Reyes, & Herrera-Arellano, 2009). Se han aislado más de 120 compuestos mediante análisis

fitoquímico de *T. stans* con una diversidad de esqueletos base que incluyen alcaloides de monoterpeno, flavonoides, terpenoides, glucósidos y componentes volátiles. Todas las partes de la planta han sido sometidas a análisis fitoquímicos (Mukul & Basavaraju, 2021) aunque la química de las flores aún es poco explorada.

El aprovechamiento de extractos vegetales como fuentes de compuestos bioactivos y como agentes reductores y estabilizantes en procesos de síntesis verde ha adquirido un interés creciente como alternativa a métodos químicos convencionales más agresivos. *T. stans* se ha identificado como una especie de relevancia debido a su contenido de flavonoides y polifenoles, presentes principalmente en extractos polares e hidroalcohólicos, con actividad antioxidante demostrada en ensayos químicos como 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y en el Poder de Reducción Antioxidante del Ión Férrico (FRAP). Se han reportado fracciones semipolares (acetato de etilo y cloroformo) con alta capacidad antioxidante, para extractos metanólicos de hojas, lo que evidencia su potencial bioactivo. (Fernades & Mankad, 2022).

La extracción sucesiva utilizando solventes de distinta polaridad, como hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona y metanol, permite separar metabolitos según su afinidad química, lo que facilita la correlación entre las clases de compuestos presentes y la actividad biológica observada. (Fernades & Mankad, 2022)

La generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) es un proceso fisiológico inherente al metabolismo celular; sin embargo, cuando su producción supera la capacidad antioxidante endógena, se produce un estado de estrés oxidativo que contribuye al desarrollo y progresión de diversas enfermedades crónicas, incluyendo diabetes mellitus, cáncer y trastornos neurodegenerativos (Liguori, y otros, 2018). El daño ocasionado por estas especies sobre biomoléculas esenciales como lípidos, proteínas y ADN puede deteriorar la funcionalidad celular y favorecer procesos patológicos. Por ello, el uso de antioxidantes exógenos

adquiere relevancia terapéutica al reducir la carga oxidativa y prevenir el daño celular (Pham-Huy, He, & Pham-Huy, 2008). No obstante, las limitaciones de biodisponibilidad y eficacia de algunos antioxidantes tradicionales han impulsado la búsqueda continua de nuevas fuentes, especialmente de origen vegetal, que puedan ofrecer moléculas más activas, estables y selectivas (Liguori, y otros, 2018).

La evaluación preliminar de la toxicidad es esencial para orientar el desarrollo de extractos y compuestos derivados hacia aplicaciones biomédicas o biotecnológicas. El bioensayo de letalidad en *Artemia salina* permite una estimación rápida y económica de toxicidad general, mientras que ensayos celulares de viabilidad, como MTT o resazurina, proporcionan información más específica en líneas celulares normales y tumorales. Estudios previos con extractos de *T. stans* han señalado la importancia de integrar ambos niveles para obtener perfiles de seguridad más robustos (Fernades & Mankad, 2022).

La síntesis verde de nanopartículas mediada por extractos vegetales ha emergido como una alternativa ambientalmente favorable frente a métodos químicos convencionales. Extractos de *T. stans* han sido empleados con éxito para la obtención de nanopartículas de plata (AgNPs), donde los metabolitos presentes actúan simultáneamente como agentes reductores y estabilizantes. Dichas nanopartículas han mostrado actividades antioxidantes, antimicrobiana y antiproliferativa superiores a las de los extractos originales, además de presentar recubrimientos biogénicos que pueden mejorar la biocompatibilidad. (Lavudi & Harika, 2022).

En la actualidad han surgido numerosas áreas prometedoras. Un enfoque particular se centra en las nanopartículas (NP) ya que a escala nanométrica la relación de superficie/volumen provoca variaciones físicas y químicas en sus propiedades, en contraste con estructuras químicas más grandes que comparten funciones similares (Ray, 2010). Así mismo, los métodos de síntesis de nanopartículas han cambiado; algunos de estos cambios son las rutas de síntesis

verde, que se están utilizando como una alternativa más segura para el medio ambiente al emplear bacterias, plantas y otros recursos biológicos (Lateef et al., 2016).

La nanotecnología es una rama de la ciencia que se refiere al estudio, manipulación y control de la materia a escala nanométrica, es decir, entre 1 y 100 nanómetros. En esta escala, los materiales pueden presentar propiedades físicas, químicas y biológicas únicas que no se observan en tamaños mayores. Esta tecnología permite el diseño de materiales y dispositivos con aplicaciones en campos como la medicina, la electrónica, la energía y el medio ambiente, entre otros. (Bawa, 2005). La síntesis de NP mediante métodos ecológicos como la síntesis verde es una opción segura para el medio ambiente y debería ser ampliamente promovida (Abada, Mashraqi, Modafar, Al-Abboud, & A, 2024). La síntesis de NP mediada por plantas medicinales es preferible a la mediada por microorganismos, ya que no requiere condiciones asépticas rigurosas. En el campo biomédico, la compatibilidad de las NP con los sistemas biológicos se debe a su pequeño tamaño y amplia superficie. Además, la síntesis de NP mediante nanoprecipitación con extractos acuosos de plantas medicinales representa una excelente alternativa para la administración de fármacos, ya que evita el uso de extractos orgánicos, lo que las hace no tóxicas para el medio ambiente (Tang et al., 2017).

2. Justificación, hipótesis y objetivos

2.1. Justificación

El creciente interés por el uso de plantas medicinales como fuente de compuestos bioactivos ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que contribuyan al tratamiento de enfermedades crónicas y al combate de microorganismos resistentes.

T. stans es una especie de amplia distribución y uso tradicional en México, cuyos extractos han demostrado actividad hipoglucemiante, antioxidante, antimicrobiana y antiproliferativa. No obstante, persiste la necesidad de profundizar en la caracterización de sus metabolitos secundarios y su relación con la actividad biológica observada.

Asimismo, la síntesis verde de nanopartículas, particularmente de plata, ha mostrado resultados prometedores al potenciar la actividad biológica de los extractos vegetales, reducir la toxicidad de métodos químicos convencionales y favorecer la obtención de materiales más biocompatibles. En este contexto, resulta pertinente evaluar de manera integral la actividad antioxidante, tóxica y biológica de extractos orgánicos y AgNPs sintetizados mediante *T. stans*, con el fin de identificar fracciones y nanopartículas con potencial uso farmacológico o biotecnológico. Este estudio aporta conocimiento sobre los mecanismos y compuestos implicados en su actividad, además de contribuir a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas basadas en recursos naturales y procesos sustentables.

2.2. Hipótesis

Los extractos orgánicos de *T. stans* y las nanopartículas de plata sintetizadas mediante ruta verde a partir de dichos extractos presentan actividad antioxidante y biológica significativa, y las AgNPs exhiben una mayor eficacia y selectividad debido a la acción conjunta entre los metabolitos vegetales y el núcleo metálico, en comparación con los extractos originales.

2.3. Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad biológica de extractos orgánicos de *T. stans* y de nanopartículas de plata sintetizadas mediante ruta verde, con el fin de identificar aplicaciones terapéuticas.

2.3.2 Objetivos específicos

- Obtener extractos orgánicos de *T. stans* mediante extracción sucesiva con solventes de diferente polaridad.
- Sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs) utilizando los extractos de *T. stans* como agentes reductores y estabilizantes mediante un proceso de síntesis verde.
- Caracterizar las AgNPs obtenidas mediante técnicas espectroscópicas.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos mediante el ensayo DPPH.
- Determinar la toxicidad preliminar de los extractos y AgNPs mediante el bioensayo de letalidad en *A. salina*.

3. Materiales y métodos

3.1. Extractos orgánicos de *Tecoma stans*

3.1.1 *Recolección*

La recolección de la planta *T. stans* se realizó en diferentes puntos de la región de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México con georreferencia 22.14742° N, 101.03946° O; 22.15082° N, 101.04004° O. Al igual se tomó una muestra de la misma planta en la región de Fresnillo, Zacatecas. 23.16873° N, 102.86832° O.

3.1.2 *Tratamiento del material vegetal*

El material vegetal se limpió para dejar secar a temperatura ambiente y a la sombra durante 4 semanas. Pasado este tiempo, las hojas y flores de *T. stans* se molieron y el polvo resultante se mantuvo de forma segura en un recipiente para su posterior tratamiento.

3.1.3 *Elaboración de extractos*

Se pesaron 100g de material vegetal para su posterior extracción por maceración con hexano, acetato de etilo, diclorometano, acetona y metanol. La extracción por maceración se realizó en proporción de material vegetal y disolvente 1:18, respectivamente. Los macerados se filtraron y los disolventes se evaporaron a presión reducida utilizando un rotavapor marca BÜCHI® a una temperatura de 50°C y un vacío entre 350 y 700 mbar, según el disolvente a evaporar. Los extractos se dejaron enfriar a temperatura ambiente para obtener el rendimiento de cada uno, dado por la fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Gramos de extracto obtenido}}{\text{Gramos de material vegetal utilizados}} \times 100\%$$

3.2. Nanopartículas de plata (AgNPs)

Las nanopartículas de plata (AgNP) son ampliamente utilizadas en terapias antimicrobianas y anticancerosas, además de aplicarse en la reparación de heridas, la curación ósea, como adyuvantes de vacunas, agentes antidiabéticos y biosensores. (Li, y otros, 2020).

La síntesis de nanomateriales mediante bacterias, hongos, algas y extractos de plantas es una alternativa ecológica, eficiente, sostenible y no tóxica, debido a los metabolitos secundarios involucrados. (Pandit et al., 2022; J. Singh et al., 2018). Los extractos vegetales contienen metabolitos bioactivos como proteínas, flavonoides, alcaloides, polifenoles, terpenoides y polisacáridos, que actúan como agentes reductores, recubridores y estabilizadores naturales en la formación de nanopartículas. (Osman et al., 2024; Singh et al., 2023).

3.2.1 Síntesis de AgNPs

La plata coloidal fue preparada utilizando el método de reducción química de acuerdo con lo descrito por Lee y Meisel (1982). Todas las soluciones fueron preparadas con agua MilliQ. El experimento consiste en agregar 5 mL gota a gota de una solución de citrato de sodio al 1% a 50 mL de una solución de nitrato de plata 10^{-3} M, calentando la solución hasta 60 °C. Durante este proceso se mezcló vigorosamente en una atmosfera libre de oxígeno. La reacción se llevó a cabo durante 25 min hasta notar un cambio de coloración a un amarillo pálido. Al término del tiempo de reacción, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente.

3.2.2 Síntesis verde

Para realizar la técnica de síntesis verde se siguió la metodología previamente descrita por Lee y Meisel (1982), modificando el agente reductor (solución de citrato de sodio al 1%), por extracto orgánico, haciendo uso de 0.05 g de extracto orgánico (extracto hexánico, extracto de acetato de etilo, extracto de diclorometano, extracto acetónico y extracto metanólico).

3.2.3 Análisis estructural

El estudio de la morfología de las nanopartículas se llevó a cabo en el microscopio electrónico de barrido FEI QUANTA 200 del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN).

3.2.4 Cálculos de concentración teórica

La concentración teórica de nanopartículas de plata (AgNPs) se calculó a partir de la cantidad total de iones plata (Ag^+) presentes en la solución precursora de nitrato de plata (AgNO_3), bajo la hipótesis de que dichos iones se redujeran completamente a plata metálica (Ag^0). Para la síntesis, se utilizó una solución de 50 mL de AgNO_3 10^{-3} M a la que se añadieron 50 mg de extracto vegetal de *T. stans* como agente reductor y estabilizante.

El número de moles de Ag^+ disponibles se contabilizó mediante la ecuación:

$$n = C \times V$$

donde C es la concentración de AgNO_3 (10^{-3} mol·L $^{-1}$) y V el volumen de la solución (0.050 L). De este modo:

$$n = (1 \times 10^{-3}) \times 0.050 = 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol Ag}^+$$

La masa total de plata metálica teóricamente formable se obtuvo al multiplicar los moles por la masa molar de Ag (107,87 g·mol $^{-1}$):

$$m = n \times M = 5.0 \times 10^{-5} \times 107.87 = 0.00539 \text{ g} = 5.39 \text{ mg}$$

Por tanto, la concentración teórica máxima de AgNPs en la suspensión resultante es:

$$C_{\text{teórica}} = \frac{5.39 \text{ mg}}{50 \text{ mL}} = 0.1078 \frac{\text{mg}}{\text{mL}^{-1}} = 107.8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}^{-1}}$$

Teniendo un 80% de conversión total, lo resultante es:

$$107.8 \frac{\mu g}{mL^{-1}} \times .80 = 86.24 \frac{\mu g}{mL^{-1}}$$

3.3. Evaluación de la toxicidad en *A. salina*

Los nauplios del camarón en salmuera se consideran un sistema modelo simple y adecuado para las pruebas de toxicidad aguda. Los nauplios, es decir, las primeras larvas de los crustáceos presentan mayor sensibilidad a los agentes tóxicos que la *Artemia* adulta (Trompeta et al., 2019)

La evaluación de la toxicidad aguda de los extractos orgánicos de *T. stans* se realizó con el ensayo de *A. salina* siguiendo la metodología de Banti & Hadjidakou, 2021.

El ensayo se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Banti & Hadjidakou, 2021. Se pesaron 1 g de quistes de *A. salina* y se hidrataron en 500 mL de agua dulce natural durante 1 hora. Siguiendo a esto, se pesaron 17 g de sal marina en 500 mL de agua purificada y se adicionaron a los quistes de *A. salina* previamente hidratados. Los quistes de *A. salina* se dejaron con aireación utilizando una bomba de aire a temperatura ambiente y bajo iluminación continua durante 48 horas, después de las cuales los nauplios eclosionaron.

En un tubo de ensayo se agregó una alícuota de 5 mL de solución salina con 20 nauplios.

Para obtener las concentraciones de 125, 250, 500 y 1000 $\mu g/ mL$ de cada extracto orgánico de *T. stans* se disolvieron los mg correspondientes del extracto orgánico seco con agua destilada.

- Para 125 $\mu g/mL$

$$Cantidad\ extracto\ (mg) = \frac{125\ (\mu g/mL) \times 5\ (mL)}{1000} = 0.625\ mg$$

- Para 250 $\mu g/mL$

$$\text{Cantidad extracto (mg)} = \frac{250 (\mu\text{g/mL}) \times 5 (\text{mL})}{1000} = 1.25 \text{ mg}$$

- Para 500 $\mu\text{g/mL}$

$$\text{Cantidad extracto (mg)} = \frac{500 (\mu\text{g/mL}) \times 5 (\text{mL})}{1000} = 2.5 \text{ mg}$$

- Para 1000 $\mu\text{g/mL}$

$$\text{Cantidad extracto (mg)} = \frac{1000 (\mu\text{g/mL}) \times 5 (\text{mL})}{1000} = 5 \text{ mg}$$

El volumen final de cada tubo de ensayo debe de ser de 10mL.

3.3.1 Evaluación de viabilidad

Tras 24 horas de incubación, los nauplios fueron examinados bajo un estereoscopio. Se consideraron viables los nauplios que mostraron movimientos internos o externos durante un periodo de observación de 10 segundos.

3.3.2 Determinación de IC_{50}

La concentración letal 50 (LC_{50}). El intervalo de confianza del 95% y la pendiente se determinaron a partir de los conteos a las 24 horas utilizando el método de análisis probit descrito por Finney. (Molina-Salinas & Said-Fernández, 2006).

3.3.3 Análisis de datos

El porcentaje de mortalidad de las larvas de *Artemia* s. se calculará de acuerdo con (Abbott, 1925):

$$M (\% \text{ vs control}) = \frac{Lc - Lt}{Lc} \times 100$$

M: es mortalidad

Lc: Nauplios vivos en el control después de 24 hrs

Lt: Nauplios vivos con el agente a probar después de 24 hrs

3.4. Determinación de la actividad antioxidante

Los ensayos para evaluar la actividad antioxidante se han desarrollado con base en distintos mecanismos químicos, principalmente la transferencia de electrones (ET) y la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT). Uno de los métodos más ampliamente utilizados es el ensayo del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), que se basa en la capacidad de los antioxidantes para donar electrones o átomos de hidrógeno y neutralizar este radical libre, resultando en una disminución de la absorbancia medible espectrofotométricamente. Además del DPPH, existen otros métodos representativos como el FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), que mide el poder reductor de los compuestos, y el ensayo ABTS, que evalúa la capacidad de los antioxidantes para eliminar el radical ABTS⁺. Por otro lado, el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), basado en HAT, mide la capacidad de los antioxidantes para inhibir la oxidación inducida por radicales peroxilo. La elección del método depende del tipo de compuesto a analizar, el mecanismo antioxidante predominante y las condiciones experimentales específicas (Ronald, Xianli, & Karen, 2005)

Con el objetivo de investigar la actividad captadora de radicales libres (ACRL) de los extractos con y sin nanopartículas de *T. stans* se realizará el ensayo de DPPH.

Este estudio sigue un diseño experimental *in vitro* para evaluar la capacidad antioxidante de extractos orgánicos de *T. stans* mediante la prueba de DPPH. El ensayo DPPH es el método más simple y una primera aproximación para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto, un extracto u otras fuentes biológicas.

El DPPH se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización de un electrón sobre toda la molécula, así que la molécula no dimeriza, tal como ocurre con otros radicales libres. La deslocalización da lugar al

desarrollo de un color violeta que absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante. El electrón impar del átomo de nitrógeno en el DPPH se reduce al recibir un átomo de hidrógeno de los antioxidantes a la hidrazina correspondiente (Contreras-Guzmán & Strong lli, 1982) (Figura. 1).

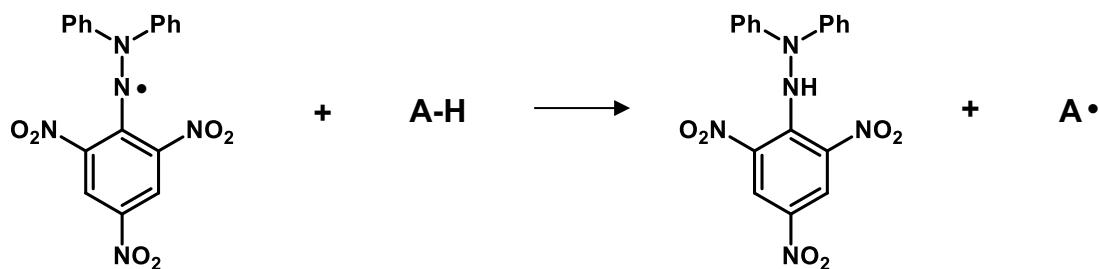


Figura 1. Reacción del radical DPPH con un antioxidante (A-H)

El análisis de la actividad captora de radicales libres (ACRL) de los extractos con y sin nanopartículas, dada por la evolución de su cinética de reacción, se determinó al término del tiempo de exposición de los extractos con el radical libre estable DPPH esto es, hasta que el remanente DPPH alcance el equilibrio. Cada uno de los extractos será evaluado por triplicado, en soluciones etanólicas a diferentes concentraciones 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 µg/mL y a intervalos de 30 min hasta 360 min y una última medición a los 1440 min (24 h), en presencia del radical libre DPPH (0.1 mM), empleando como control una solución etanólica, que representa el 100% de DPPH, a 25 °C. El α-tocoferol ayuda a prevenir el daño que causan a las células los radicales libres (productos químicos sumamente reactivos). Es un tipo de antioxidante, también llamado vitamina E.

3.4.1 Preparación de las diluciones de los extractos

Se preparó una solución madre de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) cuyo peso molecular es de 394.32 g/mol en metanol con una concentración de 0.2 mM, para una vez realizada la reacción (1:1) la concentración final sea de 0.1 mM. La solución se almacenará en un lugar oscuro para evitar la fotodegradación.

El cálculo de la cantidad necesaria de DPPH para un volumen de 25 mL se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad DPPH (g)} = \text{Concentración (M)} \times \text{Volumen (L)} \times \text{PM} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)$$

Al sustituir los valores:

$$\text{Cantidad DPPH (g)} = 0.2 \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}}\right) \times 0.025 \text{ (L)} \times 394.32 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)$$

$$\text{Cantidad DPPH (g)} = 1.97 \text{ mg}$$

Se pesaron 1.97 mg de DPPH en un recipiente limpio y seco utilizando una balanza analítica. El DPPH se transfirió a un matraz de 25 mL, agregando 10 mL de metanol. La mezcla se agitó hasta que el compuesto se disolvió por completo. Posteriormente, el volumen de la solución se ajustó a 25 mL con metanol, utilizando un matraz aforado.

Se disolvieron los extractos secos en metanol para preparar diferentes concentraciones (25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 µg/mL). Para determinar cuánto se necesita pesar de los extractos secos para preparar las diluciones, el cálculo se hace en función de la concentración deseada y el volumen final de solución siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad extracto (mg)} = \frac{\text{Concentración } (\mu\text{g/mL}) \times \text{Volumen (mL)}}{1000}$$

Para preparar 2 mL de cada una de las siguientes concentraciones finales: 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 $\mu\text{g/mL}$, a partir de una solución madre de 8 mg/mL, se aplica la ecuación de dilución:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$C_1 = 8 \text{ mg/mL} = 8000 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$C_2 = \text{concentración final deseada } (\mu\text{g/mL})$$

$$V_1 = \text{volumen de solución madre necesario}$$

$$V_2 = 2 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1}$$

Conc.trabajo ($\mu\text{g/mL}$)	Vol stock (μL)	Vol solvente (μL)	Vol total (μL)
50	12.50	1 987.50	2 000
100	25.00	1 975.00	2 000
200	50.00	1 950.00	2 000
300	75.00	1 925.00	2 000
400	100.00	1 900.00	2 000
500	125.00	1 875.00	2 000
600	150.00	1 850.00	2 000
700	175.00	1 825.00	2 000
800	200.00	1 800.00	2 000

3.4.2 Ensayo en microplaca

En una microplaca de 96 pocillos, se mezclaron 100 µL de cada dilución de extracto con 100 µL de la solución de DPPH. como control positivo se usó α-tocoferol y como control negativo se usará 100 µL de metanol en lugar del extracto. La mezcla reaccionó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se registró la absorbancia a 517 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis.

3.4.3 Cálculo del porcentaje de inhibición

La capacidad antioxidante se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \frac{Abs\ control - Abs\ muestra}{Abs\ control} \times 100$$

Donde:

Abs_{control}: es la absorbancia del DPPH sin extracto.

Abs_{muestra}: es la absorbancia del DPPH con extracto.

3.5. Prueba de inhibición del crecimiento microbiano.

En colaboración con la Dra. Michelle Alejandra Chávez Hernández del Laboratorio de Biología Molecular de Bacterias y Levaduras de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional en la Ciudad de México, se evaluaron las AgNPs funcionalizadas con extractos de *T. stans* sobre 16 cepas de referencia de diferentes especies bacterianas de naturaleza patógena, aisladas de diversos ambientes hospitalarios, enumeradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas patógenas y sus características

Especie	Procedencia	No. de cepas	Característica fenotípica
<i>Bacillus megaterium</i>	ENCB-IPN	Referencia n= 1	Sensible a antibióticos
<i>Micrococcus luteus</i>	ENCB-IPN	Referencia n= 1 ATCC 15307	Sensible a antibióticos
<i>Staphylococcus aureus</i>	Hospital Civil de Guadalajara	Referencia n=1 ATCC 25923	Resistencia a antibióticos
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hospital Civil de Guadalajara	Referencia n= 1 ATCC 700603	Sensible a antibióticos
		Aislados clínicos n=1 Hp599	Resistencia a antibióticos
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hospital general regional No. 251	Aislados clínicos n=1 A18	Resistencia a antibióticos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ENCB- IPN y Hospital Civil de Guadalajara	Referencia n= 2 ATCC 27853 PAO1	Sensible a antibióticos
		Aislados clínicos n=2 L721 U2336	Resistencia a antibióticos
<i>Escherichia coli</i>	ENCB- IPN y Hospital Civil de Guadalajara	Referencia n= 1 ATCC 25922	Sensible a antibióticos
<i>Shigella flexneri</i>	ENCB- IPN	Referencia n= 1 ATCC 12022	Sensible a antibióticos
<i>Salmonella Typhi</i>	ENCB-IPN	Referencia n= 1	Resistencia a antibióticos

3.5.1 Verificación de la pureza de las cepas bacterianas patógenas

Las cepas bacterianas descritas en la Tabla 1 se inocularon por estría cruzada en cajas Petri con caldo Lisogenia (LB, por su acrónimo en inglés, Lysogeny broth), y

se incubaron a una temperatura de 37°C por 24-48 h. La pureza de las cepas se corroboró por morfología colonial y microscópica.

3.5.2 Preparación de los inóculos de bacterias patógenas

La siguiente metodología fue tomada y modificada de Ramírez-Ganillo *et al.* (2015), y se realizó para cada una de las cepas bacterianas patógenas por triplicado.

A partir de colonias aisladas de cada cepa se inocularon tubos con 5 mL de caldo LB y se incubaron a una temperatura de 37°C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocó 1 mL del crecimiento obtenido en microtubos y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las células bacterianas 3 veces con PBS 1X estéril.

Posteriormente se suspendieron los botones celulares obtenidos en 500 µL de PBS 1X. En un tubo con 5 mL de PBS estéril, se ajustó la suspensión de células bacterianas al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland que corresponde a una concentración de 1×10^8 bacterias/mL aproximadamente.

3.5.3 Prueba cuantitativa de inhibición el crecimiento de bacterias

Se realizaron cultivos en caldo LB de cada una de las cepas bacterianas a probar y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente los inóculos se ajustaron a una concentración bacteriana de 1×10^8 bacterias/mL aproximadamente en tubo con caldo Müller Hinton. Las microplacas de 96 pozos estériles se llenaron con 100 µL de cada solución de AgNPs y se colocaron 100 µL de cada una de las cepas bacterianas a probar y se incubaron a 37 °C por 18 horas.

Por último, se midió la absorbancia de cada uno de los pozos a 620 nm en un espectrofotómetro Multiskan FC (Thermo Scientific) para determinar el efecto de los compuestos probados. Los resultados fueron tratados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($P < 0,001$) con el paquete estadístico GraphPad Prism.

4. Resultados y discusión

4.1. Extractos orgánicos de *Tecoma stans*

El rendimiento de los extractos orgánicos de *T. stans* se midió en porcentaje, por lo que, por cada 100 g de material vegetal, equivale a un 100%, así que el peso de extracto recuperado es el rendimiento obtenido. Se realizó el cálculo siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Gramos de extracto obtenido}}{\text{Gramos de material vegetal utilizados}} \times 100\%$$

El rendimiento obtenido para cada extracto orgánico de *T. stans* se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Rendimiento de extractos orgánicos de *T. stans*

Disolvente orgánico	Peso del extracto (g)	Rendimiento %
Hexano	8	8
Acetato de Etilo (AcOEt)	10	10
CH ₂ Cl ₂	11	11
Me ₂ CO	12	12
MeOH	41	41

4.2. Síntesis verde de AgNPs

Los resultados obtenidos los podemos observar en las fig. 2, 3 y 4, en donde se muestra un plasmón característico de la plata a 420-460 nm, obtenidos mediante un Uv-Vis. Mediante microscopia electrónica de barrido se obtuvieron la imagen 1a y 1b en la cual podemos observar la forma y tamaño de las nanopartículas a una distancia de 25000 y 100000 x, obteniendo una plata coloidal de un tamaño aproximado de 30nm. En la tabla 2 encontramos el análisis Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), en el cual se muestran los componentes de las nanopartículas.

La tabla 3 nos muestra los resultados de EDS, demuestran que el 63.55% del elemento dominante es plata, también se encontró Si, S y Cl como contaminación del pin al momento de ingresar la muestra.

Tabla 3. EDS de AgNPs

Element	Wt %	At %
C K	11.59	35.46
O K	11.26	25.88
NaK	4.68	7.48
SiK	0.8	1.05
S K	0.53	0.61
ClK	7.59	7.87
AgL	63.55	21.65
Total	100	100

En la figura 2 en el inciso a encontramos una aglomeración de AgNPs a 25000x, en el inciso b AgNPs a 100 000 x, forma coloidal, diferentes tamaños de nanopartículas, imágenes obtenidas por SEM.

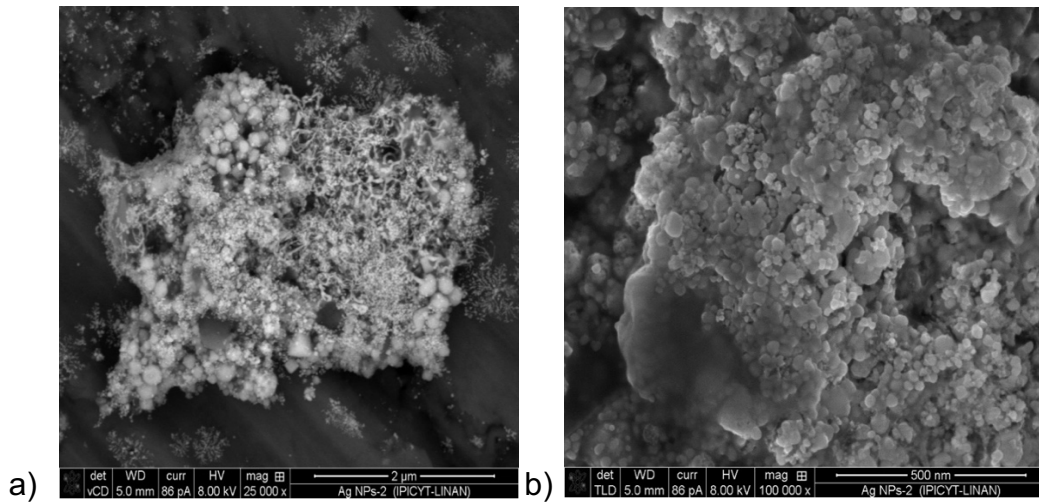


Figura 2. AgNPs observadas en SEM.

En la figura 3 encontramos en el Uv-Vis el plasmón característico de plata, confirmando la existencia de plata en las nanopartículas en un pico característico de 410-440nm

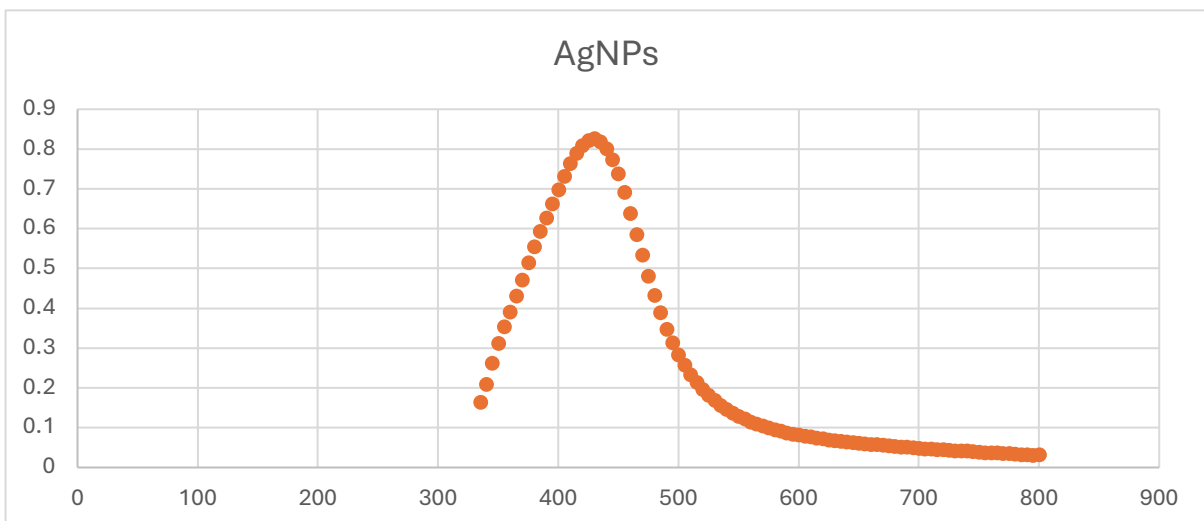


Figura 3. Espectro Uv-vis de AgNPs.

En la figura 4 se aprecian partículas de forma principalmente esférica a cuasi-esférica, lo cual es típico en nanopartículas de plata sintetizadas por extractos vegetales, algunas partículas aparecen como agregados probablemente por interacción entre sí o por restos de compuestos orgánicos del extracto que actúan como agentes de recubrimiento (capping agents).

Los puntos más brillantes corresponden a las nanopartículas metálicas (AgNPs), mientras que las zonas más opacas corresponden a la matriz orgánica del extracto vegetal. El hexano es un solvente no polar, así que los compuestos que reducen la plata aquí son principalmente terpenoides, esteroides, compuestos lipofílicos. Esto explica por qué vemos partículas recubiertas de material orgánico y cierta tendencia al aglomerado.

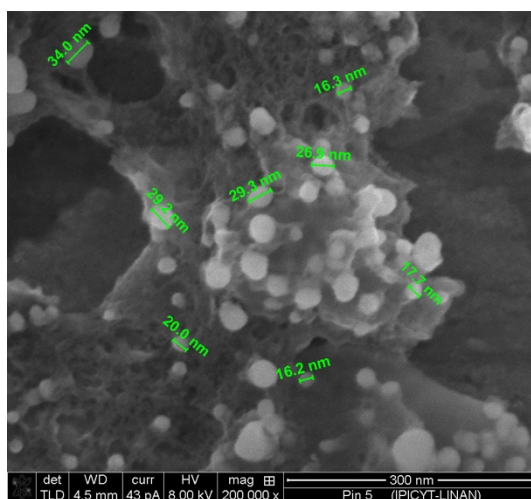


Figura 4. AgNPs sintetizadas de extracto hexánico.

En la figura 5 observamos estructuras que son aglomerados de nanopartículas con morfología principalmente esférica, observamos principalmente cluster formados por la unión de nanopartículas de plata. La formación de partículas tan grandes podemos deducirla por la falta de estabilizante a la hora de realizar la síntesis.

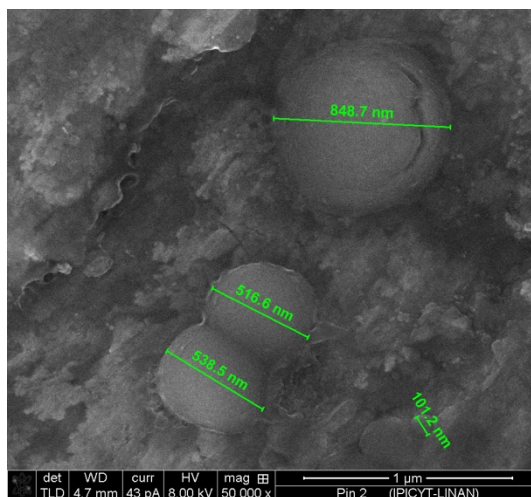


Figura 5. AgNPs de extracto CH_2Cl_2 .

En la figura 6 observamos partículas con forma esférica/semiesférica distribuidas de manera irregular sobre la superficie, muchas de ellas parecen aglomeradas, formando racimos compactos. La superficie de fondo corresponde a restos orgánicos del extracto que actúa como estabilizante.

La presencia de partículas con contraste más brillante que el fondo indica la presencia de un elemento más pesado que corresponde a la plata reducida. Una de las posibles razones del tamaño se puede deber a aglomeración por falta de estabilizante en el extracto (los compuestos fenólicos, flavonoides, etc., pudieron no haber sido suficientes).

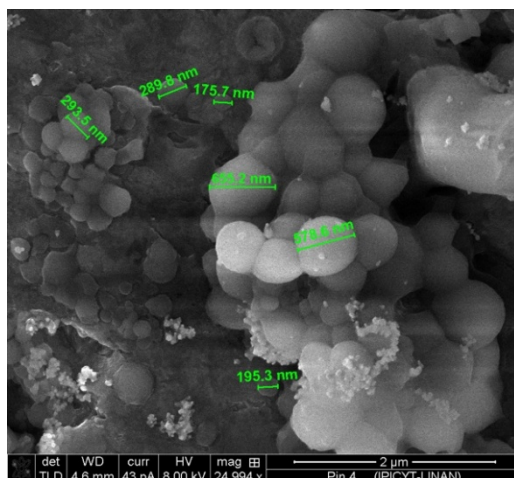


Figura 6. AgNPs sintetizadas de extracto de AcOET.

En la figura 7 observamos partículas brillantes sobre un fondo más oscuro y rugoso, lo que sugiere que las zonas claras son nanopartículas metálicas (Ag) mientras que el fondo corresponde a restos de matriz orgánica del extracto vegetal (*T. stans*) se ven aglomeradas en racimos, podemos deducir que la tendencia a aglomerados se debe principalmente a la falta de estabilizantes (fenoles, flavonoides, etc.), de igual forma, la síntesis verde tiende a tener una distribución polidiversa.

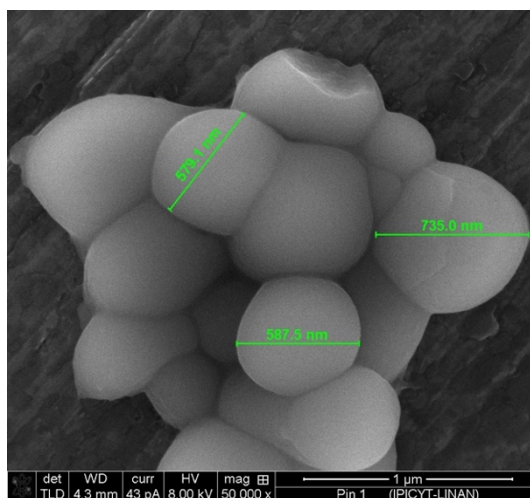


Figura 7. AgNPs de extracto acetónico.

En la figura 8 observamos una morfología de “coliflor/granular”: dominios redondeados y coalescidos, con bordes suaves y halos. Estos aglomerados son típicos de nanopartículas de Ag embebidos o recubiertos por matriz orgánica del extracto, el contraste brillante concuerda con islas más conductoras sobre un fondo orgánico, la posible razón para el tamaño y aglomerado podría deberse a un capping débil o falta de polifenoles, flavonoides, azúcares, proteínas, etc., los cuales se adsorben en la superficie de la NP de plata.

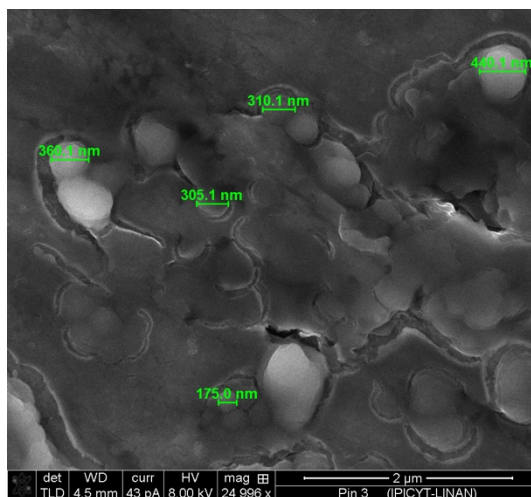


Figura 8. AgNPs sintetizadas de extracto metanólico.

En las figuras 9 y 10 notamos un plasmón entre los 600nm mostrando así el material verde de las plantas.

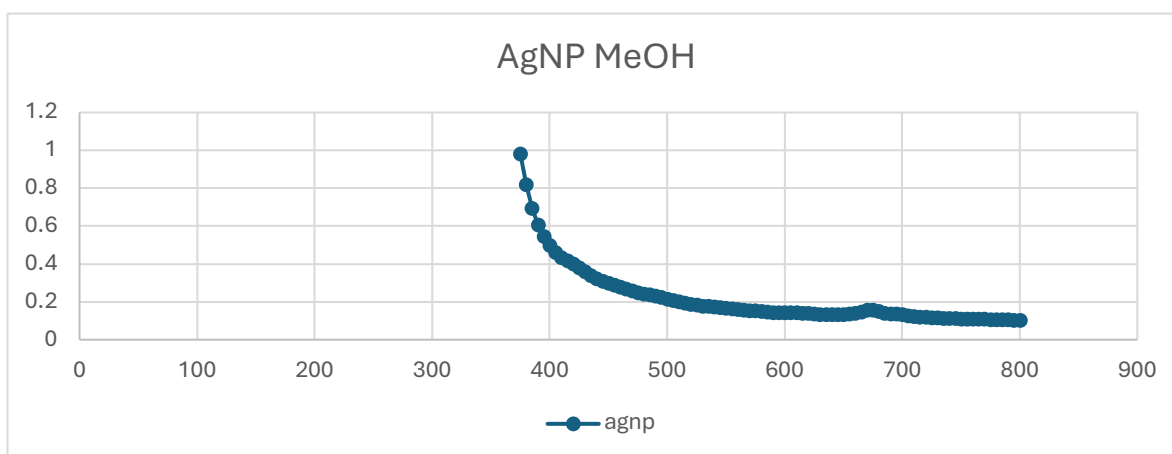


Figura 9. Espectro Uv-Vis de AgNPs con extracto metanólico.

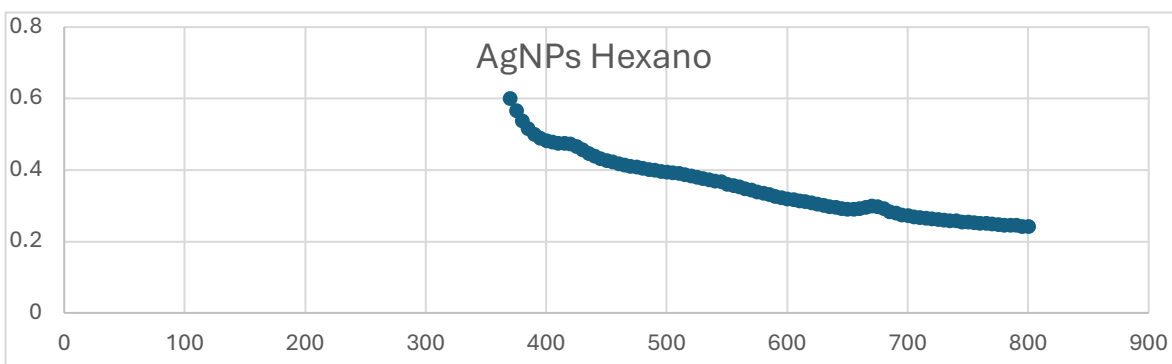


Figura 10. Espectro Uv-Vis de AgNPs con extracto hexánico.

En la tabla 4 observamos el análisis EDS realizado sobre las regiones brillantes observadas confirmó la presencia mayoritaria de plata (Ag), consistente con los agregados de AgNPs sintetizados con extracto de *T. stans*. En la cuantificación se detectaron señales menores de Al, K y Mg. La aparición de Al se atribuye a la contribución del porta muestras de aluminio dentro del volumen de interacción del haz a 8 kV, mientras que K y Mg corresponden a trazas residuales del proceso de síntesis o del entorno.

Tabla 4. Análisis EDS

<i>Element</i>	<i>Wt %</i>	<i>At %</i>	<i>K-Ratio</i>	<i>Z</i>	<i>A</i>	<i>F</i>
C K	5.78	23.66	0.0438	1.3258	0.5713	1.0000
O K	7.63	23.45	0.0291	1.2891	0.2958	1.0001
MgK	0.64	1.30	0.0056	1.2397	0.7050	1.0020
AlK	9.11	16.59	0.0862	1.1889	0.7939	1.0023
AgL	76.83	35.00	0.6915	0.8970	1.0034	1.0000
Total	100.000	100.000				
<i>Element</i>	<i>Net Inte.</i>	<i>Bkgd Inte.</i>	<i>Inte. Error</i>	<i>P/B</i>		
C K	14.36	0.24	5.37	59.83		
O K	17.00	0.48	4.99	35.42		
MgK	2.96	0.40	13.10	7.40		
AlK	40.64	1.04	3.22	39.08		
AgL	61.96	0.44	2.56	140.82		

4.3. Toxicidad en *A. salina*

Los resultados del ensayo de toxicidad del extracto hexánico se encuentran en la Tabla 5, del extracto de acetato de etilo se muestra en la Tabla 6, del extracto de diclorometano se muestra en la Tabla 7, del extracto acetónico en la Tabla 8 y del extracto metanólico en la Tabla 9. Se observaron las diferencias de toxicidad de cada extracto, esto lo notamos por las diferencias de fitoquímicos que posee cada extracto, En las Tablas 10-16 se muestran los resultados de los extractos con nanopartículas.

En la tabla 5 observamos que el extracto hexánico presentó muy baja toxicidad ante *A. salina*, esto debido a los fitoquímicos por los cuales se conforma, que son principalmente lípidos, ceras, clorofilas, carotenoides y terpenos no polares

Tabla 5. Toxicidad en *A. salina* con extracto hexánico

Ensayo <i>A. Salina</i>			
Extracto hexánico			
Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Nauplios vivos antes de agregar extractos	Nauplios 24 hrs después de agregar extractos	% Mortalidad
Control	20	20	0
125	20	20	0
250	20	20	0
500	20	20	0
1000	20	19	3.33333333

En la tabla 6 observamos que, a baja concentración, obtenemos una mayor letalidad que a concentraciones mayores esto puede deberse a que algunos compuestos pueden agregarse, precipitar o formar micelas, reduciendo la fracción biodisponible.

Tabla 6. Toxicidad en *A. salina* con extracto de acetato de etilo

Ensayo <i>A. salina</i>			
Extracto acetato de etilo			
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Nauplios vivos antes de agregar extractos	Nauplios 24 hrs después de agregar extractos	% mortalidad
Control	20	20	0
125	20	5	77
250	20	18	12
500	20	19	3
1000	20	17	17

En la tabla 7 observamos que el extracto de diclorometano cuenta con una toxicidad nula, esto debido a los fitoquímicos por los cuales se conforma, que son principalmente terpenoides, esteroides, algunos alcaloides no polares

Tabla 7. Toxicidad en *A. salina* con extracto de diclorometano

Ensayo <i>A. salina</i>			
Extracto CH_2Cl_2			
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Nauplios vivos antes de agregar extractos	Nauplios 24 hrs después de agregar extractos	% mortalidad
Control	20	20	0
125	20	20	0
250	20	20	0
500	20	20	0
1000	20	20	0

En la tabla 8 observamos que el extracto acetónico cuenta con una toxicidad nula, esto debido a los fitoquímicos por los cuales se conforma, que son principalmente compuestos fenólicos y flavonoides.

Tabla 8. Toxicidad en *A. salina* con extracto acético

Ensayo <i>A. salina</i>			
Extracto acético			
Concentración (µg/mL)	Nauplios vivos antes de agregar extractos	Nauplios 24 hrs después de agregar extractos	% mortalidad
Control	20	20	0
125	20	20	0
250	20	20	0
500	20	20	0
1000	20	20	0

En la tabla 9 observamos que el extracto metanólico cuenta con una toxicidad baja a bajas concentraciones, pero en concentraciones altas, observamos una toxicidad significativa, esto debido a los fitoquímicos como los polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, compuestos hidrofílicos.

En la tabla 10 observamos que a pequeñas concentraciones no se encuentran rastros de toxicidad, pero a concentraciones mayores observamos una toxicidad baja, esto puede ser debido a que, al transcurrir el tiempo, se formaron clousters de nanopartículas y formación de agregados.

Tabla 9. Toxicidad en *A. salina* con extracto de MeOH

Ensayo <i>A. salina</i>			
Extracto metanólico			
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Nauplios vivos antes de agregar extractos	Nauplios 24 hrs después de agregar extractos	% mortalidad
Control	20	20	0
125	20	20	0
250	20	19	5
500	20	16	20
1000	20	12	38.33333333

Tabla 10. Toxicidad en *A. salina* utilizando AgNPs

Ensayo <i>A. salina</i>				
AgNPs				
Concentraciones	($\mu\text{g/mL}$)	Nauplios vivos antes de agregar AgNPs	Nauplios 24 hrs después de agregar AgNPs	% Mortalidad
Control		13	13	0
21.56		13	13	0
43.12		13	13	0
64.68		13	11	15.3846154
86.24		13	12	7.69230769

En la tabla 11 observamos una mortalidad moderada-baja a bajas concentraciones, pero a concentraciones mayores de 50 $\mu\text{g/mL}$, tenemos una mortalidad mayor al 50%, posiblemente debido a formación de clousters.

Tabla 11. Toxicidad en *A. salina* utilizando AgNPs con extracto hexánico

Ensayo <i>A. salina</i>				
AgNP sintetizadas con extracto Hexánico				
Concentraciones	($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Nauplios vivos antes de agregar extractos	Nauplios 24 hrs después de agregar extractos	% Mortalidad
Control		14	14	0
21.56		14	12	17.85714286
43.12		14	13	10.71428571
64.68		14	2	85.71428571
86.24		14	0	100

En la Tabla 12 observamos una mortalidad moderada-alta desde concentraciones bajas, así que además de formación de clousters, posiblemente los fitoquímicos encargados de la síntesis de las AgNPs suelen ser tóxicos.

Tabla 12. Toxicidad en *A. salina* utilizando AgNPs con extracto de CH_2Cl_2

Ensayo <i>A. salina</i>			
AgNP sintetizadas con extracto diclorometano			
Concentraciones	Nauplios vivos antes de	Nauplios 24 hrs después	%Mortalidad
($\mu\text{g}/\text{mL}$)	agregar extractos	de agregar extractos	
Control	20	20	0
21.56	20	7	67
43.12	20	10	52
64.68	20	10	52
86.24	20	5	75

En la tabla 13 observamos una mortalidad alta en la mayoría de las concentraciones analizadas, por lo tanto, los fitoquímicos encargados de la síntesis son tóxicos.

Tabla 13. Toxicidad en *A. salina* utilizando AgNPs con extracto de AcOET

Ensayo <i>A. salina</i>			
AgNP sintetizadas con extracto AcOET			
Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)	Nauplios vivos antes de agregar extractos	Nauplios 24 hrs después de agregar extractos	%Mortalidad
Control	20	20	2
21.56	20	11	47
43.12	20	0	100
64.68	20	0	100
86.24	20	0	100

En la tabla 14 observamos que los compuestos encontrados en el extracto acetónico utilizado para la formación de las AgNPs, cuenta con toxicidad alta, ya que, desde concentraciones bajas, observamos una toxicidad del 100%, lo cual es un indicador de los compuestos que rodean las nanopartículas son tóxicos.

En la tabla 15 observamos que al igual que con el extracto acetónico, el uso del extracto metanólico y su composición principalmente de fitoquímicos fenólicos, los cuales suelen ser tóxicos a concentraciones altas, muestran esa toxicidad potencializada al ser usados para sintetizar nanopartículas.

Tabla 14. Toxicidad en *A. salina* utilizando AgNPs con extracto acetónico

Ensayo <i>A. salina</i>			
AgNP sintetizadas con extracto acetónico			
Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Nauplios vivos antes de agregar extractos	Nauplios 24 hrs después de agregar extractos	%Mortalidad
Control	20	0	100
21.56	20	0	100
43.12	20	0	100
64.68	20	0	100
86.24	20	0	100

Tabla 15. Toxicidad en *A. salina* utilizando AgNPs con extracto de MeOH

Ensayo <i>A. salina</i>			
AgNP sintetizadas con extracto MeOH			
Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Nauplios vivos antes de agregar extractos	Nauplios 24 hrs después de agregar extractos	%Mortalidad
Control	20	20	0
21.56	20	9	55
43.12	20	5	75
64.68	20	0	100
86.24	20	0	100

En la tabla 16 observamos la LC50

Tabla 16. IC50 extractos vs AgNPs

Extracto/AgNPs	LC50 (µg/mL)	Clasificación de Toxicidad
Extracto Hexánico	> 1000	No tóxico
Extracto Diclorometano	> 1000	No tóxico
Extracto AcOET	518.75	Ligeramente tóxico
Extracto Metanólico	500	Ligeramente tóxico
Extracto Acetónico	> 1000	No tóxico
AgNP solas (sin extracto)	> 86.24	Moderadamente tóxico
AgNPs con Extracto Hexánico	< 86	Tóxico
AgNP con extracto diclorometano	42.79	Tóxico
AgNPs con Extracto AcOET	< 21.56	Tóxico
AgNPs con Extracto Acetónico	< 21.56	Tóxico
AgNPs con Extracto Metanólico	< 21.56	Tóxico

Según los criterios de Meyer et al. (1982) y Clarkson et al. (2004):

Tóxico: LC50 < 100 µg/mL; Moderadamente tóxico: LC50 = 100-500 µg/mL; Ligeramente tóxico: LC50 = 500-1000 µg/mL; No tóxico: LC50 > 1000 µg/mL.

Los extractos hexánico, diclorometano y acetónico mostraron toxicidad mínima (0-3.3% mortalidad máxima), atribuible a la presencia de compuestos de baja toxicidad como lípidos, ceras, clorofilas, terpenos. Los extractos de acetato de etilo (LC50 = 518.75 µg/mL) y metanólico (LC50 = 500.00 µg/mL) mostraron toxicidad limitada, probablemente debido a compuestos fenólicos de polaridad media.

Las AgNPs con extracto hexánico mostraron una $LC_{50} > 86 \mu\text{g/mL}$, comportamiento similar que con las AgNPs sin extracto. AgNPs con extractos diclorometano, acetato de etilo, acetónico y metanólico son altamente tóxicos, indicando que los fitoquímicos fenólicos y compuestos orgánicos que recubren las nanopartículas potencializan significativamente la toxicidad, posiblemente por mayor biodisponibilidad o sinergia con los iones de plata.

4.4. Potencial antioxidante

Los resultados de las pruebas antioxidantes en extractos puros se encuentran en las Figuras 14-18, mostrando la capacidad antioxidante de cada extracto con su respectivo disolvente de extracción, notamos que los extractos con mayor capacidad antioxidante son los extractos acetónicos y metanólicos, mostrando una capacidad antioxidante a una concentración baja.

De las AgNPs de las Figuras 19-23, las AgNPs provenientes de extractos más polares (Acetona y Metanol) presentaron mayor capacidad antioxidante, lo cual indica que los compuestos fenólicos adsorbidos en la superficie de las nanopartículas contribuyen al mecanismo antioxidante. Las figuras a) nos muestran el porcentaje de capacidad antioxidante respecto al tiempo transcurrido y las figuras b) nos muestran el porcentaje de capacidad antioxidante respecto a las diferentes concentraciones utilizadas.

En la figura 11 el extracto de *T. stans* obtenido con hexano mostró una actividad antioxidante moderada, observándose un incremento progresivo en el porcentaje de inhibición conforme a) se aumentaba la concentración del extracto y b) aumentaba el tiempo de reacción. Esto sugiere que los compuestos extraídos en la fracción no polar poseen cierta capacidad para estabilizar radicales libres, aunque su efecto es limitado comparado con extractos obtenidos con disolventes de mayor polaridad.

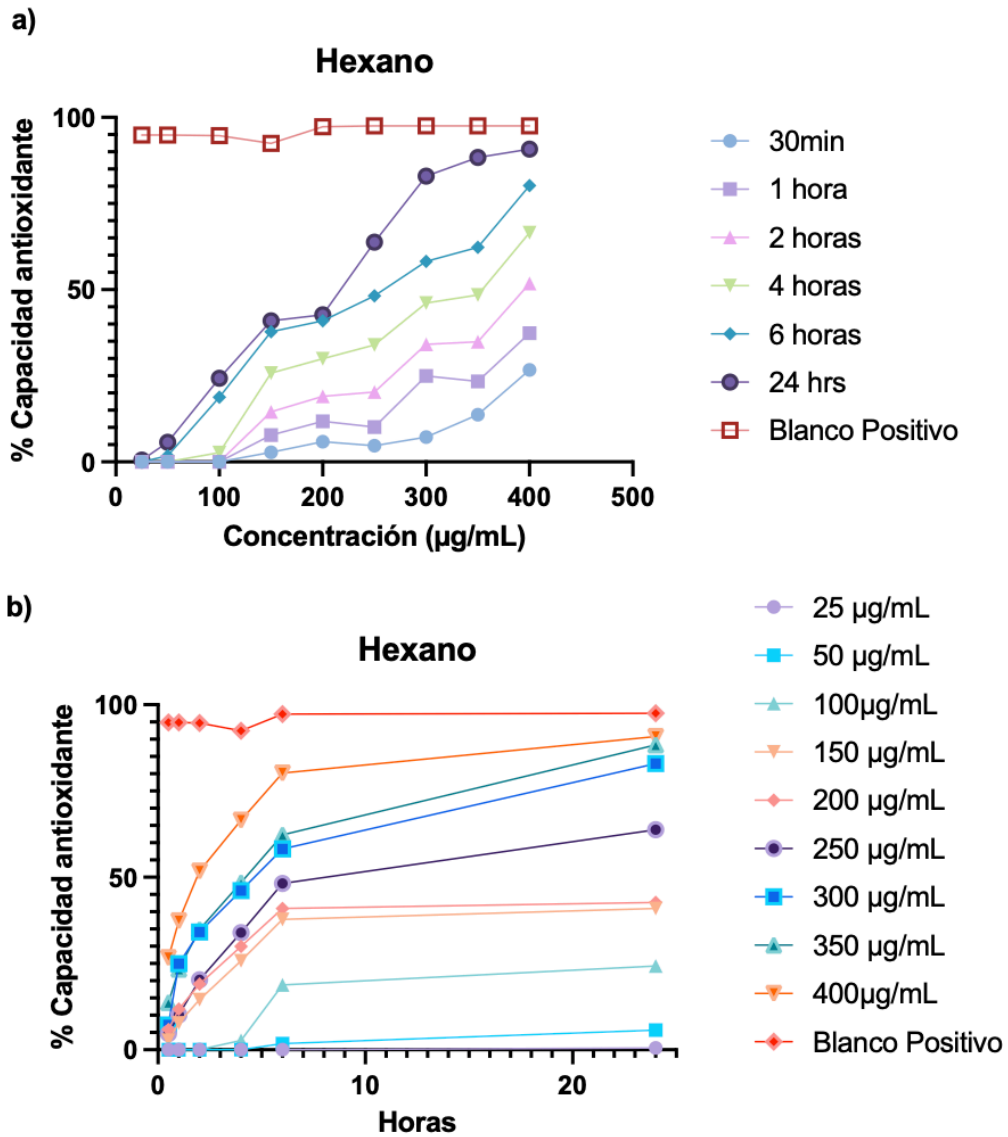


Figura 11. Capacidad antioxidante del extracto hexánico de *T. stans*.

En la figura 12 observamos que el extracto de *T. stans* con CH₂Cl₂ (diclorometano) se observó una baja inhibición radicalaria, especialmente en concentraciones menores. La actividad antioxidante solo se volvió apreciable a concentraciones altas y tiempos prolongados, lo cual indica una presencia reducida de compuestos antioxidantes en esta fracción, posiblemente debido a la baja capacidad de este disolvente para extraer metabolitos fenólicos o flavonoides.

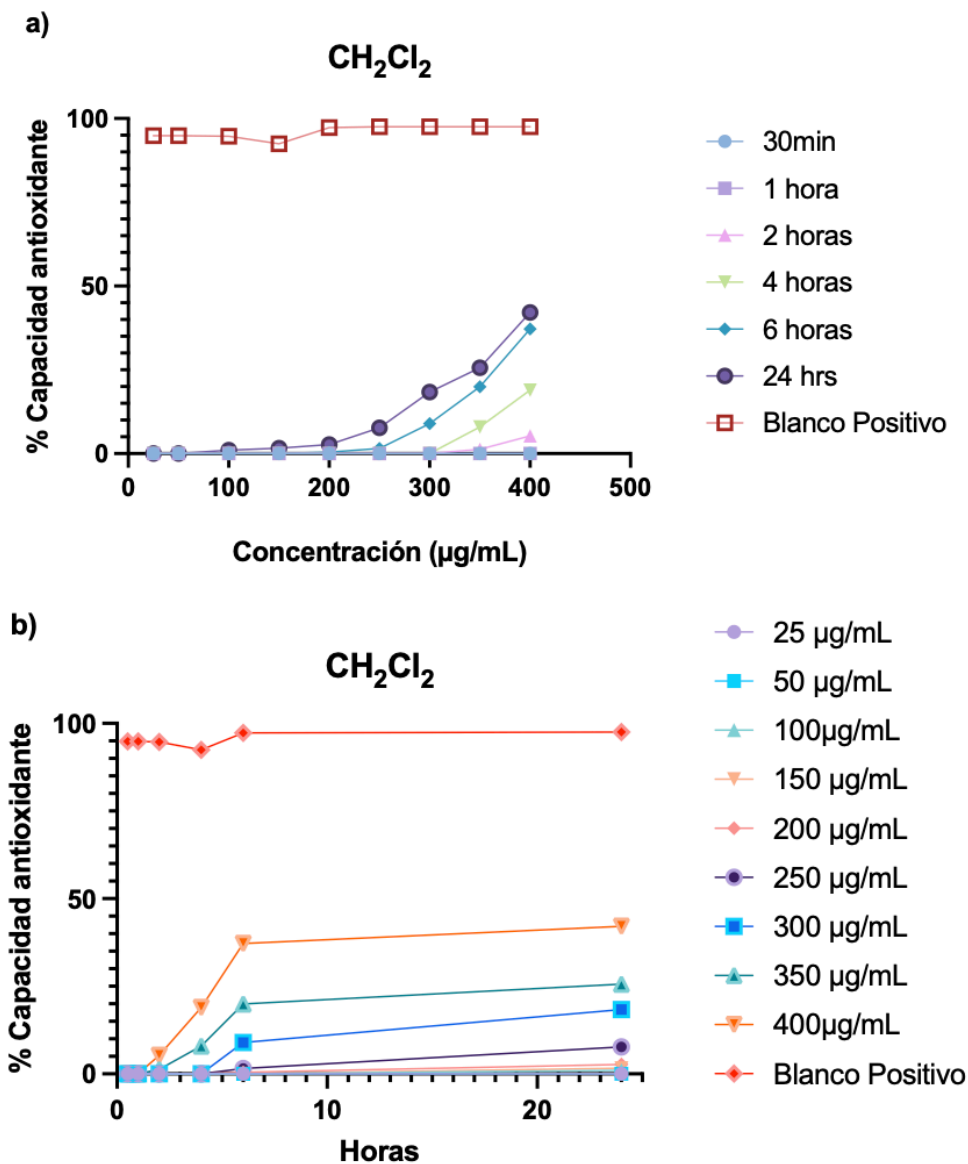


Figura 12. Capacidad antioxidante del extracto de *T. stans* con CH₂Cl₂.

En la tabla 13 observamos que el extracto de *T. stans* con acetato de etilo presentó una actividad inicial baja, pero un incremento notable en la inhibición antioxidante a altas concentraciones y a 24 h. Esto indica que en este extracto se encuentran compuestos antioxidantes de polaridad intermedia, que requieren mayor dosis para mostrar efecto significativo.

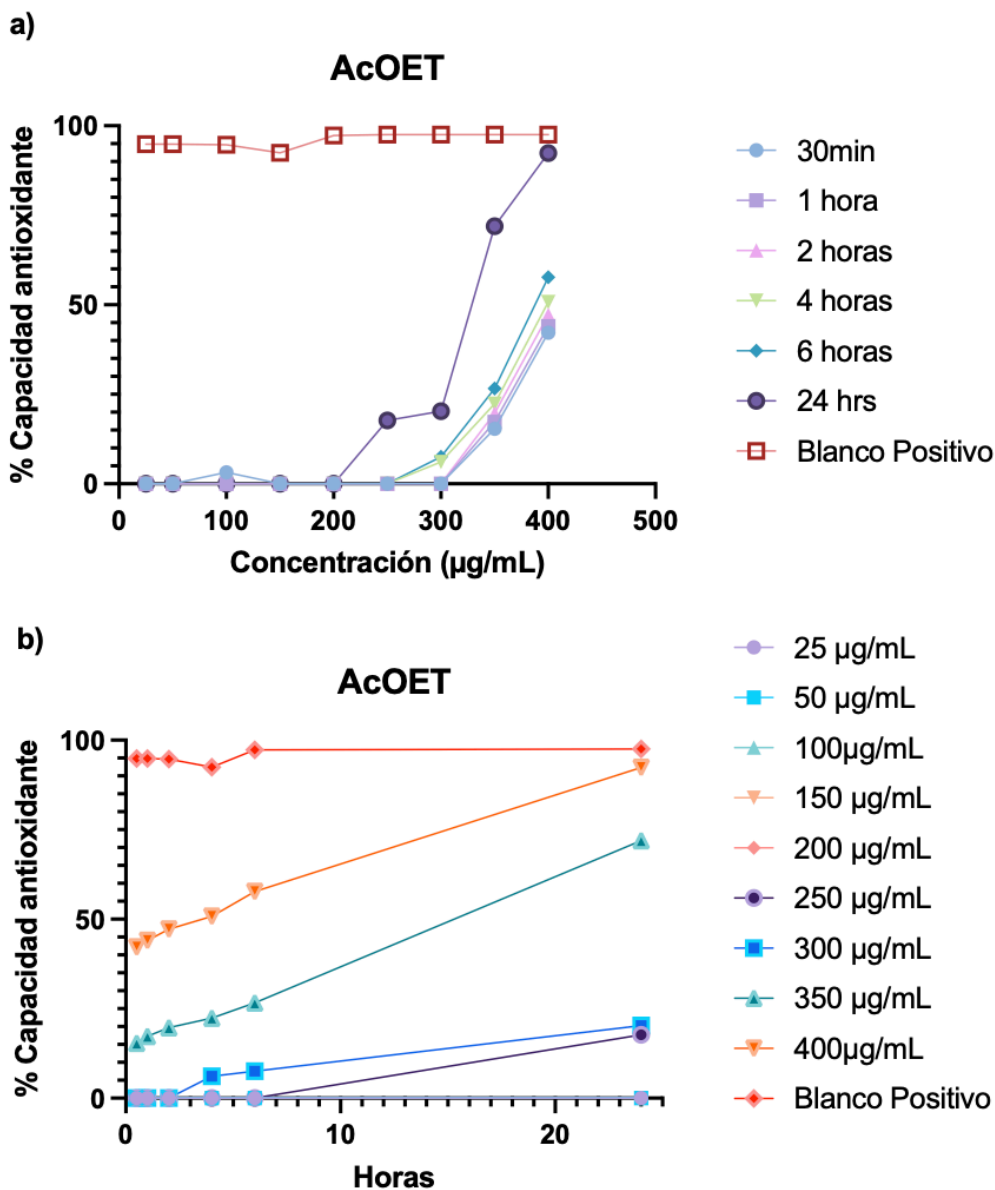


Figura 13. Capacidad antioxidante del extracto de *T. stans* con AcOET.

En la figura 14 observamos que el extracto de *T. stans* en acetona mostró una respuesta rápida y creciente, alcanzando valores de inhibición cercanos a los del control positivo en el tiempo de 24 h. Esto sugiere que en esta fracción se concentraron metabolitos antioxidantes activos y con alta afinidad por radicales libres. La acetona, al tener polaridad intermedia-alta, facilita la extracción de flavonoides y polifenoles.

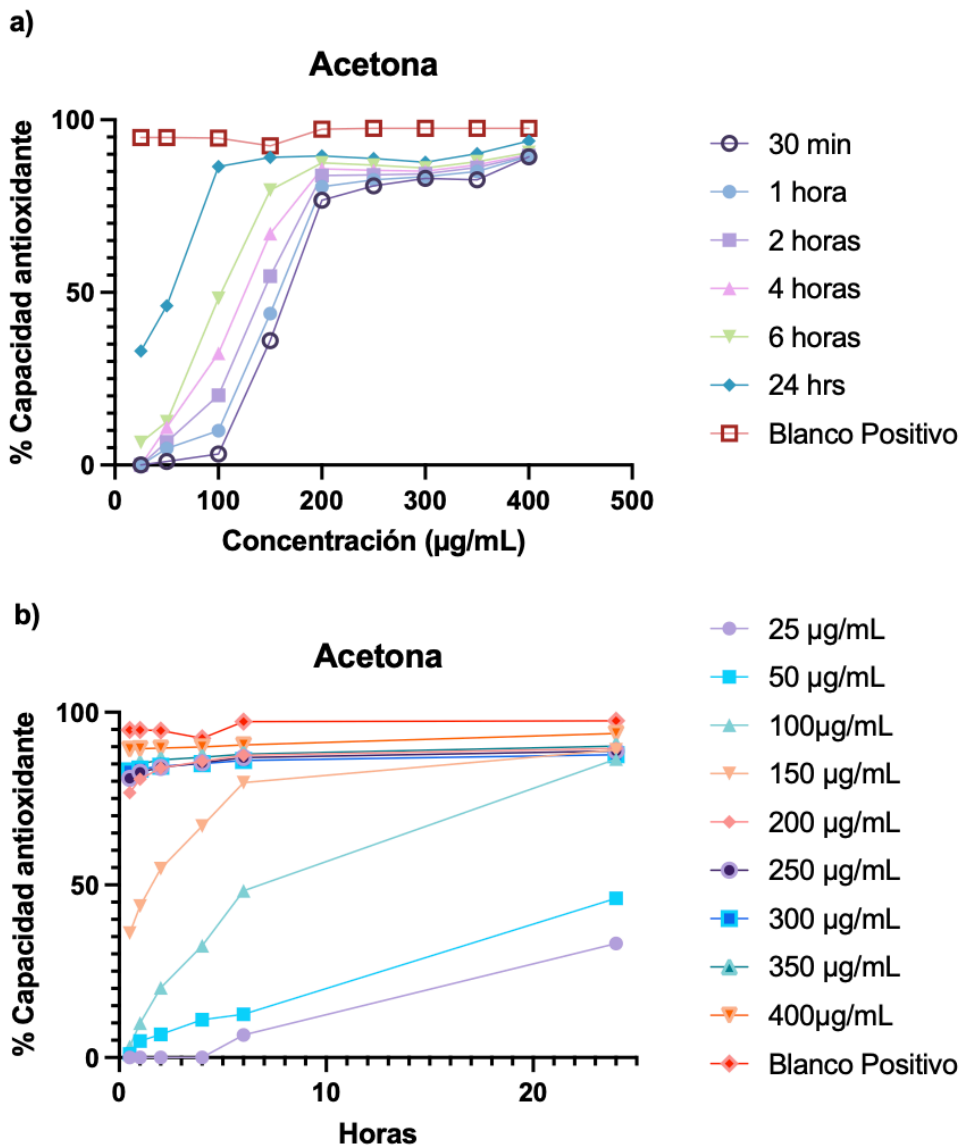


Figura 14. Capacidad antioxidante del extracto de *T. stans* con acetona.

En la figura 15 observamos que el extracto metanólico presentó la actividad antioxidante más alta entre todos los solventes evaluados. Incluso a bajas concentraciones, se observó una inhibición significativa y muy cercana al control positivo.

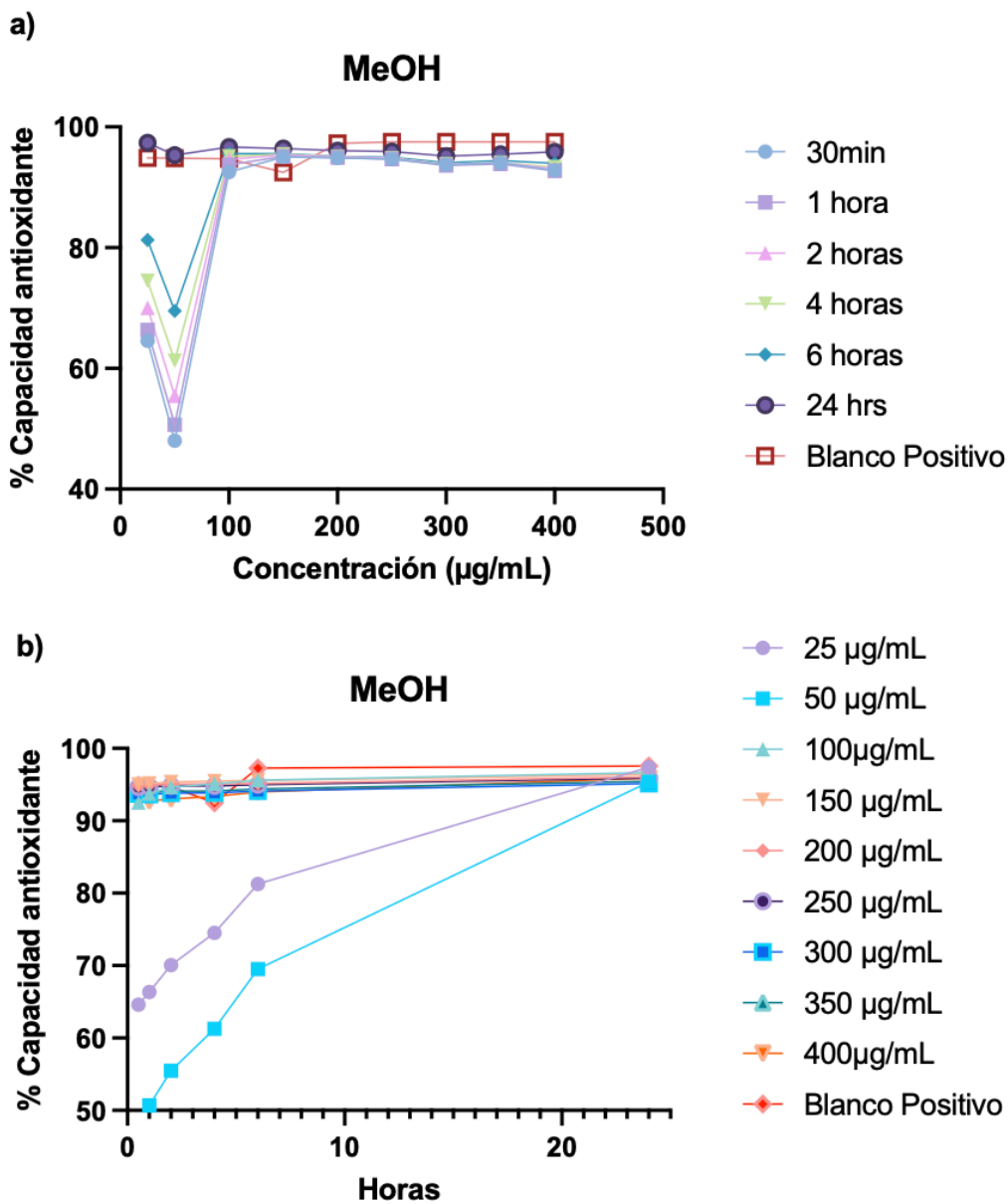


Figura 15. Capacidad antioxidante del extracto de *T. stans* con MeOH.

En la figura 16 las AgNPs obtenidas con el extracto de *T. stans* en hexano mostraron una baja capacidad antioxidante durante las primeras horas, presentando porcentajes de capacidad antioxidante menores al 30% en la mayoría de las concentraciones evaluadas. Sin embargo, a las 24 h se observa un incremento considerable en su capacidad antioxidante, alcanzando valores superiores al 50% en las concentraciones más altas, aunque el extracto en hexano contiene pocos compuestos antioxidantes disponibles para estabilizar radicales, algunos fitoquímicos no polares que permanecen en la superficie de las nanopartículas podrían contribuir a una respuesta antioxidante retardada.

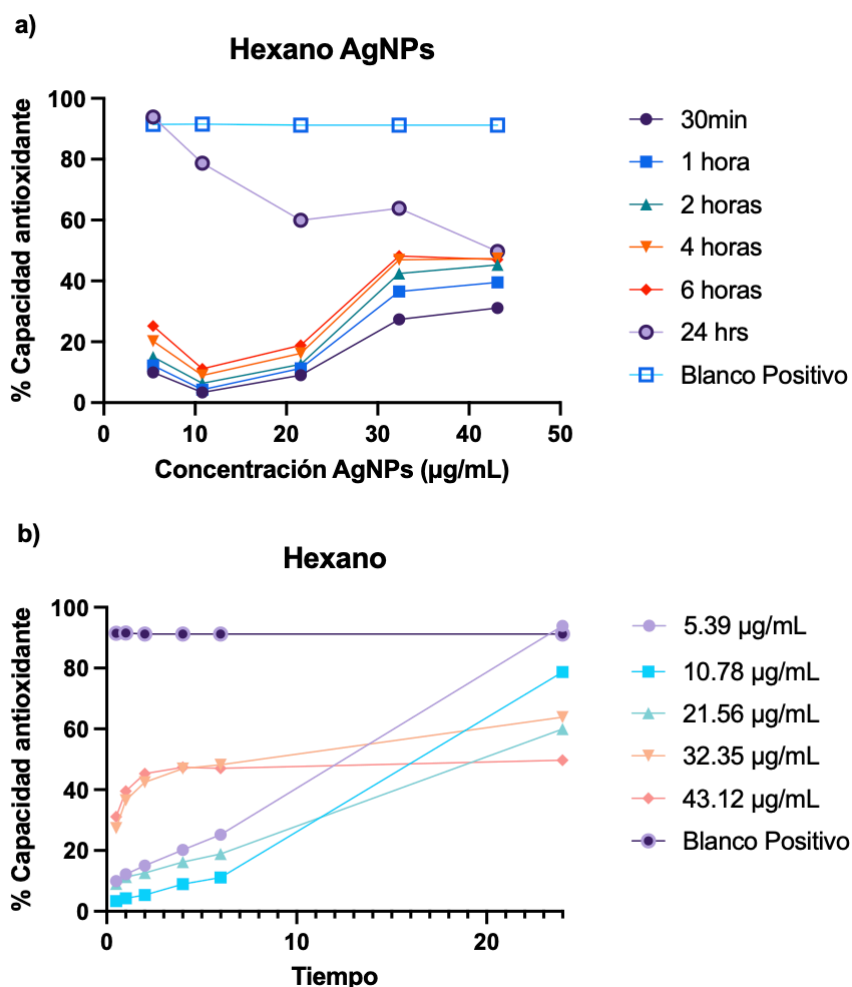


Figura 16. Capacidad antioxidante de AgNPs con extracto hexánico.

En la Figura 17 observamos que las nanopartículas sintetizadas con el extracto de *T. stans* en CH₂Cl₂ presentaron la menor actividad antioxidante entre todas las AgNPs analizadas. Los valores de capacidad antioxidante permanecieron bajos incluso tras 24 horas de reacción, y solo a concentraciones elevadas se observó una inhibición moderada. Esto sugiere que el extracto de *T. stans* en CH₂Cl₂ no aporta suficientes compuestos antioxidantes como agentes de recubrimiento en la superficie de las nanopartículas.

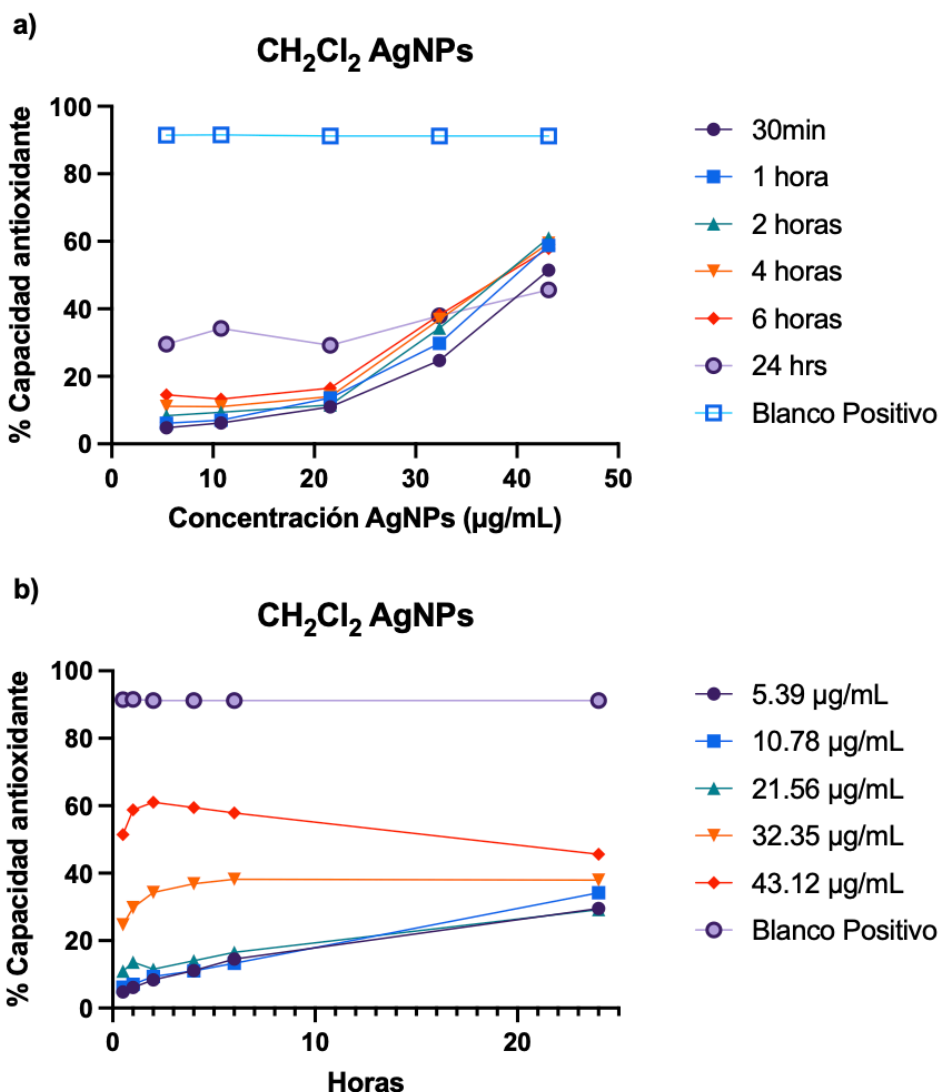


Figura 17. Capacidad antioxidante de AgNPs con extracto de CH₂Cl₂.

En la Figura 18 observamos que las AgNPs provenientes del extracto de *T. stans* en AcOEt mostraron una capacidad antioxidante intermedia. Las primeras horas de reacción reflejaron una baja actividad, a las 24 h se observó un incremento notable de la capacidad antioxidante, especialmente en concentraciones superiores.

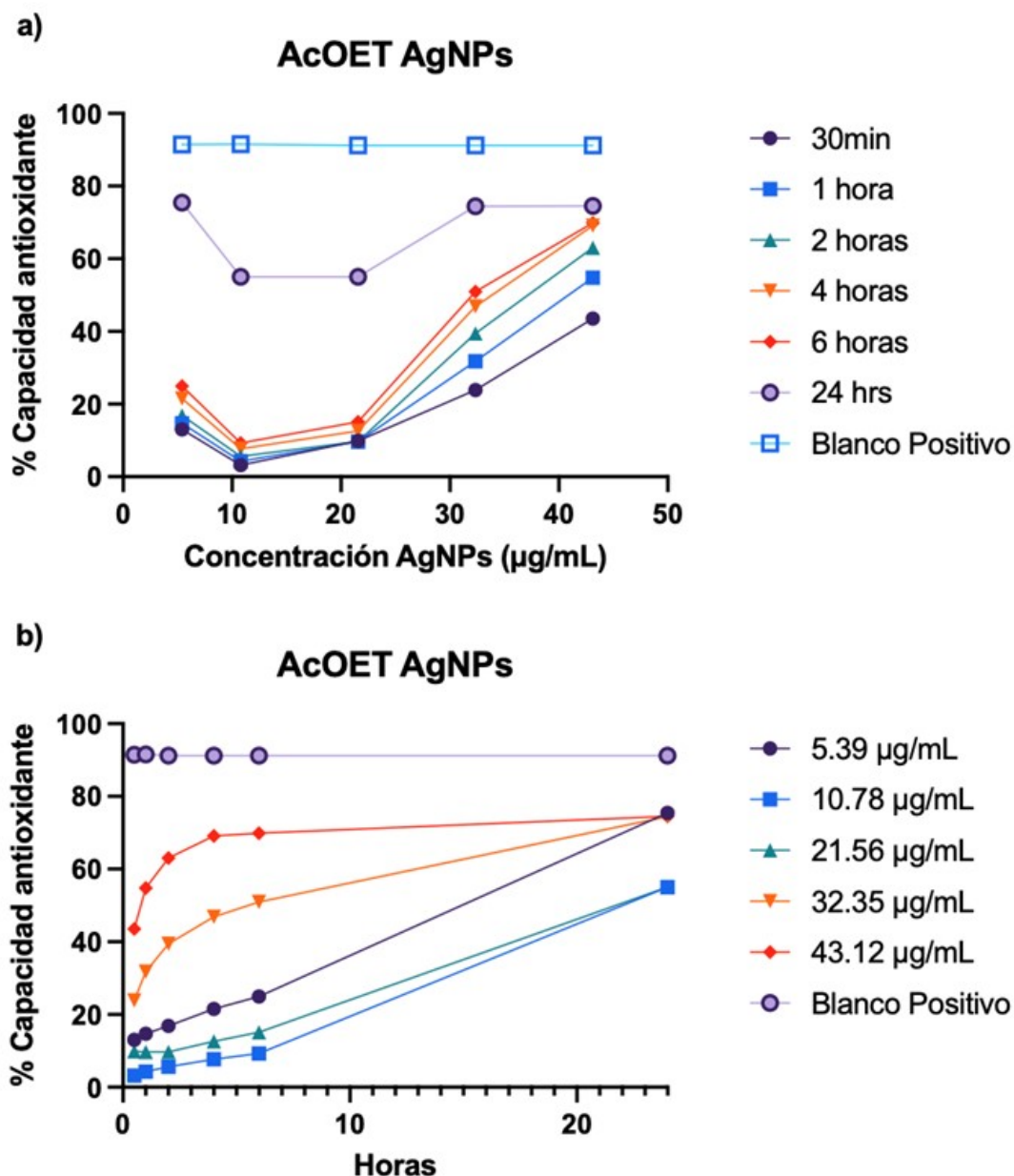


Figura 18. Capacidad antioxidante de AgNPs con AcOET.

En la Figura 19 observamos que las AgNPs sintetizadas a partir del extracto acetónico de *T. stans* presentaron una actividad antioxidante alta y progresiva, alcanzando valores cercanos al control positivo en concentraciones más altas después de 24 horas. Este comportamiento refleja los compuestos extraídos (principalmente flavonoides y fenoles de polaridad media-alta).

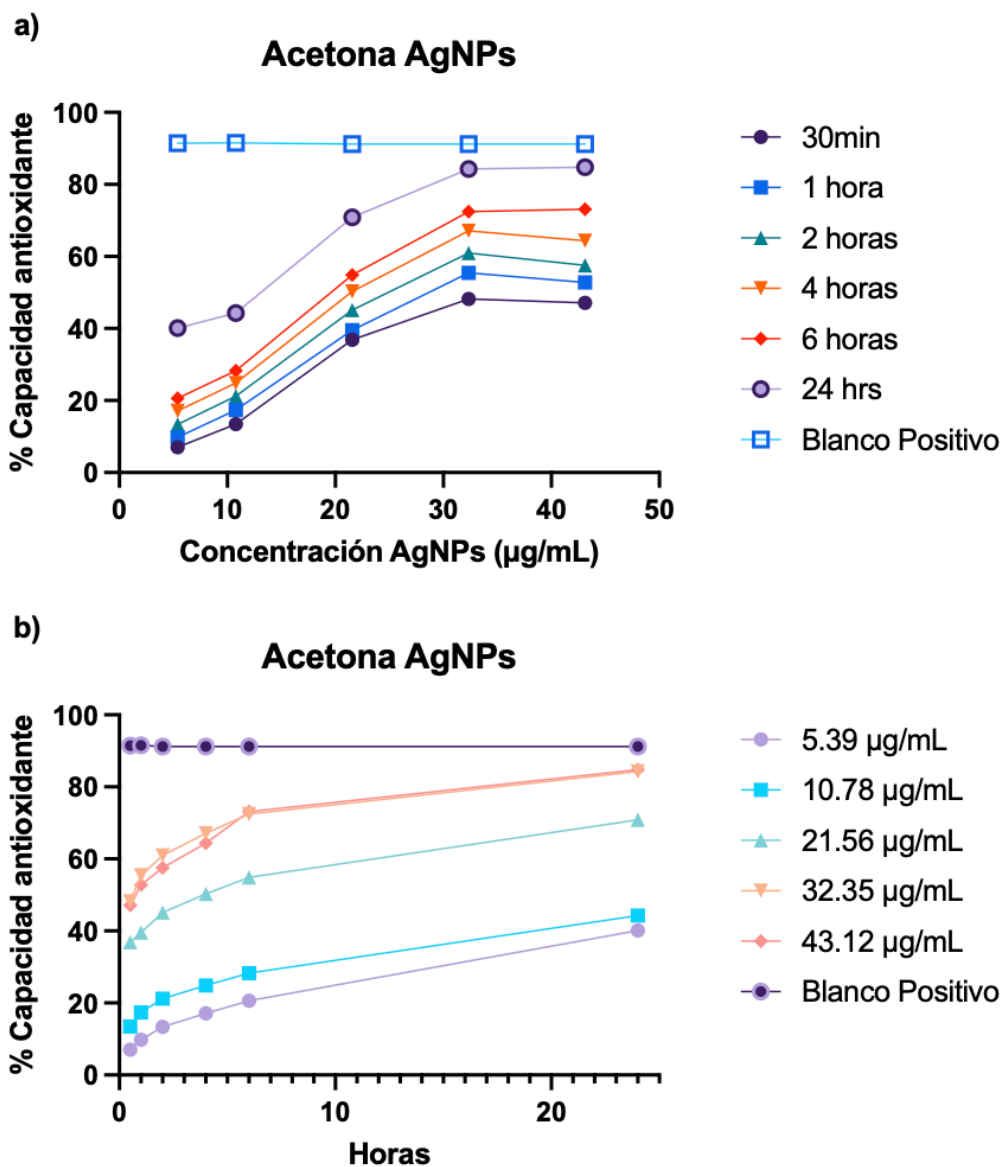


Figura 19. Capacidad antioxidante de AgNPs con extracto acetónico.

En la Figura 20 observamos que las AgNPs sintetizadas del extracto metanólico de *T. stans* mostraron la mayor capacidad antioxidante entre todas las nanopartículas evaluadas. Incluso a bajas concentraciones, los porcentajes de capacidad antioxidante fueron cercanos al control positivo. Esto confirma que las fracciones metanólicas contienen la mayor cantidad de metabolitos antioxidantes altamente polares, los cuales recubren de manera eficiente la superficie de la nanopartícula.

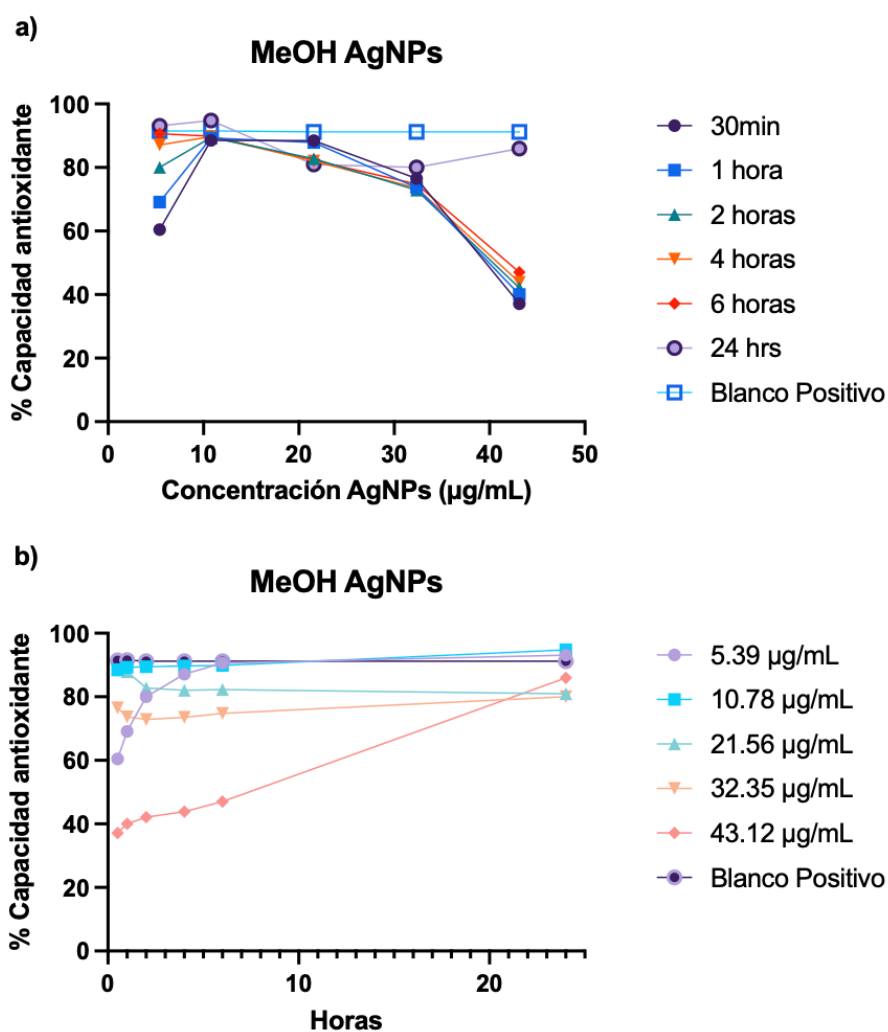


Figura 20. Capacidad antioxidante de AgNPs con extracto metanólico.

Las Figuras 24-28 nos muestran los porcentajes de capacidad antioxidante de extracto vs. AgNPs con diferentes disolventes, el análisis comparativo de la actividad antioxidante entre los extractos y las nanopartículas de plata AgNPs obtenidas con diferentes disolventes evidencia que la naturaleza del disolvente empleado durante la síntesis tiene un efecto significativo sobre la capacidad antioxidante final de las nanopartículas. Las AgNPs sintetizadas con disolventes de mayor polaridad (acetona y metanol) presentaron mayores porcentajes de actividad antioxidante en comparación con aquellas obtenidas a partir de solventes menos polares, como hexano o CH_2Cl_2 , esto podría deberse a que dichos solventes extraen preferentemente compuestos lipofílicos con menor poder reductor, limitando la transferencia de electrones necesaria para neutralizar radicales libres.

En la Figura 21 observamos que, en cuanto a una mejora en la actividad antioxidante, observamos que a las 24 horas tenemos el porcentaje de actividad más alto de las AgNPs de Hexano en comparación al extracto puro, pero solo vemos esta mejora a las 24 horas, posiblemente debido a la actividad retardada por sus fitoquímicos.

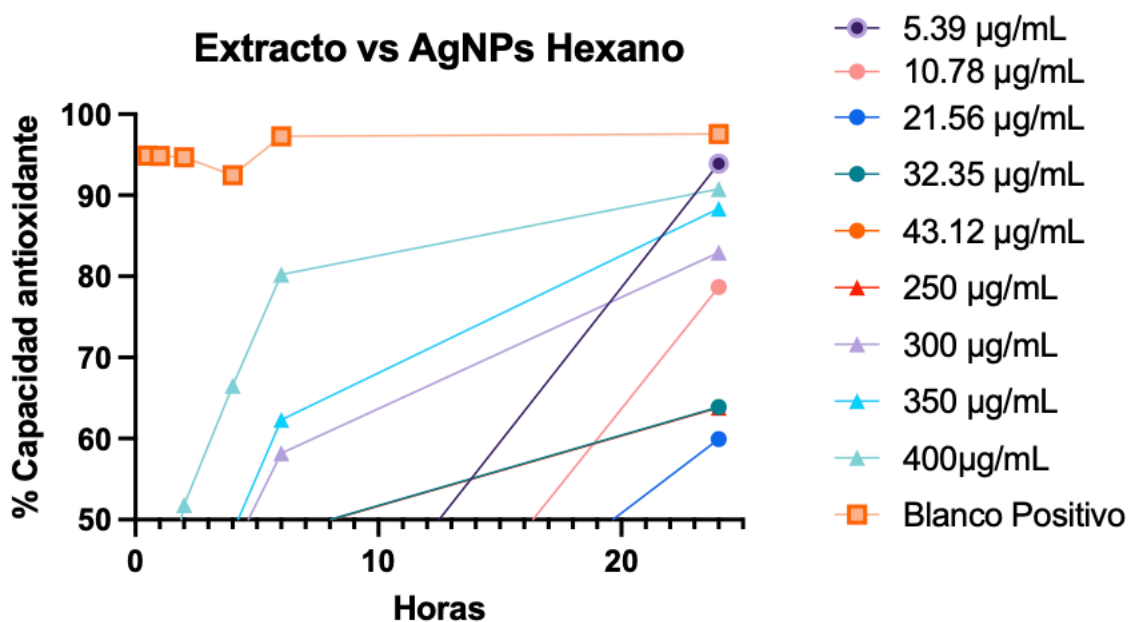


Figura 21. Actividad Antioxidante Extracto vs. AgNPs Hexano.

En la Figura 22 se observó una notable mejoría de la actividad antioxidante en las AgNPs en comparación con el extracto puro al menos durante las primeras horas observamos esta mejoría, ya que, a las 24 horas, las diferencias en cuanto a su actividad no fueron muy notorias.

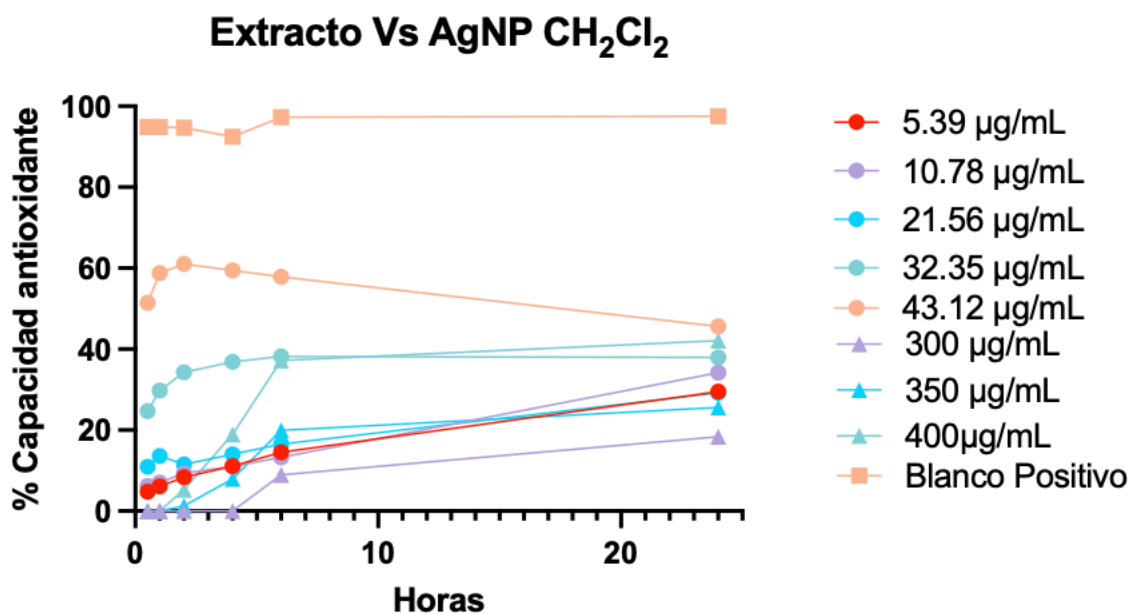


Figura 22. Actividad Antioxidante Extracto vs. AgNPs CH₂Cl₂.

En la Figura 23 se observó una actividad antioxidante significativa en las primeras horas de las AgNPs en su mayor concentración, pero también vemos que, en cuanto a las 24 horas transcurridas, observamos una mejor actividad antioxidante del extracto puro a su más alta concentración analizada.

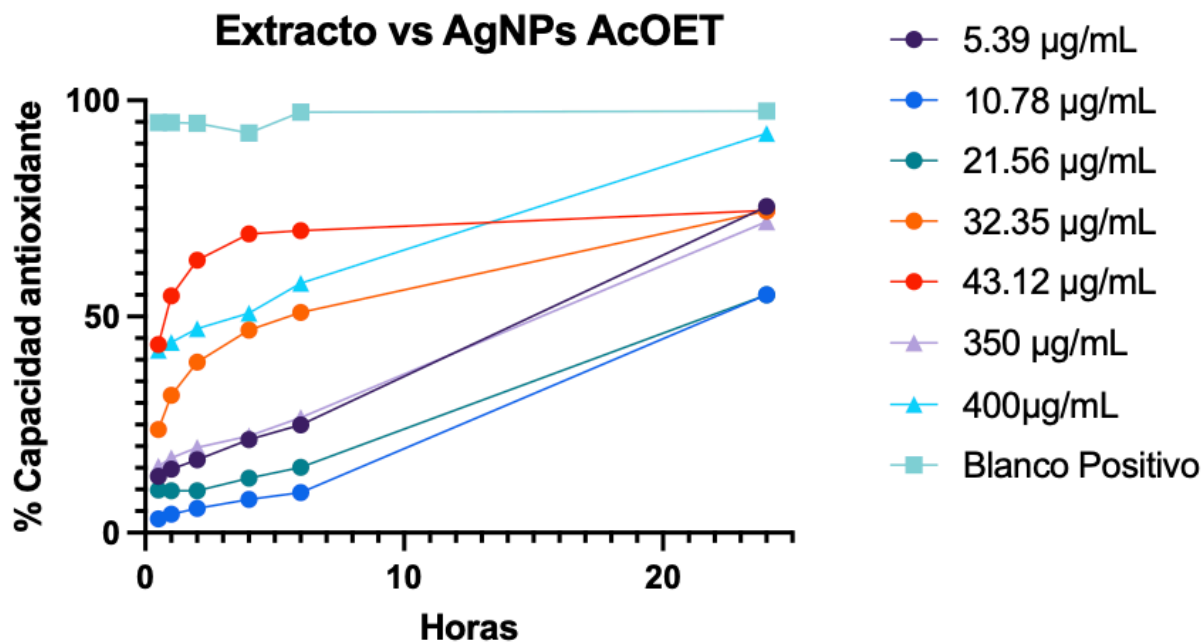


Figura 23. Actividad Antioxidante Extracto vs. AgNPs AcOET.

En la Figura 24 se observó que no hay cambios significativos en las AgNPs, al contrario, se perdió cierta actividad, posiblemente fitoquímicos que se perdieron al momento de sintetizar las nanopartículas, así que observamos que el extracto puro cuenta con una mejor capacidad reductora de radicales libres.

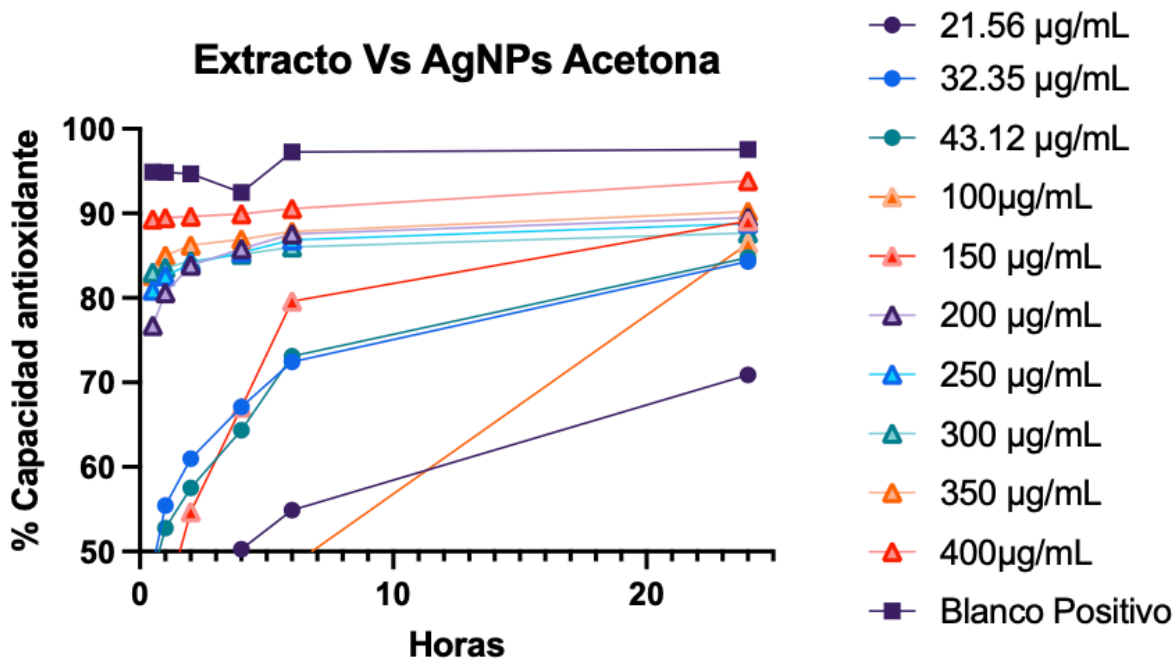


Figura 24. Actividad Antioxidante Extracto vs. AgNPs Acetona.

En la figura 25 se observó que, tanto las nanopartículas como el extracto presentan una actividad antioxidante notable durante las primeras horas, comparable al blanco positivo. Además, se identificó que, al añadir el DPPH, en el caso de las AgNPs el cambio de color ocurrió casi de manera inmediata.

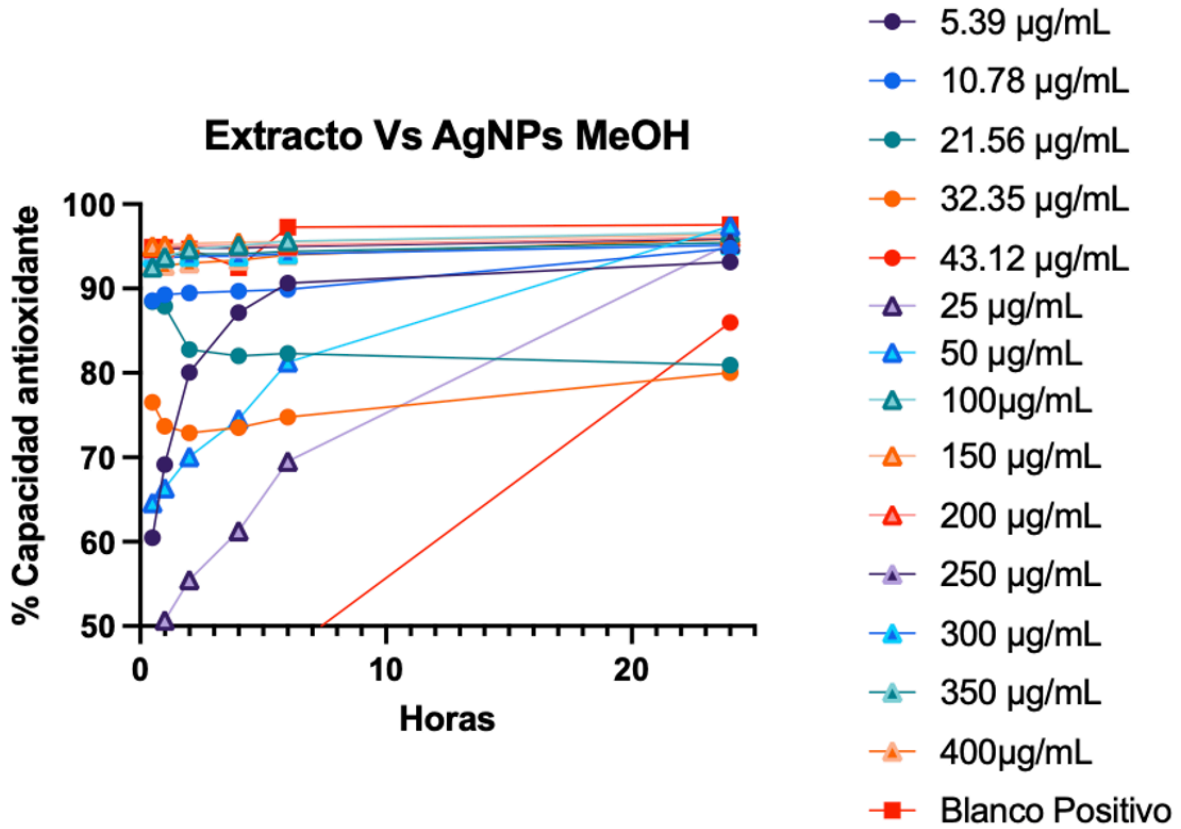


Figura 25. Actividad Antioxidante Extracto vs. AgNPs MeOH.

4.5. Inhibición del crecimiento microbiano

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata (AgNPs) funcionalizadas con extractos de *Tecoma stans* obtenidos con disolventes de diferente polaridad fue evaluada mediante una prueba cuantitativa de inhibición del crecimiento bacteriano, determinando la densidad óptica (DO) a 620 nm tras 18 h de incubación. En todas las gráficas, el testigo celular representa el crecimiento bacteriano sin tratamiento, mientras que una disminución en la DO indica un efecto inhibitorio sobre el crecimiento microbiano.

En la Figura 26 se observó la cepa de referencia *K. pneumoniae* ATCC en la cual se observó un crecimiento elevado en el testigo celular, confirmando la viabilidad del inóculo. En contraste, los tratamientos con AgNPs funcionalizadas mostraron una reducción significativa de la DO, particularmente aquellas sintetizadas con extractos de acetona y acetato de etilo, las cuales presentaron los valores más bajos de absorbancia. Este comportamiento sugiere una inhibición eficiente del crecimiento bacteriano, posiblemente asociada a la presencia de metabolitos de polaridad intermedia que favorecen la interacción de las AgNPs con la membrana bacteriana.

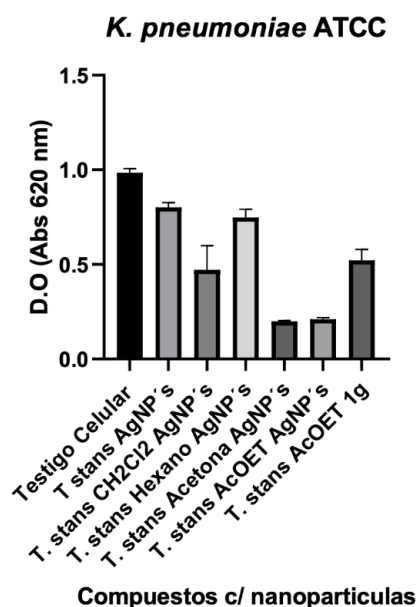


Figura 26. Actividad antimicrobiana en *K. pneumoniae* ATCC.

En la Figura 27 se observó la cepa *E. coli* ATCC presentó un patrón claro de inhibición del crecimiento en presencia de las AgNPs funcionalizadas. Las nanopartículas obtenidas con extractos de diclorometano y acetona mostraron una disminución notable de la DO en comparación con el testigo celular. Estos resultados indican una alta susceptibilidad de la cepa de referencia, lo que concuerda con reportes previos sobre la efectividad de las AgNPs frente a bacterias Gram negativas cuando se emplean extractos vegetales como agentes reductores y estabilizantes.

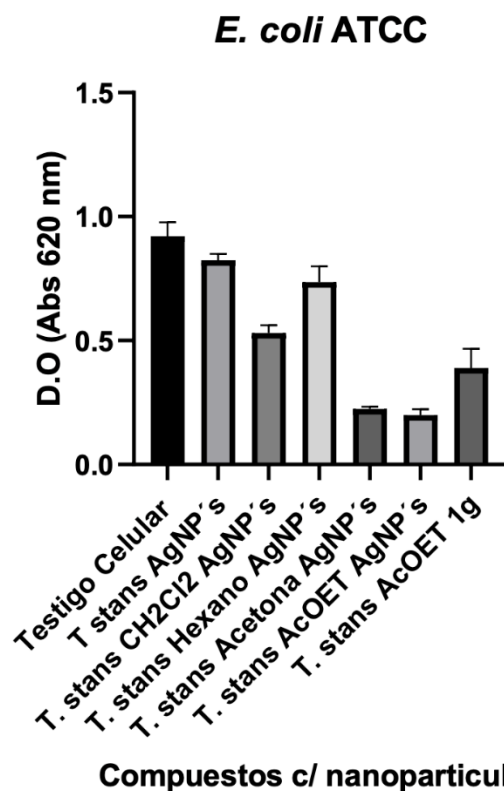


Figura 27. Actividad antimicrobiana en *E. coli* ATCC.

En la Figura 28 se observó la cepa clínica *E. coli* IMSS 105 se observó un crecimiento bacteriano mayor en comparación con la cepa ATCC, lo que sugiere un perfil de resistencia más elevado. No obstante, los tratamientos con AgNPs funcionalizadas con extractos de *T. stans* lograron reducir la DO de manera significativa, destacando las AgNPs-CH₂Cl₂. Este resultado evidencia que, aun en cepas clínicas, las nanopartículas mantienen una actividad antimicrobiana relevante.

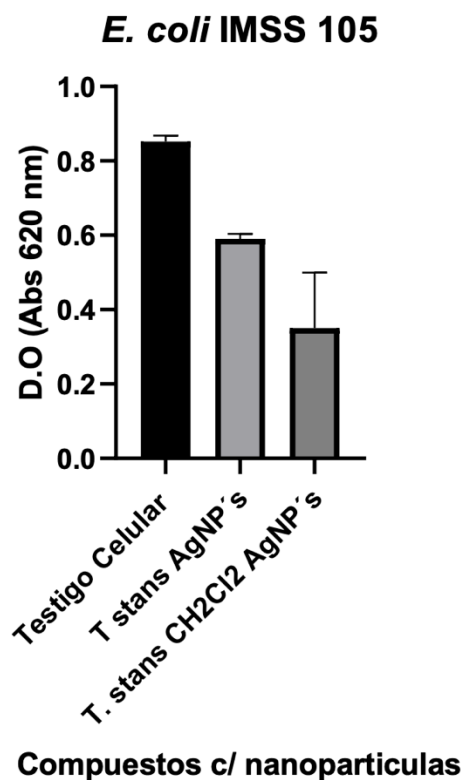


Figura 28. Actividad antimicrobiana en *E. coli* IMSS 105.

En la Figura 29 se observó que de manera similar a la cepa IMSS 105, *E. coli* IMSS 68 mostró una reducción del crecimiento bacteriano en presencia de las AgNPs. La inhibición fue más evidente con las nanopartículas funcionalizadas con extractos de diclorometano, lo que sugiere que metabolitos de menor polaridad podrían desempeñar un papel importante en la estabilización de las AgNPs con mayor afinidad por la envoltura celular bacteriana.

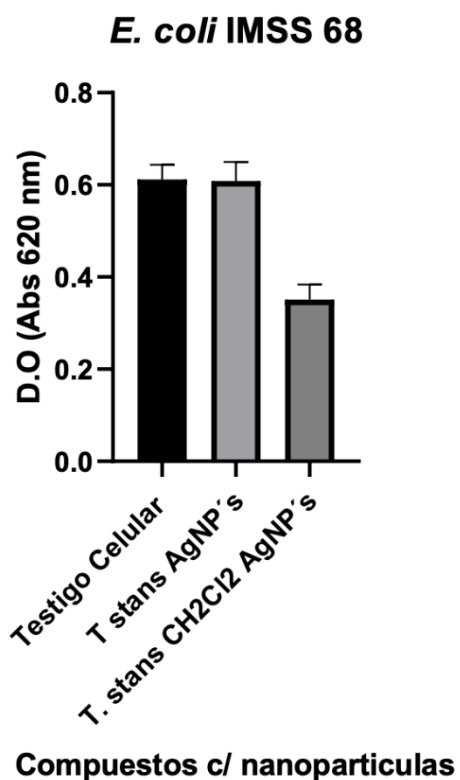


Figura 29. Actividad antimicrobiana en *E. coli* IMSS 68.

En la Figura 30 se observó la cepa *P. aeruginosa* ATCC la cual presentó un crecimiento elevado en el testigo celular, consistente con su alta capacidad adaptativa. Sin embargo, las AgNPs funcionalizadas con extractos de acetona y acetato de etilo lograron disminuir significativamente la DO. Aunque la inhibición fue menor en comparación con otras bacterias evaluadas, el efecto observado es relevante considerando la resistencia intrínseca de esta especie.

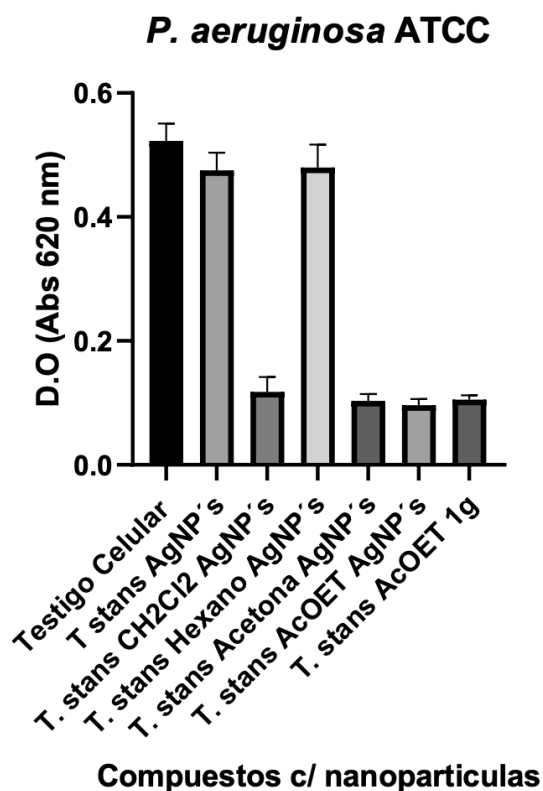


Figura 30. Actividad antimicrobiana en *P. aeruginosa* ATCC.

En la Figura 31 se observó la cepa clínica *P. aeruginosa* 105 en la cual se observó una menor susceptibilidad a los tratamientos, reflejada en valores de DO relativamente elevados. A pesar de ello, las AgNPs sintetizadas con extractos de acetona mostraron una reducción significativa del crecimiento bacteriano, lo que sugiere que la funcionalización con metabolitos específicos puede contribuir a superar parcialmente los mecanismos de resistencia característicos de esta especie.

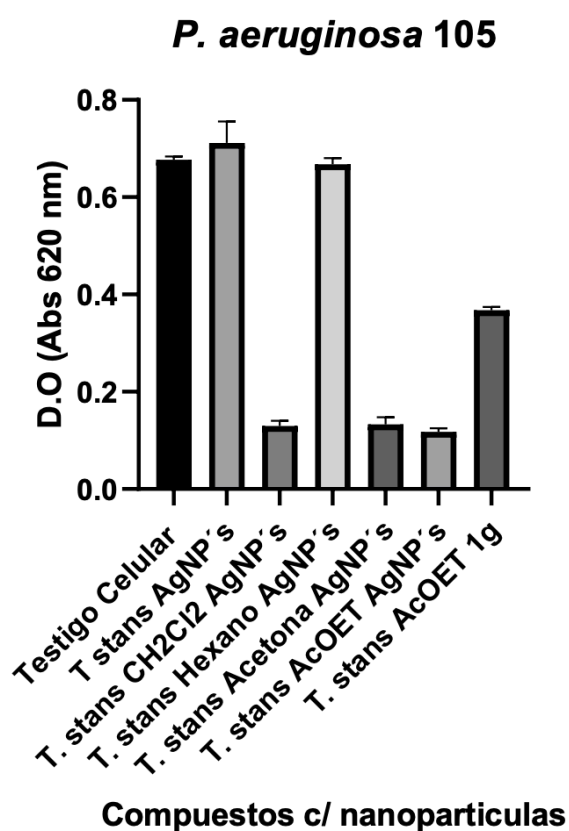


Figura 31. Actividad antimicrobiana en *P. aeruginosa* 105.

En la Figura 32 se observó la cepa *P. aeruginosa* 77 la cual mostró un comportamiento similar al observado en la cepa 105, con un efecto inhibitorio moderado. Las AgNPs funcionalizadas con extractos de acetato de etilo y acetona presentaron los menores valores de DO, confirmando que estos tratamientos son los más efectivos frente a esta bacteria Gram negativa altamente resistente.

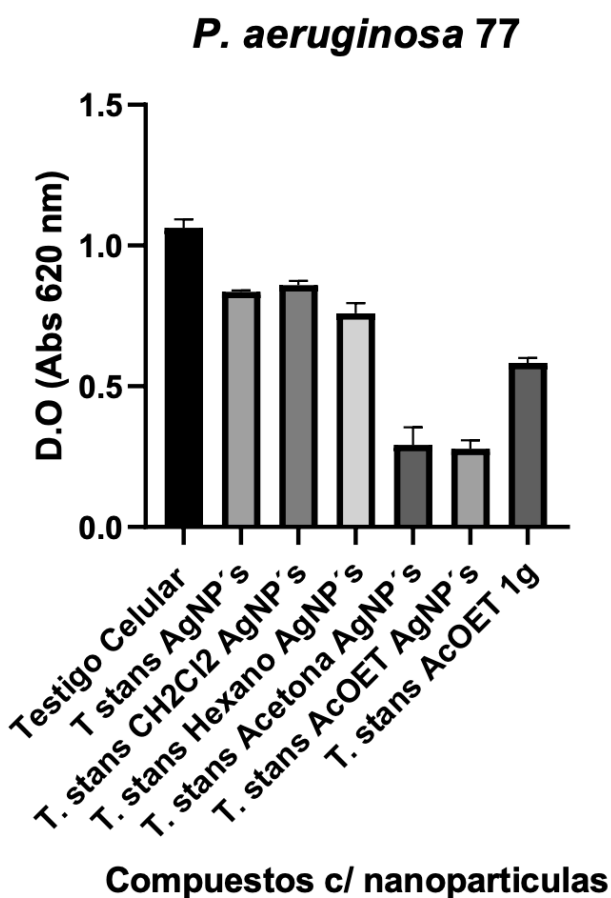


Figura 32. Actividad antimicrobiana en *P. aeruginosa* 77.

En la Figura 33 se observó a cepa de referencia *S. aureus* ATCC la cual presentó uno de los perfiles de mayor inhibición entre todas las bacterias evaluadas. Todos los tratamientos con AgNPs funcionalizadas redujeron significativamente la DO en comparación con el testigo celular, destacando nuevamente las AgNPs-acetona. Este resultado confirma la elevada eficacia de las nanopartículas frente a bacterias Gram positivas.

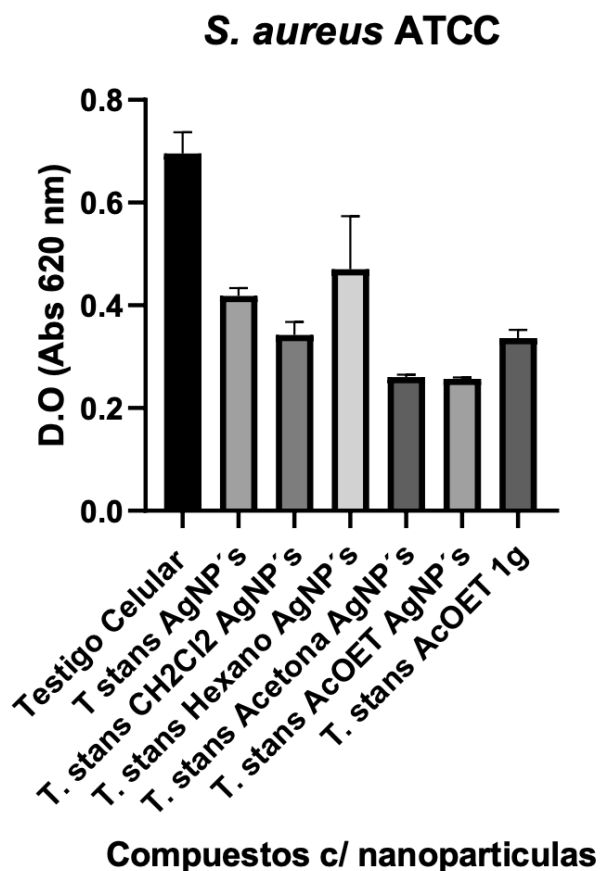


Figura 33. Actividad antimicrobiana en *S. aureus* ATCC.

En la Figura 34 se observó la cepa *S. aureus* PEBP 6301 se observó una inhibición marcada del crecimiento bacteriano con la mayoría de los tratamientos evaluados. Las AgNPs funcionalizadas con extractos de acetona y diclorometano mostraron una disminución significativa de la DO, evidenciando una alta susceptibilidad de esta bacteria Gram positiva, atribuible a la ausencia de membrana externa y a una mayor exposición de la pared celular a las nanopartículas.

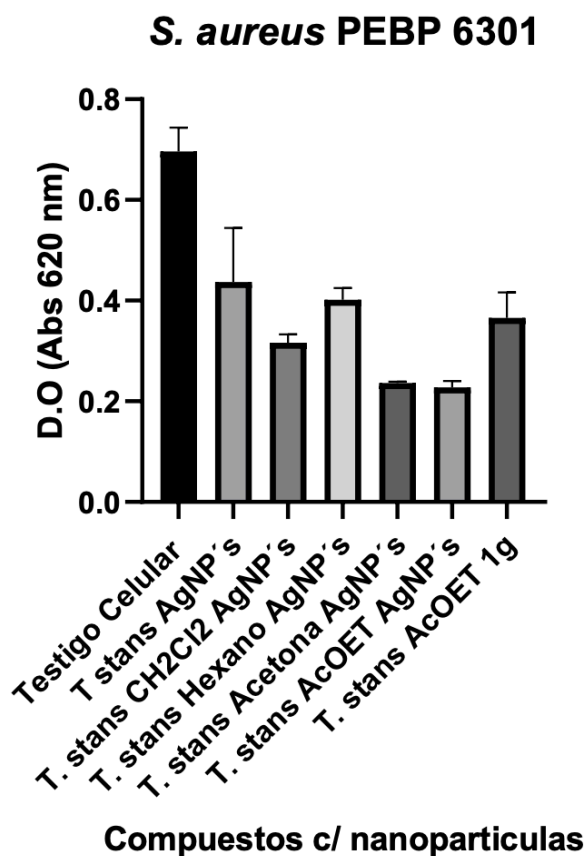


Figura 34. Actividad antimicrobiana en *S. aureus* PEBP 6301.

En la Figura 35 se observó la cepa clínica *S. aureus* 7837 se mantuvo el patrón observado en otras cepas del mismo género, con una reducción clara del crecimiento bacteriano en presencia de las AgNPs. Las nanopartículas funcionalizadas con extractos de acetona y acetato de etilo mostraron el mayor efecto inhibitorio, lo que sugiere una acción consistente independientemente del origen clínico o de referencia de la cepa.

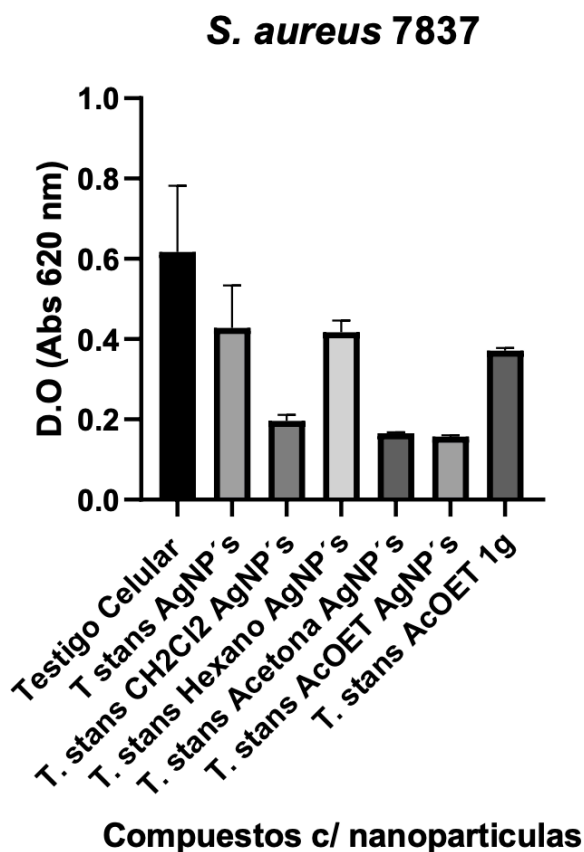


Figura 35. Actividad antimicrobiana en *S. aureus* 7837.

En la Figura 36 se observó la cepa *E. faecium* ATCC en la cual se observó un patrón similar al de la cepa clínica, con una reducción notable del crecimiento bacteriano en presencia de las AgNPs. La consistencia de estos resultados sugiere que el efecto antimicrobiano depende más de la naturaleza del tratamiento que del origen de la cepa.

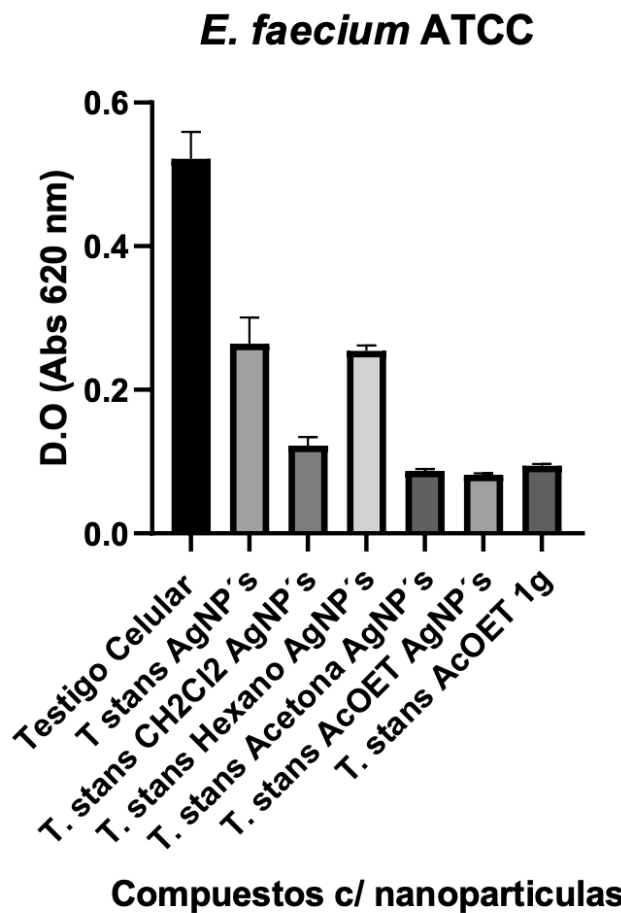


Figura 36. Actividad antimicrobiana en *E. faecium* ATCC.

En la Figura 37 la cepa clínica *E. faecium* U2235 presentó una disminución significativa de la DO en presencia de las AgNPs funcionalizadas, particularmente aquellas obtenidas con extractos de acetona. Considerando la resistencia conocida de esta especie a múltiples antibióticos, estos resultados resaltan el potencial de las nanopartículas de plata como alternativa antimicrobiana.

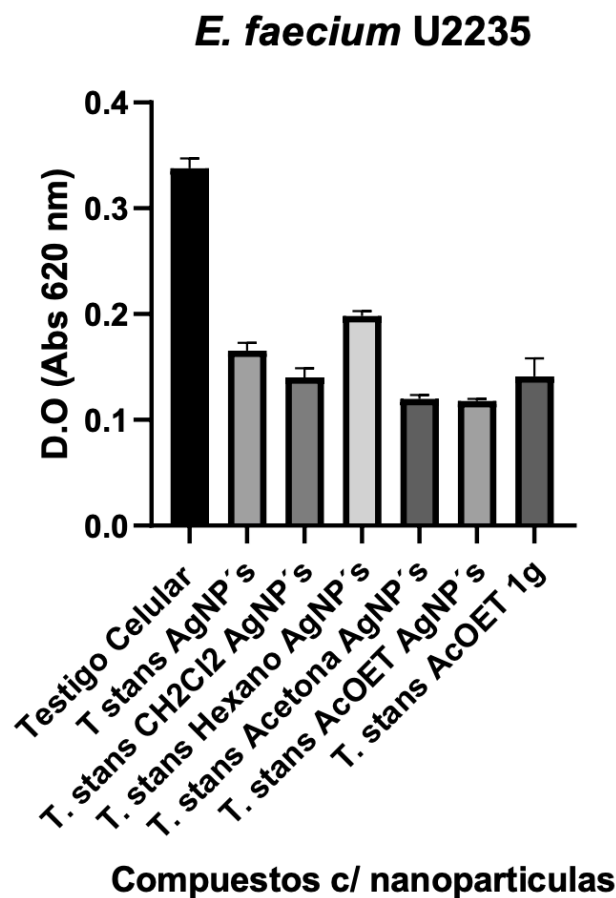


Figura 37. Actividad antimicrobiana en *E. faecium* U2235.

En la Figura 38 la cepa clínica *K. pneumoniae* INP 8 mostró un crecimiento elevado en el testigo celular; sin embargo, las AgNPs funcionalizadas con extractos de acetona y acetato de etilo lograron reducir significativamente la DO. Aunque la inhibición fue menor en comparación con la cepa ATCC, el efecto observado es relevante en el contexto de cepas clínicas resistentes.

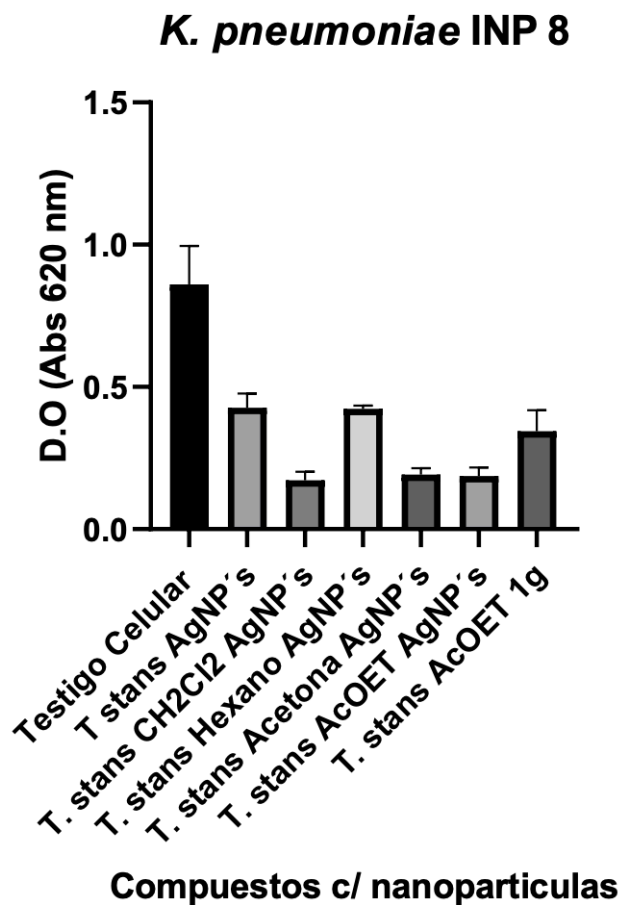


Figura 38. Actividad antimicrobiana en *K. pneumoniae* INP 8.

En la Figura 39 de manera similar, *K. pneumoniae* INP 27 presentó una reducción del crecimiento bacteriano con los tratamientos evaluados, destacando nuevamente las AgNPs-acetona. Este comportamiento sugiere que las nanopartículas conservan su actividad incluso frente a variantes clínicas con posibles mecanismos de resistencia adquirida.

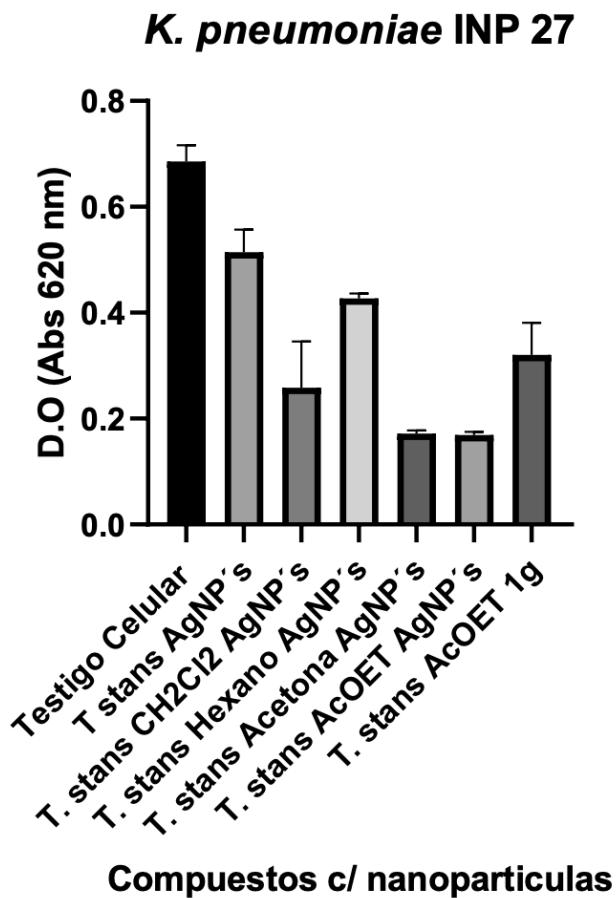


Figura 39. Actividad antimicrobiana en *K. pneumoniae* INP 27.

En la Figura 40 la cepa *A. baumannii* 15 mostró una inhibición del crecimiento bacteriano. Las AgNPs funcionalizadas con extractos más polares presentaron los menores valores de DO, lo que indica que metabolitos de alta polaridad podrían favorecer la interacción de las nanopartículas con la envoltura celular de esta bacteria altamente resistente.

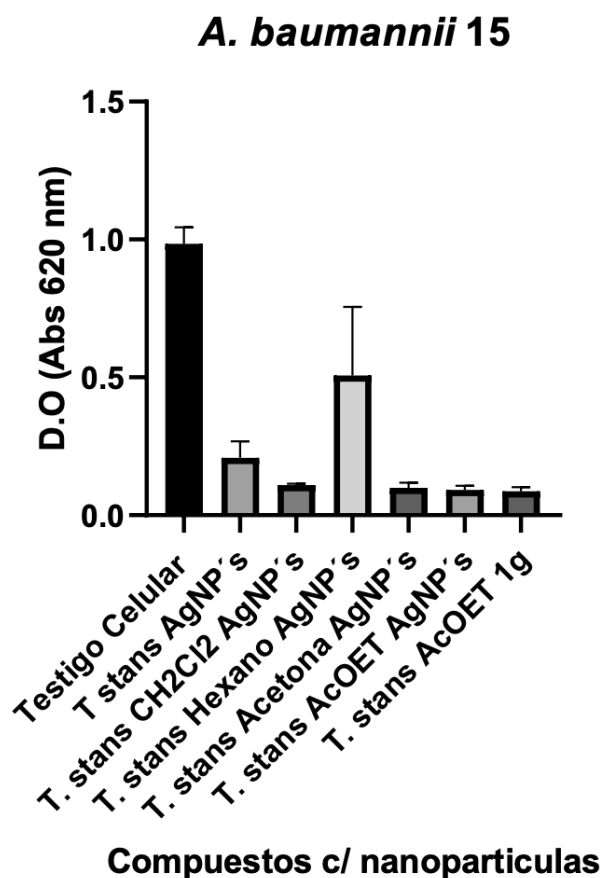


Figura 40. Actividad antimicrobiana en *A. baumannii* 15.

En la Figura 41 la cepa *A. baumannii* 20 presentó un patrón similar al de la cepa 15, con una reducción significativa de la DO en presencia de AgNPs funcionalizadas con extractos no polares. Estos resultados refuerzan la importancia de la polaridad del disolvente de extracción en la obtención de nanopartículas con mayor actividad antimicrobiana.

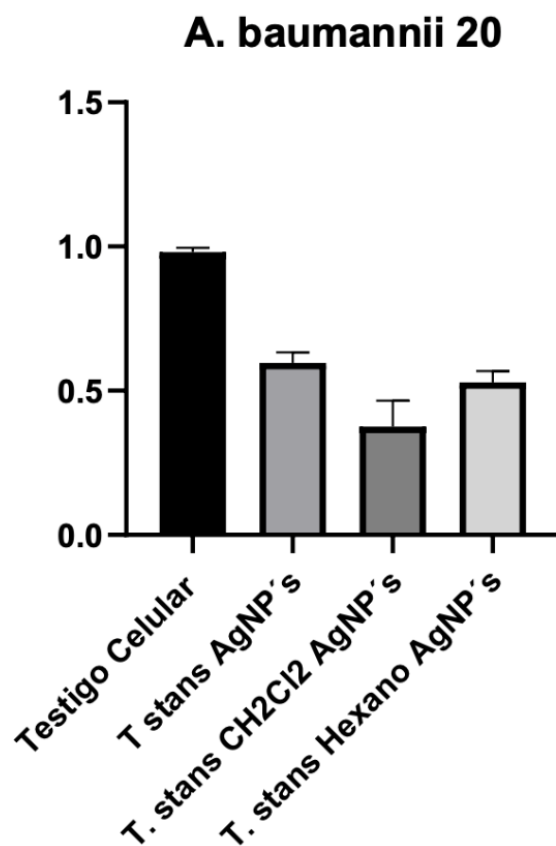


Figura 41. Actividad antimicrobiana en *A. baumannii* 20.

5. Conclusiones

Los extractos orgánicos de *T. stans* obtenidos mediante diferentes disolventes presentaron variaciones en su rendimiento y composición fitoquímica, siendo el extracto metanólico el de mayor rendimiento (41%). Esta diferencia refleja la polaridad de los metabolitos presentes en la planta, lo cual influye directamente en sus propiedades biológicas.

Los extractos orgánicos fueron capaces de reducir los iones de plata y estabilizar las nanopartículas obtenidas por síntesis verde. Las AgNPs mostraron un plasmón característico entre 420–460 nm y morfología esférica observada por SEM, con tamaños aproximados de 30 nm. La presencia de plata fue confirmada mediante análisis EDS, demostrando la eficacia de los extractos vegetales como agentes reductores y estabilizantes naturales.

Las pruebas de toxicidad con *A. salina* revelaron que la mayoría de los extractos orgánicos no son tóxicos a las concentraciones evaluadas ($\leq 1000 \mu\text{g/mL}$), salvo el extracto metanólico, que presentó un aumento de mortalidad a concentraciones elevadas. En contraste, las AgNPs sintetizadas con extracto hexánico mostraron toxicidad marcada ($>80\%$ de mortalidad) a concentraciones superiores al 75%, lo que sugiere una relación dosis-dependiente y la necesidad de estudios complementarios para determinar su biocompatibilidad. Sin embargo, los resultados de toxicidad sugieren ajustar las condiciones de síntesis y concentración antes de su aplicación en sistemas biológicos.

En el ensayo DPPH, los extractos metanólico y acetónico mostraron la mayor capacidad captadora de radicales libres, alcanzando porcentajes de inhibición cercanos al control positivo (α -tocoferol). Los extractos menos polares (hexano y CH_2Cl_2) presentaron actividad antioxidante baja o moderada, lo que indica que los compuestos fenólicos y flavonoides son los principales responsables de la actividad

antioxidante. La capacidad antioxidante de las AgNPs depende directamente de la polaridad del disolvente utilizado durante la obtención del extracto vegetal.

Los disolventes polares (MeOH y acetona) permitieron la síntesis de NPs con mayor actividad antioxidante, debido, probablemente a una mayor presencia y fuerte adsorción de compuestos fenólicos en la superficie de las AgNPs. Por el contrario, los disolventes menos polares (Hexano y CH₂Cl₂) produjeron nanopartículas con actividad limitada, debido a la escasez de grupos antioxidantes disponibles para interactuar con radicales libres. Considerando que las especies reactivas de oxígeno (EROs) participan activamente en el desarrollo y progresión de diversas enfermedades crónico-degenerativas incluyendo diabetes, cáncer, trastornos neurodegenerativos y enfermedades cardiovasculares, la búsqueda de nuevas terapias antioxidantes se vuelve fundamental.

Los antioxidantes convencionales suelen presentar limitaciones en su biodisponibilidad, estabilidad o eficacia, por lo que la identificación de nuevas moléculas y sistemas nanoestructurados derivados de plantas representa una alternativa prometedora. Los extractos y nanopartículas obtenidos de *T. stans* se pueden mostrar como candidatos atractivos para el desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras que contribuyan a disminuir el estrés oxidativo y, con ello, mitigar procesos patológicos asociados a las EROs.

Las nanopartículas de plata funcionalizadas con extractos de *T. stans* presentan una actividad antimicrobiana significativa y consistente frente a un amplio espectro de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo cepas de referencia y aislados clínicos con perfiles de resistencia a antibióticos. La disminución significativa de la densidad óptica observada en la mayoría de las cepas evaluadas confirma un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento bacteriano, el cual estuvo claramente influenciado por el disolvente de extracción empleado durante la síntesis de las AgNPs.

Las nanopartículas funcionalizadas con extractos particularmente acetona y acetato de etilo, mostraron el mayor efecto inhibitorio, lo que sugiere que los metabolitos secundarios extraídos bajo estas condiciones favorecen la estabilización, bioactividad e interacción de las AgNPs con las estructuras celulares bacterianas. Asimismo, se observó una mayor susceptibilidad en bacterias Gram positivas, atribuible a diferencias estructurales en la envoltura celular, aunque los efectos detectados en bacterias Gram negativas altamente resistentes, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, resaltan el potencial de estas nanopartículas como una estrategia antimicrobiana alternativa o complementaria frente a patógenos de relevancia clínica.

6. Bibliografía

- Abada, E., Mashraqi, A., Modafar, Y., Al-Abboud, M. A., & A, E. S. (2024). Review green synthesis of silver nanoparticles by using plant extracts and their antimicrobial activity. *Saudi Journal of Biological Science*.
- Aguilar-Santamaría, L., Ramírez, G., Nicasio, P., Alegría-Reyes, C., & Herrera-Arellano, A. (2009). Antidiabetic activities of *Tecoma stans* (L.). *Ethnopharmacol*, 284-288.
- Aumeeruddy- Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, F. (2015). Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. *Industrial Crops and Product*, 197-204.
- Bassetti, M., Rello, J., Blasi, F., Goossens, H., Sotgiu, G., Tavošchi, L., . . . Nguyen, S. (2020). Systematic review of the impact of appropriate versus inappropriate initial antibiotic therapy on outcomes of patients with severe bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agent*, 1-7.
- Bawa, R. (2005). Nanotechnology: A Developing Field in Medicine and Technology. *Journal of the American Medical Association*, 7(294), 847-849.
- Betoni, E. C., Passarelli Mantovani, R., Nunes Barbosa, L., Di Stasi, L. C., & Fernández Júnior, A. (2006). *Scielo Brasil*. Obtenido de Scielo: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/f83338GzS6bsC59rGv6pJWgr/?lang=en>
- Bloom, D., & Cadarette, D. (2019). Infectious disease threats in the twenty-first century: strengthening the global response. *Front. Immunol.*, 549.
- D, H., B, O., & R.L, P. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1841-1856.
- Dohnal, B. (1977). Investigations on some metabolites of *Tecoma stans* Juss. callus tissue. Part III. Chromatographical search for iridoids, phenolic acids, terpenoids and sugars. *Acta Soc. Bot. Pol*, 187-199.

- Edward-Jones, V. (2013). Alternative antimicrobial approaches to fighting multidrug-resistant infections. *Elsevier Academic Press*, 1-9.
- Ekor, M. (Enero de 2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol*, 10(4).
- Fernades, A., & Mankad, A. (2022). N APPRAISE ON TECOMA STANS (L.) EX. JUSS, KUNTH. - PHYTOCHEMICAL POTENTIALS. *International Association of biological and Computational Digest*, 259-274.
- Kumar, K., & Boopathi, T. (2018). An updated overview on pharmacognostical and pharmacological screening of Tecoma stans. *PharmaTutor*, 38-49.
- Lavudi, K., & Harika, G. (2022). Green synthesis of Tecoma stans flower and leaf extracts: characterization and anti-proliferative activity in colorectal cancer cell lines. *Letters in Applied NanoBioScience*, 61.
- Lee, Y.-S., Choi, J.-G., Oh, Y.-C., Chae, H.-S., Kim, J. H., Park, H., . . . Kwon, D.-Y. (2008). Synergistic effects of the combination of galangin with gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Microbiology*, 283-288.
- Li, X., Yi-Yi, W., Jie, H., Chun-Yuan, Chen, Zhen-Xing, W., & hUI, X. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*, 8996-9031.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., & Della-Morte, D. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 757-772.
- Madhan, K., Deepthi, T., Sumina, C., Shymaladevi, B., & Billy, A. (2022). Antioxidant And Antibacterial Properties of "Tecoma Stans" Flower Extract On Human Pathogenic Microorganisms- An Invitro Study. *Journal of Pharmaceutical*, 13.
- Molina-Salinas, G., & Said-Fernández, S. (2006). modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacol. Online*, 3, 633-638.

- Mukul, A., & Basavaraju, R. (Agosto de 2020). A review on phytochemistry and pharmacological uses of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Mukul, A., & Basavaraju, R. (2021). A review on phytochemistry and pharmacological uses of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Ethnopharmacology*, 265.
- Pham-Huy, L., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 89-96.
- R, A., M, Ö., K, G., & E, Ç. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 997-1027.
- Raju, K., Harsha, A., & Ojha, S. (2011). Effect of processing techniques on the mechanical and wear properties of Al-20Si alloy. *Transactions of the Indian Institute of Metals*, 1-5.
- Raju, S., Kavimani, S., Uma Maheshwara rao, V., Sreeramulu Reddy, K., & Vasanth Kumar, G. (2011). Floral extract of *Tecoma stans*: A potent inhibitor of gentamicin-induced nephrotoxicity in vivo. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 680-685.
- Rios, M., Ocampo-Acuña, Y., Ramírez-Cisneros, M., & Salazar-Rios, M. (2020). Furoruranone Lignans from *Leucaphyllum ambiguum*. *Journal of Natural Products*, 1424-1431.
- Ronald, L. P., Xianli, W., & Karen, S. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* ., 4290-302.
- Salehi, B., Upadhyay, S., Erdogan Orhan, I., Kumar Jugran, A., Jayaweera, S. L., Días, D. A., . . . Sharifi-Rad, J. (2019). Potencial terapéutico del α - y β -pineno: un regalo milagroso de la naturaleza. *Biomolecules*.

- Salehi, B., Yilmaz, Y. B., Anitka, G., Boyunegmez Tumer, T., Fawzi Mahomoodally, M., Lobine, D., . . . Sharifi-Rad, J. (2019). Insights on the Use of α -Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. *Biomolecules*.
- Taher, M., Dawood, D., & Sanad, M. H. (2016). Searching for anti-hyperglycemic phytomolecules of *Tecoma stans*. *Eur. J. Chem.*, 397-404.
- Vinod, N., Shijina, R., Dileep, K., & Sadasivan, C. (2010). Inhibition of Beta-Lactamase by 1,4-Naphthalenedione from the Plant *Holoptelea integrifolia*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1752-1759.
- W, B.-W., M.E, C., & C, B. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology*, 25-30.
- Xue, T., Kong, X., & Ma, L. (2023). Trends in the epidemiology of pneumocystis pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *J. Fungi*, 812.
- Yala, D., Merad, A., Mohamedi, D., & Ouar Korich, M. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 5-12.