



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

**Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de Cobre a partir
de extracto de ciruela roja (*Prunus domestica*)**

Tesis presentada para obtener el título de:
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Sofía Cano Arteaga

Directora:

Dra. María del Pilar Trujillo García

Asesora:

Dra. Alejandra Tovar Corona

Abril 2016

Contenido

1. Agradecimientos	4
2. Dedicatoria	5
3. Resumen	6
4. Abstract	7
5. Objetivos	8
5.1. Generales	8
5.2. Específicos	8
6. Introducción	9
7. Antecedentes	10
7.1. <i>Prunus domestica</i> L.	10
7.1.1. Taxonomía	10
7.1.2. Descripción botánica	11
7.1.3. Propiedades biológicas	11
7.2. Flavonoides	12
7.3. Antocianinas	13
7.3.1. Estructura química	13
7.3.2. Ruta metabólica	14
7.3.3. Distribución en la naturaleza	16
7.3.4. Estabilidad	17
7.3.4.1. Estructura de las antocianinas	17
7.3.4.2. Efecto del pH	18
7.3.4.3. Efecto de la temperatura	18
7.3.5. Ensayos cromatográficos	19
7.3.6. Ensayos espectrofotométricos	19
7.3.7. Propiedades biológicas	20
7.4. Radicales libres y estrés oxidativo	20
7.4.1. Producción de radicales libres de oxígeno	21
7.4.2. Antioxidantes	21
7.4.3. Niveles de acción antioxidante	22
7.5. Microscopía	23
7.5.1. Microscopía electrónica de transmisión	23
7.6. Espectrofotometría	24
7.6.1. Infrarrojo	25
7.6.2. Ultravioleta Visible	25
7.7. Nanopartículas	26
7.7.1. Síntesis de nanopartículas metálicas por métodos físicos y químicos	26
7.7.2. Síntesis biogénica de nanomateriales	26
7.7.2.1. Uso de bacterias en la síntesis de nanopartículas	27
7.7.2.2. Uso de actinomicetos y hongos en la síntesis de nanopartículas	27
7.7.2.3. Uso de plantas en la síntesis de nanopartículas	27
7.8. Consideraciones en la biosíntesis de nanomateriales a partir de plantas	28
7.9. Microbiología	29
7.9.1. Bacterias	29
7.9.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
7.9.1.2. Cocos grampositivos	30
7.9.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	30
7.9.1.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	31
7.9.1.5. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	31

8. Metodología	32
8.1. Extracción de la antocianina	32
8.2. Purificación del pigmento	32
8.3. Determinación de la concentración de antocianinas	33
8.4. Determinación de la capacidad antioxidante	36
8.5. Biosíntesis	37
8.6. Análisis UV visible	38
8.7. Análisis FT-IR	38
8.8. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	38
8.9. Evaluación de actividad antimicrobiana	39
9. Discusión de resultados	40
10. Conclusiones	50
11. Perspectivas	51
12. Bibliografía	52

1. Agradecimientos

A la Dra. Alejandra Tovar Corona.

A la Dra. Sandra Luz Cabrera Hilerio del departamento de Bioquímica-Alimentos.

Al Dr. Carlos Enrique Ochoa de la Escuela de Biología BUAP.

Al Dr. Odilón Vázquez Cuchillo del Instituto Tecnológico de Puebla.

A la Dra. Ana Marta de los Ángeles Lobo Sánchez del laboratorio de Microbiología BUAP.

2. Dedicatoria

A la persona que continuará este trabajo.

A mis padres por apoyarme y alentarme siempre.

3. Resumen

El propósito de este trabajo fue lograr la biosíntesis de nanopartículas de cobre con el uso de un extracto vegetal, por medio de un proceso más ecológico y con menor producción de desechos que la síntesis química tradicional, a través de este trabajo se investigó la capacidad de las moléculas presentes en el extracto de ciruela roja para formar nanoestructuras, se investigaron las condiciones para una óptima formación de nanopartículas de cobre a distintas temperaturas y tiempos de contacto, las nanopartículas obtenidas se caracterizaron por métodos espectroscópicos de absorción en el infrarrojo y en el ultravioleta visible, confirmando su formación por medio de microscopía electrónica de transmisión. Se investigó además la actividad de las nanopartículas metálicas ante cepas de bacterias ambientales.

4. Abstract

The purpose of this work was to achieve biosynthesis of copper nanoparticles with the use of a plant extract, using a more environmentally friendly process and less waste production than traditional chemical synthesis, through this work was investigated the capacity of the molecules present in the extract of red plum to form nanostructures, the conditions for optimal formation of copper nanoparticles at different temperatures and reaction times, the nanoparticles obtained were then characterized by spectroscopic methods as infrared absorption and ultraviolet visible absorption, confirming the formation of nanoparticles by transmission electron microscopy. Antimicrobial activity of metal nanoparticles against environmental bacteria strains was investigated.

5. Objetivos

5.1. Generales

- Extraer y acondicionar el extracto de ciruela roja.
- Biosintetizar nanopartículas de cobre a partir de antocianinas de ciruela roja (*Prunus domestica*).
- Caracterizar las nanopartículas formadas.

5.2. Específicos

- 1) Obtener extracto a partir de cáscara de ciruela roja (*Prunus domestica* L).
- 2) Purificar el extracto obtenido de ciruela roja.
- 3) Acondicionar el extracto de ciruela roja mediante una dilución estable a concentración conocida.
- 4) Cuantificar el contenido de antocianinas de ciruela roja (*Prunus domestica* L) por el método de pH diferencial.
- 5) Medir la actividad antioxidante del extracto purificado de ciruela roja (*Prunus domestica* L) por método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
- 6) Determinar las condiciones idóneas para la biosíntesis de nanopartículas.
- 7) Evaluar la estabilidad de los extractos y las nanopartículas antes y después de la biosíntesis mediante análisis de absorción en la región del infrarrojo.
- 8) Detectar la formación de nanopartículas metálicas de cobre por medio de análisis de absorción en la región ultravioleta visible.
- 9) Determinar la forma y tamaño de las nanopartículas biosintetizadas mediante microscopía electrónica de transmisión.
- 10) Evaluar el potencial antimicrobiano de las nanopartículas de cobre biosintetizadas ante cepas ambientales.

6. Introducción

Los avances en la nanobiotecnología, ciencia que conjunta la nanotecnología con la biotecnología para la búsqueda de nuevos materiales con aplicaciones en diversas áreas de conocimiento, ha generado atención por la posibilidad de generar nanomateriales de forma rápida, limpia, ecológica y a bajo costo a comparación con los distintos métodos disponibles de síntesis química¹.

Asimismo, el papel de la biotecnología en esta ciencia en ciernes, ha llevado a los investigadores a buscar nuevas fuentes de nanomateriales en microorganismos y vegetales que funcionen a modo de pequeñas fábricas celulares o extracelulares, ya que tanto los microorganismos como las plantas producen metabolitos secundarios, los cuales se están investigando por su capacidad de formar nanopartículas metálicas, las cuales reciben atención por su tamaño extremadamente pequeño y amplia relación superficie a volumen, las propiedades biológicas que han demostrado las estructuras a nanoescala, distintas a las que presenta el material de forma aislada².

La biosíntesis de nanoestructuras se presenta como una alternativa amigable con el ambiente gracias a que evita el uso de sustancias potencialmente tóxicas y reduce desechos, al utilizar microorganismos como bacterias, hongos, levaduras, virus y extractos obtenidos de plantas o partes de ellas, ricos en metabolitos secundarios (hojas, tallos, flores, frutos, cáscara, corteza, etc.), específicamente al uso de plantas se le conoce como fitosíntesis y su uso conlleva una serie de ventajas como la síntesis extracelular, con solventes poco agresivos y la facilidad de controlar el tamaño y forma de las nanopartículas obtenidas en función de las condiciones de síntesis.

La investigación de nanomateriales por biosíntesis presenta una amplia gama de posibles aplicaciones tanto para productos consumibles de uso cotidiano, biorremediación ambiental, farmacéutica y ciertas áreas de la medicina, como la oncología, en la cual se investiga la capacidad de las nanoestructuras de dirigir fármacos de la quimioterapia a su punto de acción.

7. Antecedentes

7.1. *Prunus domestica* L.

7.1.1. Taxonomía

La clasificación sistemática de la planta se realizó en el Herbario de la Escuela de Biología-BUAP, según el Sistema de Clasificación de Cronquist y The Angiosperm Phylogeny Group (APG III). Como sigue:

Sistemática del “ciruelo” de acuerdo a Cronquist (1981)

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Tracheobionta</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Rosidae</i>
Orden:	<i>Rosales</i>
Familia:	<i>Rosaceae</i>
Subfamilia:	<i>Amygdaloideae</i>
Tribu:	<i>Amygdaleae</i>
Género:	<i>Prunus</i>
Subgénero:	<i>Prunus</i>
Especie:	<i>Prunus domestica</i> L.
	Nombre vulgar: Ciruela

Sistemática del “ciruelo” de acuerdo a APG III (2009)

Reino:	Plantae
Clado:	Angiospermas
Clado:	Eudicotiledóneas
Clado:	Rósidas
Orden:	Rosales
Familia:	Rosaceae
Subfamilia:	Prunoideae
Género:	<i>Prunus</i>
Especie:	<i>Prunus domestica</i> L.

7.1.2. Descripción botánica

Árbol de hasta 10 m, caducifolio, inerme. Ramillas glabrescentes, en general rojizas y brillantes. Hojas 4-8x1,7-3,5 cm, obovadas, elípticas u ovado-lanceoladas, acuminadas, crenadas o aserradas, de haz glabra, y envés ± pubescente en los nervios; pecíolo 1-2,5 cm, glabrescente; estípulas caducas, linear-lanceoladas con dientes glandíferos. Flores solitarias o geminadas, raramente en fascículos de 3-5; pedicelos 8-15 mm, glabros o pubescentes. Receptáculo 4-5 mm, acopado, glabro o pubescente. Sépalos 4-5 mm, reflejos, ovado-oblongos, denticulados, obtusos, glabros o pubescentes. Pétalos 8-13 mm, obovados, emarginados, blancos o blanco-verdosos. Ovario glabro. Fruto 40-50 mm, elipsoidal o ± globoso, glabro, de color negro azulado, púrpura oscuro, rojizo, amarillento, verdoso, etc., con pruina; mesocarpio de sabor dulce; endocarpio ovoide o elipsoidal, ligeramente rugoso o punteado, aquillado, adherido al mesocarpio. $2n = 16^*, 32^*, 48^*, 68^*$. Oriundo del SE de Europa (Cáucaso) y SO de Asia. Raramente se encuentra asilvestrado.³

7.1.3. Propiedades biológicas

Propiedades nutritivas

El principal componente de las ciruelas es el agua, seguido de los hidratos de carbono, entre los que destaca la presencia de sorbitol, de leve acción laxante. El aporte de vitaminas no es relevante, aunque destaca su contenido moderado en provitamina A (más abundante en las de color oscuro) y vitamina E (interviene en la estabilidad de las células sanguíneas y en la fertilidad), ambas de acción antioxidante. La vitamina A es esencial para la visión, el buen estado de la piel, el cabello, las mucosas, los huesos y para el buen funcionamiento del sistema inmune. En su contenido de minerales, son ricas en potasio. Se caracterizan por poseer antocianinas y ácido málico, el cual forma parte del pigmento vegetal que proporciona sabor a la fruta.

Propiedades para la salud

La ciruela tiene propiedades laxantes (suaves o inmediatas, según la cantidad ingerida), antianémicas (por su alto contenido en hierro), antitusivas, expectorantes y reguladoras del intestino por su alto contenido en fibra. Desde el punto de vista de la salud, lo que en realidad destaca de las ciruelas es su acción laxante, debido al contenido de fibra, de sorbitol y de derivados de la hifroxifenilxantina, sustancias que estimulan la actividad de los músculos del colon.⁴

7.2. Flavonoides

El grupo de los flavonoides, predominante en tés, miel, vinos, frutas, vegetales, nueces, aceite de oliva, cacao y cereales, es quizás el conjunto más importante de compuestos fenólicos en alimentos, abarcando un grupo de cerca de 4000 compuestos aromáticos de 15C presentes en plantas, con múltiples patrones posibles de sustitución⁵. Los fitoquímicos de este gran grupo han ganado la denominación de bioflavonoides debido a su multifacético rol en la salud humana.⁶

Los principales componentes de este grupo son las antocianinas (cianidina, pelargonidina, petunidina), los flavonoles (quercetina, kaempferol), los flavonoles (quercetina, kaempferol), flavonas (luteolina, apigenina), flavanonas (myrcetina, naringina, hesperetina, naringenina), flavan-3-oles (catequina, epicatequina, galocatequina) y pese a que a veces se las clasifica por separado, las isoflavonas (genisteina, daidzeina).

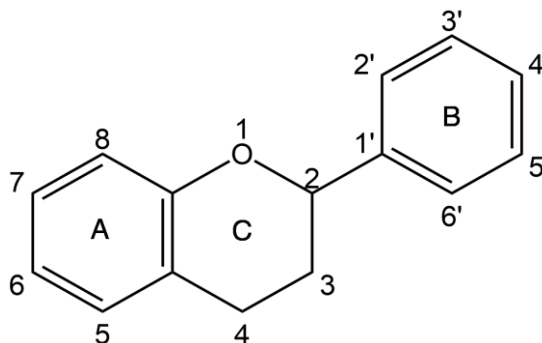


Figura 1 Estructura química general de los flavonoides.

En la Figura 1⁷ se muestra el núcleo principal flavonoide y en la Figura 2⁸ las diferentes estructuras de los principales flavonoides presentes en la naturaleza.

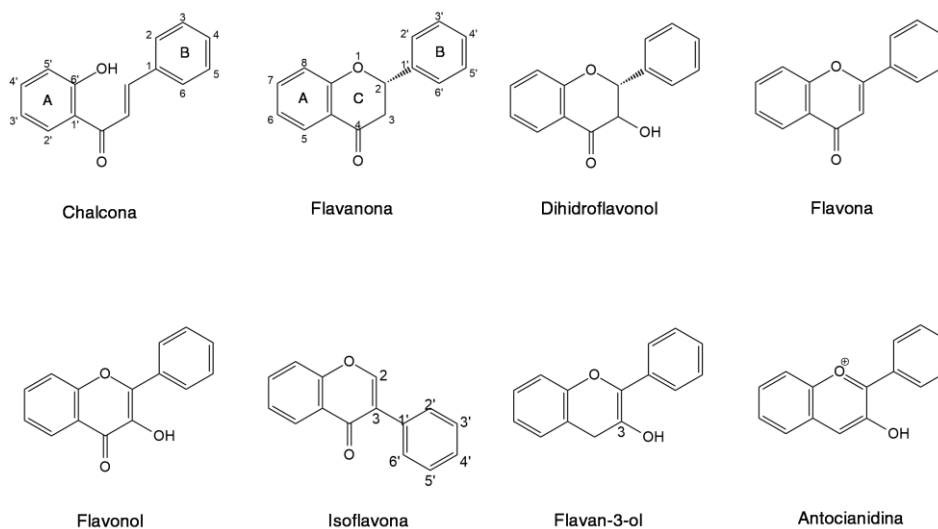


Figura 2 Clasificación de los flavonoides basada en su estructura química.

7.3. Antocianinas

La palabra “antocianina” deriva del griego *anthos* (flor) y *kyanos* (azul oscuro); son los pigmentos responsables de colores rojos, azulados o violáceos de la mayoría de los frutos o flores, siendo el segundo pigmento visible al ojo humano más importante después de la clorofila.⁹

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles formados por el grupo flavilio, el cual consta de dos grupos aromáticos, el benzopirilo y un anillo fenólico, a esta estructura base se unen carbohidratos simples como glucosa, ramnosa, galactosa, xilosa y arabinosa o complejos como sambubiosa y rutinosa; en la molécula se puede encontrar un solo carbohidrato o dos de ellos.

7.3.1. Estructura química

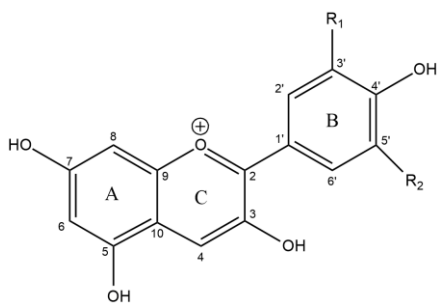


Figura 3 Forma general de las antocianidinas.

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas. Las antocianidinas base más importantes son: pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina¹⁰ (Figura 3), debido a su poca solubilidad en el agua, no se encuentran de manera libre en la naturaleza sino en su forma glucosilada (Figura 4).

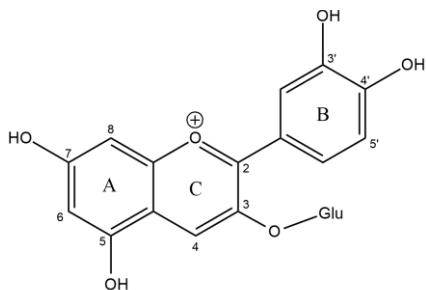


Figura 4 Forma glicosilada de la Cianidina-3-glucósido.

El color que confieren las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula, mayor hidroxilación ocasiona tonalidades azules, mientras que un incremento en las metoxilaciones produce coloraciones rojas.

Tabla 1 Configuraciones de las diferentes antocianidinas.

Aglicona	R ₁	R ₂
Petunidina	OH	OCH ₃
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidina	H	H
Delfinidina	OH	OH
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H

7.3.2. Ruta metabólica de producción de antocianinas

Dada la preocupación que predomina por el uso de colorantes artificiales, la industria alimentaria se ha visto en la necesidad de investigar y utilizar pigmentos naturales para dar color a los alimentos, una alternativa natural son las antocianinas que ofrecen un rango de colores desde rojo hasta azul o naranja, gracias a ello, la ruta metabólica secundaria que lleva a la producción de antocianinas en plantas es probablemente la más estudiada, se conocen los tejidos donde ocurre la síntesis y las etapas de la vida de la planta en las que ocurre, asimismo se han aislado y estudiado los genes responsables de la vía metabólica y cómo se regula su expresión.

La ruta biosintética se puede dividir en dos etapas, según sean tempranos o tardíos los genes que se expresan en la biosíntesis. Los genes tempranos llevan a la formación de dihidroflavonoles y comprenden: fenilalanina amonía liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H), 4-cumarato:CoA ligasa (4CL), chalcona sintetasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI) y flavanona 3-hidroxilasa (F3H). Los genes tardíos llevan a la formación de la molécula de antocianina y son: dihidroflavonol reductasa (DFR), antocianidin sintetasa (AS), UDPGlucosa:flavonoide 3'- y 3'5'-hidroxilasas (F3'H y F3'5'H). El grupo biosintético tardío también incluye las enzimas modificadoras de antocianinas como las glicosiltransferasas, metiltransferasas y aciltransferasas¹¹.

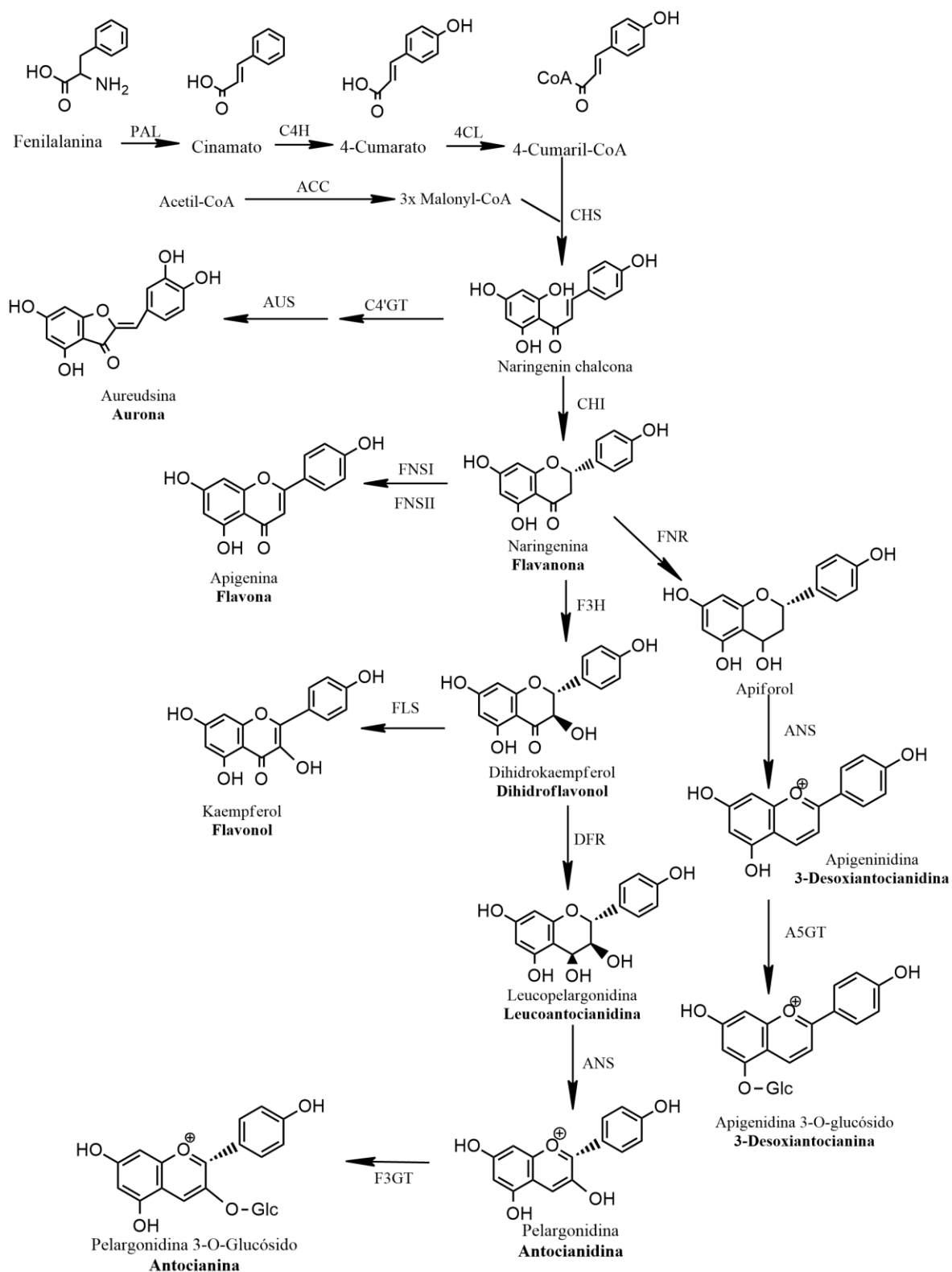


Figura 5 Sección de la ruta biosintética general de fenilpropanoides y flavonoides que lleva a la producción de antocianinas y otros flavonoides en flores y frutos.

7.3.3. Distribución en la naturaleza

Las antocianinas se localizan principalmente en la solución vacuolar de células epidérmicas de frutas como manzanas, peras, zarzamoras; flores como la jamaica y las rosas; verduras como la col morada y el maíz azul; tallos y raíces. Se cree que cumplen la función principal de atraer seres vivos para propósitos de polinización y dispersión de semillas. La diferencia de color entre las frutas, flores y verduras depende de la naturaleza y concentración de antocianinas. Existen factores adicionales que afectan el color, como el pH de la célula, el efecto de copigmentación determinado por la presencia de otros flavonoides, temperatura, luz, entre otros¹¹.

Tabla 2 Cantidad promedio de antocianinas en algunos alimentos¹².

Fuente de antocianinas	Cantidad (mg/l o mg/kg)
Zarzamora	1150
Mora azul	825-4200
Zarza de Boysen	1609
Cereza	20-4500
Aronia	5060-10000
Arándano	600-2000
Airela	1000
Grosella	1300-4000
Saúco	2000-10000
Uvas rojas	300-7500
Naranja sanguina	2000
Ciruela	20-250
Endrino	1600
Fresa	150-350
Frambuesa	1700-4277
Berenjena	7500
Cebolla	Hasta 250
Ruibarbo	Hasta 2000
Col roja	250
Vino tinto	240-350
Vino oporto	140-1100

7.3.4. Estabilidad

Las antocianinas son compuestos inestables en condiciones fisiológicas normales y su estabilidad es muy frágil en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentran. Factores como su estructura química, pH, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, concentración y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento¹³.

7.3.4.1. Estructura de las antocianinas

Las antocianinas son pigmentos flavonoides que se estabilizan mediante la modificación de su forma de aglicona (antocianidina) por glicosilación, metilación y acilación. En la naturaleza, las antocianinas se encuentran en su forma glicosilada con una o más moléculas de azúcar. La glicosilación es una modificación importante para incrementar la hidrofilia y estabilizar flavonoides hidrofóbicos. Las antocianinas son inherentemente inestables bajo condiciones fisiológicas, la glicosilación es también esencial para la estabilidad del color porque la acilación aromática que juega un papel importante en la estabilidad del color generalmente está unida a los grupos glicosídicos en las antocianinas. Los azúcares usualmente reemplazan a los grupos hidroxilo en las posiciones C-3, C-5, C-7, C-3', C-4' y C-5', siendo la posición C-3 la que se encuentra glicosilada más frecuentemente, seguida de la posición C-5.

La metilación también es una modificación frecuente observada en antocianinas (90%) con estructuras identificadas adecuadamente, basadas en las seis antocianinas comunes: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina.

La acilación es una de las modificaciones más comunes de los metabolitos secundarios en plantas, incluyendo antocianinas, más del 65% de antocianinas reportadas cuya estructura ha sido caracterizada son aciladas. La diversidad estructural de las antocianinas incrementa con la acilación con sustituyentes aromáticos o alifáticos, los cuáles generalmente se unen a las moléculas de azúcar en las antocianinas.¹¹

7.3.4.2. Efecto del pH

El pH es un factor estrechamente relacionado con el color de las antocianinas, pues estas coexisten en solución acuosa en equilibrio entre cinco especies dependiendo del pH: catión flavilio, base carbinol, chalcona, base quinoidal y pase quinoidal aniónica. El color rojo total de las antocianinas se expresa solamente en un pH fuertemente ácido, debajo de 3.5, en

solución arriba de 3.5 estos compuestos naturales presentan poca expresión de color, sin embargo en condiciones fisiológicas su intensidad de color se expresa como resultado del fenómeno de copigmentación intra e intermolecular¹⁴.

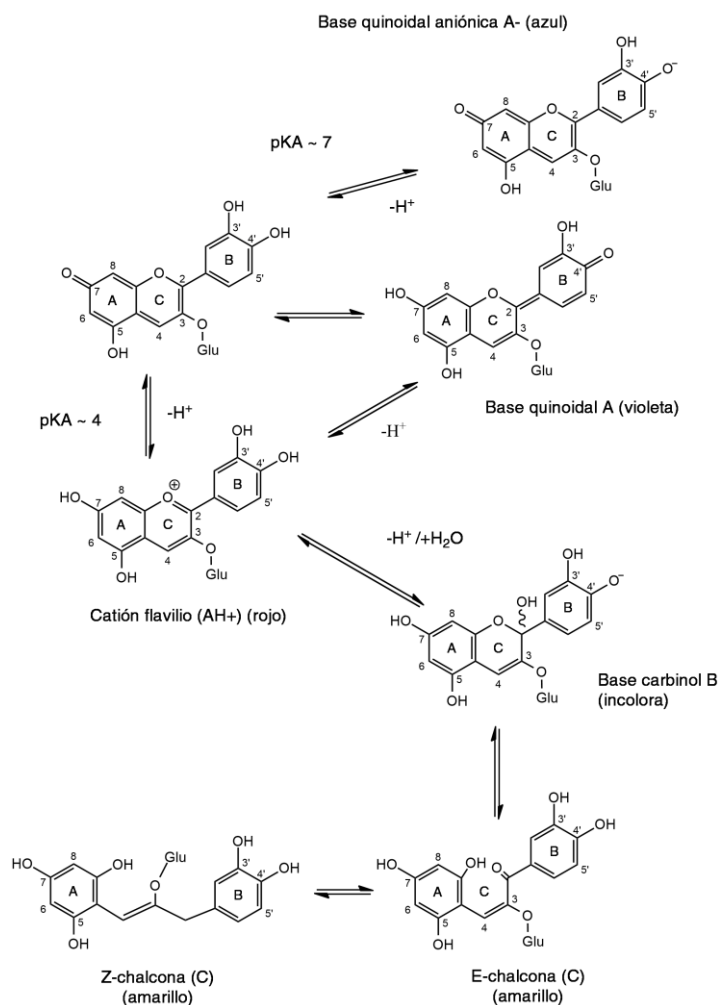


Figura 6 Transformaciones estructurales de las antocianinas (cianidina 3-O-glucósido) en solución acuosa dependiendo del pH.

7.3.4.3. Efecto de la temperatura

Las antocianinas se tornan más pálidas después de ser sometidas a calentamiento, pues el equilibrio se desplaza hacia las formas descoloridas de carbinol y chalcona¹⁵.

7.3.5. Ensayos cromatográficos

El color y comportamiento cromatográfico de las antocianinas proporcionan datos relevantes para la preparación e identificación. Las técnicas cromatográficas más utilizadas para su caracterización son: cromatografía en papel (PC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La

cromatografía en capa fina en gel de sílica, es un método práctico y de bajo costo que permite identificar la presencia de diferentes compuestos en una mezcla, utilizando sistemas de solventes como hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones para controlar la velocidad de separación en función de las interacciones moleculares de las muestras¹⁶.

7.3.6. Ensayos espectrofotométricos

Las propiedades espectrales son a menudo usadas para la caracterización de antocianinas, especialmente para identificar el tipo de antocianina, siendo el análisis espectrofotométrico UV-Vis la técnica usada comúnmente para identificar y cuantificar antocianinas, la absorción máxima a 520-540 nm en la región visible es la longitud de onda más común usada en la medición espectrofotométrica de antocianinas. El espectro de absorción de las antocianinas depende del pH.¹³

7.3.7. Propiedades biológicas

Las antocianinas y flavonoides asociados han demostrado capacidad de proteger la salud frente a una miríada de enfermedades humanas, pese a que han sido notoriamente difíciles de estudiar en relación a la salud humana, debido a que las antocianinas frecuentemente interactúan con otros fitoquímicos para potenciar efectos biológicos, haciendo difícil descifrar las contribuciones de los componentes aislados.

Los roles de las antocianinas como agentes medicinales han sido bien aceptados en la medicina tradicional alrededor del mundo y ciertamente estos pigmentos se relacionan a un amplio rango de beneficios a la salud. Por ejemplo, las antocianinas de *Hibiscus sp* históricamente se han usado en remedios para la disfunción hepática e hipertensión, mientras que las antocianinas del arándano (*Vaccinium*) tienen una historia empírica de uso en problemas de la visión, infecciones microbianas, diarrea y otros diversos problemas de salud. A pesar de que el uso de antocianinas para propósitos terapéuticos ha sido afirmado tanto por evidencia empírica como epidemiológica, hasta años recientes que algunas de las propiedades medibles de pigmentos específicos han sido verificadas por investigaciones rigurosamente controladas *in vitro*, *in vivo* o en pruebas clínicas.

Las antocianinas más coloridas son los bioflavonoides más reconocidos y visibles, su capacidad de captar radicales libres y su capacidad antioxidante son los mecanismos de acción más publicados sobre estos pigmentos en relación a sus efectos terapéuticos en

humanos, sin embargo varias investigaciones sugieren que hay otros mecanismos implicados^{17, 18}.

Tanto las antocianinas aisladas como las mezclas ricas en antocianinas pueden proveer protección de la ruptura del ADN, actividad estrogénica (alterando el desarrollo de síntomas que dependen de hormonas), inhibición enzimática, potencian la producción de citoquinas (así regulando la respuesta inmune), actividad antiinflamatoria, peroxidación de lípidos, disminución de permeabilidad y fragilidad capilar, así como fortalecimiento de membranas. La estructura química (posición, número y tipos de sustituyentes) de las moléculas individuales de antocianinas juega un papel sobre el grado en que las antocianinas ejercen sus propiedades bioactivas, así como la relación entre estructura y función tiene influencia sobre la localización intracelular de los pigmentos.

La literatura sobre antocianinas incluye cierta controversia sobre las contribuciones relativas de las antocianinas glicosiladas contra las agliconas en términos de biodisponibilidad y potencial bioactivo. Originalmente se asumía que sólo las agliconas eran capaces de entrar al sistema circulatorio, sin embargo ya se ha demostrado la absorción y el metabolismo de las antocianinas glicosiladas, la naturaleza del azúcar conjugado y de la aglicona son los que determinan la absorción y excreción tanto en humanos como en ratas¹⁹.

Estudios realizados con compuestos fenólicos, especialmente flavonoides han demostrado que su potencial antioxidante depende del número y posición de grupos hidroxilo y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, dada la deslocalización de electrones que es capaz de soportar el grupo aromático²⁰, la actividad antioxidante está presente en todas las antocianinas en mayor o menor medida, en orden decreciente de actividad antioxidante: delfinidina > malvidina > cianidina > peonidina > pelargonidina > petunidina, habiéndose demostrado que la forma glucosilada aumenta ligeramente esta actividad²¹.

7.4. Radicales libres y estrés oxidativo

Un radical libre es cualquier especie química capaz de existir independientemente que contiene uno o más electrones no apareados²². Los radicales de oxígeno se han estudiado más extensivamente en plantas pese a que hay un interés creciente en los roles de radicales de nitrógeno. El término colectivo de “especies reactivas de oxígeno” (ERO) o “intermediarios reactivos de oxígeno” (IRO) se utiliza a menudo para incluir tanto a los radicales de oxígeno y derivados no radicales de oxígeno que tienen propiedades químicas

similares. Estos incluyen el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH \cdot), radical peróxido (ROO \cdot), y radical alcóxido (RO \cdot), así como intermediarios no radicales como el oxígeno singlete (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y ozono (O_3).

Un desbalance entre oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes, con potencial de causar daños se denomina “estrés oxidativo”, los oxidantes se forman como un producto normal del metabolismo aerobio pero se pueden producir grandes concentraciones bajo condiciones fisiopatológicas. Un estado cuasi estable se mantiene a través de un intrincado arsenal de antioxidantes cuya protección es en parte capaz de adaptarse a las diferentes circunstancias²³.

7.4.1. Producción de radicales libres de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno son aquellas moléculas radicales y no radicales que son directamente agentes oxidantes o que fácilmente pueden convertirse en radicales libres. El oxígeno molecular se puede reducir hasta agua, los pasos intermedios de la reducción de oxígeno comienzan por la formación del anión radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, que corresponden a los pasos de reducción de uno, dos y tres electrones, respectivamente. Los radicales de oxígeno pueden ocurrir en lípidos como radicales alquilo o peroxilo.

Los oxidantes también son generados por diferentes tipos de radiación, los rayos X generan el radical hidroxilo y la radiación ultravioleta genera estados electrónicos excitados con la subsecuente formación de radicales, el ultrasonido y las microondas también pueden generar especies reactivas de oxígeno. Oxidantes que resultan del metabolismo celular pueden migrar de forma clandestina a sitios distantes donde ejercen su acción oxidante, estos incluyen compuestos o enzimas con actividades inocuas en cierto medio pero se llegan a activar para generar oxidantes en otros medios. La dieta humana contiene gran cantidad de compuestos de naturaleza oxidante y antioxidante.

7.4.2. Antioxidantes

Un antioxidante es “cualquier sustancia que, presente a bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, significativamente retrasa o inhibe la oxidación de dicho sustrato”. Esta definición incluye compuestos tanto de naturaleza enzimática como no enzimática. La diversidad existente de antioxidantes es comparable a aquella de oxidantes.²⁴

7.4.3. Niveles de acción antioxidante

Los mecanismos de neutralización de radicales libres de los antioxidantes actúan a diferentes niveles: prevención, intercepción y reparación.

- **Prevención:** el mecanismo de antioxidantes del tipo preventivo implica convertir la especie atacante en un producto menos dañino, disminuyendo el riesgo de que cause un mayor daño. V gr, proteínas ligantes de metales como ferritina, ceruloplasmina, metalotioneína.
- **Intercepción:** el objetivo de estos antioxidantes es interceptar una especie dañina, una vez formada para prevenir que realice más reacciones perjudiciales. V gr, compuestos fenólicos, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión (GSH) peroxidasa.
- **Reparación:** la protección de los efectos de los antioxidantes ocurre mediante la reparación del daño hecho, tomando en cuenta que tanto la prevención como la intercepción no son completamente efectivas, los productos que hayan quedado pueden causar daño, para evitarlo hay una variedad de sistemas enzimáticos que reparan las estructuras susceptibles como DNA y lípidos^{24, 25}.

7.5. Microscopía

Por definición, la microscopía es el uso de un microscopio para hacer que objetos extremadamente pequeños se vean de mayor tamaño para hacerlos visibles, la microscopía convencional se vale de un haz de luz para iluminar una delgada capa de material, este material puede estar teñido para propiciar un contraste entre sus componentes, la luz visible se apunta a través del material y se colecta en una lente, lentes adicionales pueden aumentar la imagen de ser requerido para ser visible al ojo del observador.²⁶

7.5.1. Microscopía Electrónica de Transmisión

Los microscopios electrónicos de transmisión son instrumentos de aumento que utilizan un haz de electrones como fuente de iluminación para examinar muestras, la palabra “transmisión” se refiere al hecho de que estos microscopios forman una imagen a partir de electrones que pasan a través de la muestra en lugar de ser reflejada o emitida por su superficie. Los haces de electrones utilizados para iluminación tienen longitudes de onda relativamente cortas, permitiendo visualizar objetos tan pequeños como átomos individuales.

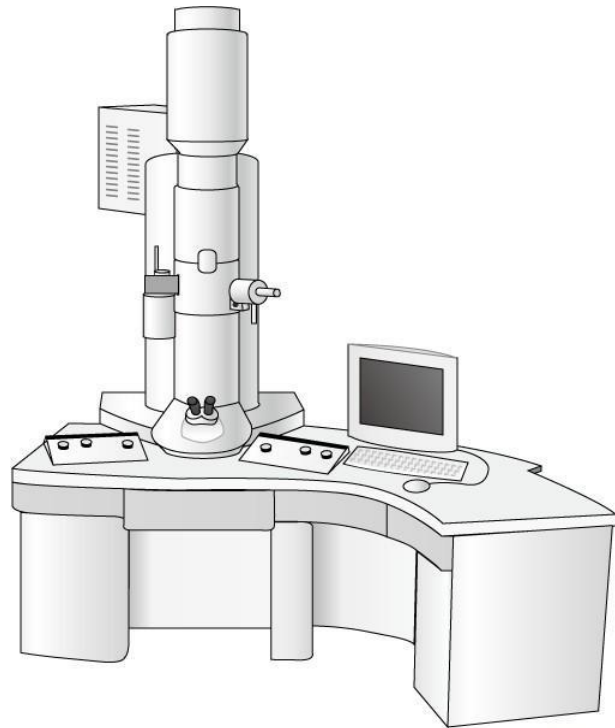


Figura 7 Microscopio electrónico de transmisión (TEM).

La TEM, en contraste con la microscopía óptica, la cual al usar longitudes de onda comparativamente largas de luz visible o ultravioleta como fuente de iluminación, sólo permite visualizar objetos cientos de veces más grandes que aquellos visibles en un microscopio electrónico de transmisión.

Los TEMs se parecen a los microscopios ópticos en su diseño general. La principal diferencia entre ambos es la fuente de iluminación y el tipo de lentes usadas. Un microscopio óptico usa luz incandescente o luz solar como fuente de iluminación, los TEMs usan una “pistola” de electrones que emite un haz de electrones a una longitud de onda muy corta. En un microscopio óptico, los rayos de luz se enfocan con lentes de cristal mientras que en los TEM, el haz de electrones es dirigido por lentes magnéticas, cuyos campos magnéticos son generados por espirales masivas de cables a través de los que se pasa una corriente eléctrica controlada, dando la forma necesaria a los campos magnéticos para enfocar los electrones.²⁷

7.6. Espectroscopia

La espectroscopia es el estudio de las interacciones de la luz con la materia, permite el estudio de la composición tanto de sistemas extremadamente grandes como extremadamente pequeños. Existen diferentes tipos de técnicas espectroscópicas, sin embargo la mayoría de ellas se basan en la absorción o emisión de fotones en el material de interés. Un fotón puede comportarse como partícula o como onda, la naturaleza de onda de los fotones es más crítica en la mayoría de técnicas espectroscópicas porque la longitud de onda emitida, absorbida o dispersada es donde yace la información sobre la muestra.

Las aplicaciones de la espectroscopia abarcan una variedad de disciplinas y permiten a los científicos, entre otras muchas cosas, determinar la composición elemental de una estrella enana cercana, la identidad química de una muestra de polvo blanco desconocido, si un gen transfectado se ha expresado o los tipos de enlaces individuales dentro de una molécula. Cada una de las técnicas espectroscópicas es única y se basan en uno de tres fenómenos:

- La absorción de la luz por la materia: la espectroscopia de absorción implica la absorción de fotones por la materia y puede dar información sobre los tipos de átomos o enlaces en una molécula. Un material va a absorber longitudes de onda específicas y va a reflejar o transmitir las demás longitudes de onda (v. gr, espectroscopia infrarroja con transformación de Fourier, espectroscopia de ultravioleta visible, espectroscopia de absorción atómica).
- La emisión de la luz por la materia: la espectroscopia de emisión implica la emisión de fotones de una muestra en un estado excitado (v. gr, espectroscopia de emisión atómica, espectroscopia de fluorescencia).
- La dispersión de la luz por la materia: la espectroscopia de dispersión trata con la luz que es dispersada de forma no elástica de una muestra, lo que significa que la longitud de onda e luz rebotando de la muestra no es la misma que la longitud de onda a la que la muestra fue expuesta primero (v. gr, espectroscopia de Raman)²⁸.

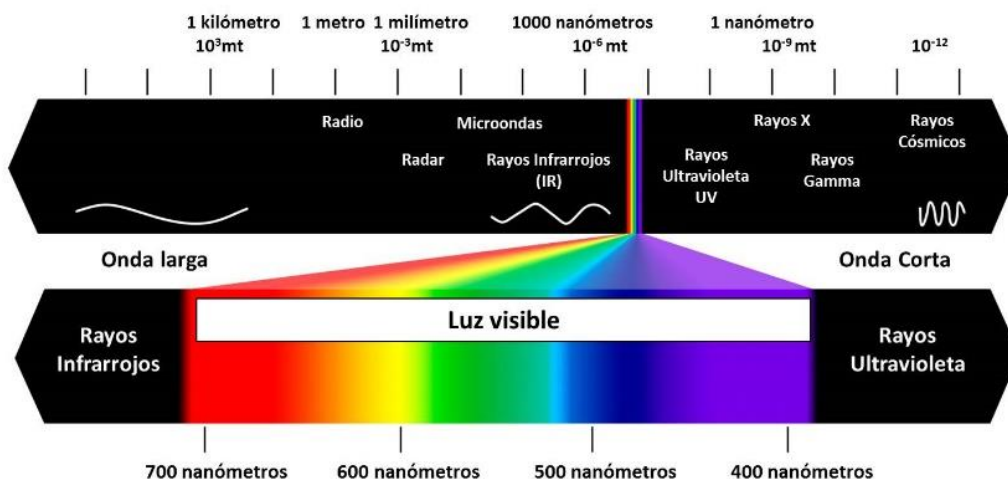


Figura 8 Espectro electromagnético.

7.6.1. Espectroscopia en la región del infrarrojo

La región infrarroja (del latín infra, que significa “por debajo” del rojo) corresponde a frecuencias que se encuentran debajo del espectro visible y encima de las microondas, es decir longitudes de onda entre 8×10^{-5} cm a 1×10^{-2} cm.

La técnica de FT-IR permite, a grandes rasgos, conocer los grupos funcionales que se encuentran en una molécula orgánica.

Los espectros de infrarrojo pueden medirse usando muestras líquidas, sólidas o gaseosas que se colocan en el haz de luz infrarroja, puede colocarse una gota de un líquido entre dos placas de sal hechas con NaCl o KBr que son invisibles a las frecuencias más importantes de la luz infrarroja. Un

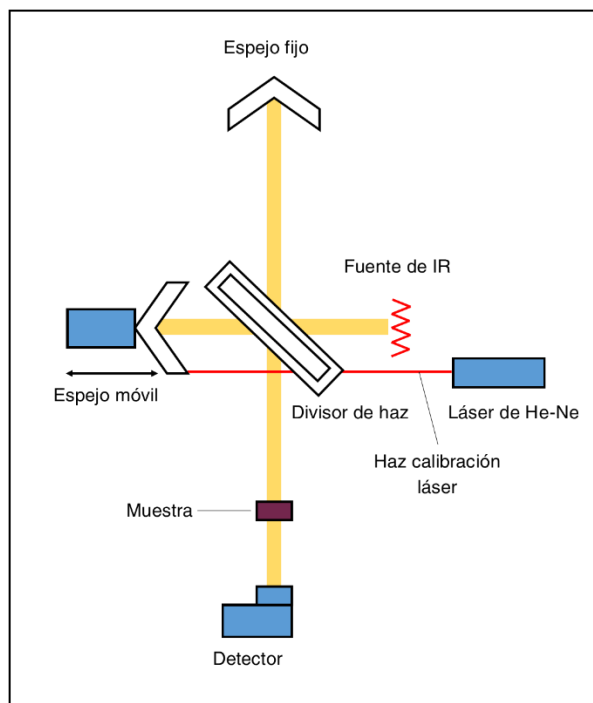


Figura 9 Diagrama de bloques de un interferómetro en un espectrofotómetro FT-IR.

espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier mide las frecuencias de la luz infrarroja absorbida por un compuesto, usando un interferómetro como el mostrado en la figura 9. Un algoritmo de cómputo estándar llamado transformada de Fourier permite observar la intensidad de la absorción como una función de la frecuencia²⁹.

7.6.2. Espectroscopia en la región ultravioleta visible

La espectroscopia ultravioleta detecta las transiciones electrónicas de los sistemas conjugados y ofrece información acerca de la longitud y estructura de la parte conjugada de una molécula.

Las frecuencias ultravioletas corresponden a las longitudes de onda más cortas y energías más altas que las infrarrojas; la región ultravioleta (UV) es un intervalo de frecuencias que va más allá de la visible, sus longitudes de onda están dadas en nanómetros (nm; 10^{-9} m). Comúnmente los espectrofotómetros UV operan en el intervalo de 200-400 nm, estos espectrofotómetros frecuentemente se extienden a la región visible y reciben el nombre de espectrofotómetros UV-visibles. Las energías UV-visibles corresponden a las transiciones electrónicas: la energía necesaria para excitar un electrón de un orbital molecular a otro³⁰.

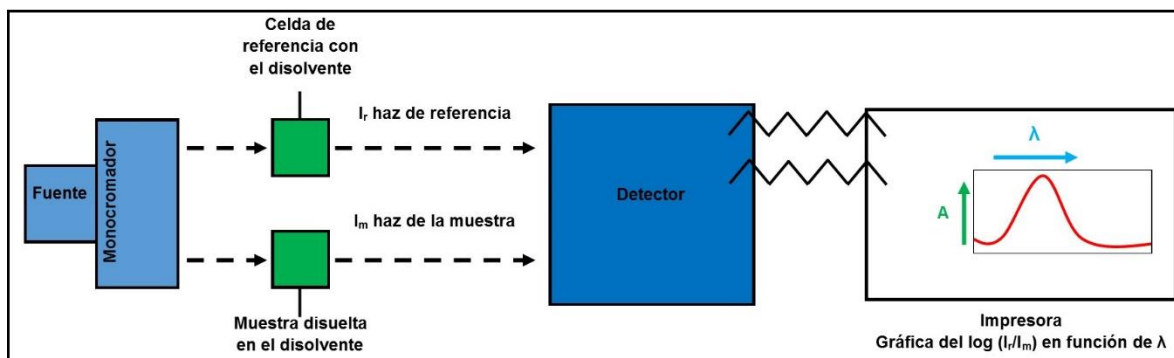


Figura 10 Diagrama esquemático de un espectrofotómetro ultravioleta.

La espectroscopia de absorción en el ultravioleta visible es una técnica muy útil para el análisis de la estructura de flavonoides. Por esta razón la interacción de flavonoides con iones metálicos se puede demostrar por espectrofotometría debido a cambios en el espectro de absorción³¹.

7.7. Nanopartículas

Las nanopartículas son unidades ultrafinas cuyas dimensiones son medidas en nanómetros (nm; mil millonésimas de metro). Las nanopartículas existen en el mundo natural y también se crean como resultado de las actividades humanas. Debido a su tamaño submicroscópico, tienen características materiales únicas, por lo que al ser manufacturadas pueden encontrar aplicaciones prácticas en una variedad de áreas, incluyendo la medicina, la ingeniería, la catálisis y la remediación ambiental.³²

7.7.1. Síntesis de nanopartículas metálicas por métodos físicos y químicos

La síntesis de nanopartículas metálicas se lleva a cabo tradicionalmente por métodos físicos y químicos que incluyen la ablación láser, condensación por gases inertes, síntesis solvotermal, reducción química y método sol-gel. Existen principalmente dos enfoques para realizar la síntesis de nanopartículas: de arriba hacia abajo (“top-down”) y de abajo hacia arriba (“bottom-up”); el primero busca crear objetos en nanoescala utilizando materiales más grandes, controlado de forma externa dispositivos microscópicos para dirigir su ensamblaje, por otro lado el enfoque de abajo hacia arriba a menudo hace uso de técnicas de microfabricación donde herramientas controladas cortan, desmenuzan y dan tamaño y forma deseada a los nanomateriales.³³

Esta variedad de métodos físicos y químicos presentan una serie de desventajas que van desde un alto gasto de energía (ablación láser), alto uso de solventes (método sol-gel) y bajos rendimientos (métodos coloidales).

7.7.2. Síntesis biogénica de nanomateriales

La biosíntesis de nanomateriales sigue un enfoque de abajo hacia arriba (“bottom-up”) donde la reacción principal es oxidación-reducción; siendo las enzimas bacterianas o los compuestos fitoquímicos de las plantas con propiedades reductoras o antioxidantes lo que propicia la reducción del metal en sus respectivas nanopartículas.

7.7.2.1. Uso de bacterias en la síntesis de nanopartículas

Se sabe que las bacterias son capaces de producir materiales inorgánicos tanto intra como extracelularmente por lo que se les considera potenciales biofábricas para la síntesis de nanopartículas de oro, plata y sulfuro de cadmio. Entre los microorganismos, las bacterias procariotas han recibido atención para la producción de nanopartículas. La formación tanto intra como extracelular de nanopartículas se ha reportado en *Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Plectonema boryanum*, *Staphylococcus currens*, *Vibrio cholerae*, etc.

Algunos microorganismos pueden sobrevivir y crecer aún a altas concentraciones de metales, en el caso de las bacterias, la mayoría de iones metálicos son tóxicos, por lo tanto, su reducción y formación de complejos insolubles en agua es un mecanismo de defensa desarrollado por las bacterias para superar la toxicidad, se cree ampliamente que las enzimas de los microorganismos juegan un papel mayor en el proceso de biorreducción,

sin embargo ha habido reportes de nanoestructuras formadas a partir de grupos de la pared celular.

7.7.2.2. *Uso de actinomicetos y hongos en la síntesis de nanopartículas*

Los actinomicetos comparten características tanto con hongos como bacterias, a pesar de ser clasificados como procariotas; el principal interés que generan los actinomicetos es su capacidad de producir metabolitos secundarios como antibióticos. Según reportes recientes, el exponer a algunas especies de actinomicetos a condiciones extremas de temperatura y alcalinidad es favorable a la producción de nanopartículas monodispersas; un potencial beneficio de este método es que las nanopartículas permanecen altamente estables en solución.

En comparación con las bacterias, los hongos tienen el potencial de producir una mayor cantidad de nanopartículas debido a que los hongos secretan una mayor cantidad de proteínas favorables a la formación de nanopartículas. Las levaduras en especial. Asimismo, en lugar de cultivos fúngicos, el uso de proteínas aisladas de estos ha demostrado ser igual de exitoso en la producción de nanopartículas. Sin embargo, los métodos microbiológicos en general, forman nanopartículas a un ritmo menor que lo observado con extractos de plantas.

7.7.2.3. *Uso de plantas en la síntesis de nanopartículas*

La ventaja de usar plantas para la síntesis de nanopartículas es que son disponibles fácilmente, de manejo seguro y poseen una gran variedad de metabolitos secundarios que tienen propiedades de reducción. Los principales fitoquímicos identificados hasta el momento son terpenoides, flavonas, cetonas, aldehídos, amidas y ácidos carboxílicos. Estudios anteriores han identificado que la temperatura de reacción juega un papel importante^{34, 35}.

7.7.3. Consideraciones en la biosíntesis de nanopartículas a partir de plantas

Se ha reportado que la biosíntesis de nanopartículas es dependiente de factores como el pH, el tiempo y temperatura de reacción, diversos grupos de investigación se han ocupado de investigar la influencia de estos factores.²

- **Efecto del pH:** El pH de reacción juega un papel crucial en la biosíntesis de nanopartículas, la influencia del pH fue investigada en 2004 por Armendáriz et al³⁶ hallando que el tamaño de las nanopartículas de oro biosintetizadas a partir de

extracto de *Avena sativa* variaba según el pH de la reacción. Especialmente en el caso de las antocianinas el pH influye en su capacidad de reducción.

- **Temperatura de reacción:** Estudios previos revelan que la temperatura de reacción tiene influencia en el tamaño y forma final de las nanopartículas biosintetizadas con extractos de plantas³⁷ así como en la cantidad que se forma, este parámetro está ampliamente relacionado con el tiempo de contacto de la reacción.
- **Tiempo de contacto:** Es el tiempo necesario para completar la reacción de biosíntesis. Los metabolitos de las plantas son mejores candidatos que los microorganismos dado que el tiempo de incubación requerido es mucho menor.

7.8. Microbiología

7.8.1. Bacterias

Microorganismos unicelulares procariontes (carecen de núcleo) que pueden o no causar daño y se reproducen por fisión binaria. De acuerdo al Árbol de la Vida de Woese, microbiólogo creador de la nueva taxonomía molecular basada en la comparación entre especies de la fracción 16s del ARN ribosomal, se proponen 3 dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya*, en los que se incluye a todos los seres vivos, los dominios *Archaea* y *Bacteria* corresponden a las células procariontes, una de cuyas características es la de carecer de membrana nuclear. Con base en el estudio de fósiles y modelos, se calcula que emergieron hace unos 3.6 - 4 billones de años. Su importancia radica en el hecho de haber desarrollado una pared celular o membrana externa que les confirió, desde el principio, de autonomía y protección con respecto a su medio ambiente. Desde entonces constituyeron la forma de vida más abundante en el planeta en términos de biomasa y número de especies.

A pesar de su menor complejidad en relación a *Eucarya*, los integrantes de los dominios *Archaea* y *Bacteria* pueden vivir en hábitats extremos: se les encuentra en las profundidades de la Tierra, sobreviviendo gracias al lento catabolismo del carbono orgánico depositado en los sedimentos, y en las profundas fuentes hidrotermales submarinas. Ambos grupos comprenden organismos diminutos que varían en tamaño desde 0.2 a 10 micrómetros de diámetro; en comparación, las células eucarióticas miden de 10 a 100 micrómetros de diámetro³⁸.

7.8.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Son patógenos oportunistas, ubicuos en la naturaleza: suelo, compuestos orgánicos en descomposición, vegetación y en el agua. Infortunadamente también son ubicuos en ambientes hospitalarios: reservorios húmedos como los alimentos, flores cortadas, lavabos,

baños, trapeadores para fregar suelos, equipos de diálisis y de terapia respiratoria e incluso en las soluciones desinfectantes. La amplia distribución de *Pseudomonas* se explica por sus sencillas exigencias para crecer y su versatilidad nutricional.

La especie *Pseudomonas* suele incluir bacilos gramnegativos rectos o ligeramente curvados, generalmente inmóviles, de dimensiones 0,5-1x1,5-5µm, a menudo se disponen en parejas, se describen como aerobios obligados, pudiendo crecer de forma anaerobia utilizando nitratos o arginina. Sus colonias presentan citocromo oxidasa, algunas se presentan mucoides por la abundancia de una cápsula de polisacárido, algunas producen pigmentos difundibles.

El origen del nombre del género proviene de *pseudes*, falso y *monas*, una unidad (falsa unidad, aludiendo al aspecto que presentan en una tinción de Gram de parejas de microorganismos que parecen una célula suelta); *aeruginosa*, repleto de óxido de cobre o verde (en referencia al pigmento sintetizado por esta especie).

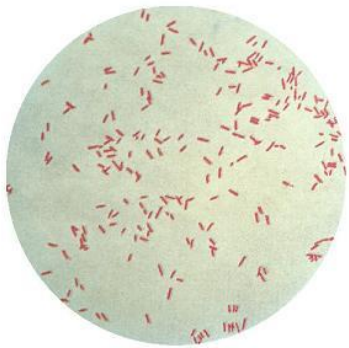


Figura 11 *Pseudomonas aeruginosa* con tinción de Gram.

Múltiples factores de virulencia: adhesinas (flagelos, pili, LPS, y cápsula de alginato), las toxinas secretadas y enzimas (exotoxina A, piocianina, pioverdina, elastasas, proteasas, fosfolipasa C, exoenzima S y T) y resistencia antimicrobiana.

Las infecciones que ocasiona incluyen infecciones respiratorias (graves en el caso de pacientes con fibrosis quística), urinarias, de piel y tejidos blandos, oculares, auditivas, así como

bacteriemia y endocarditis.

7.8.2. Cocos grampositivos

Los cocos grampositivos son un grupo heterogéneo de bacterias con varias características en común, tales como su forma esférica, su reacción a la tinción de Gram y la ausencia de endosporas. Una forma de clasificación es mediante la presencia o ausencia de actividad de catalasa. Uno de los géneros importantes de este grupo es *Staphylococcus*, el origen del nombre de este género proviene de *staphylé*, racimo de uvas y *coccus*, grano o baya (grano en forma de uva).

El nombre del género *Staphylococcus* se refiere al patrón en que las bacterias de este género se agrupan en una forma que recuerda un racimo de uvas. La mayoría de estafilococos tienen un diámetro de entre 0,5 y 1 μm , son anaerobios facultativos, inmóviles y son capaces de crecer en medios con una elevada concentración de sal y a temperaturas de 18-40°C. Estas bacterias suelen estar presentes en piel y mucosas del ser humano, ejemplo de ello es que *Staphylococcus aureus* coloniza las narinas anteriores en adultos; no así en niños, cuya presencia puede ser causa de enfermedad.

7.8.2.1. *Staphylococcus aureus*

Según su etimología, proviene de *aureus*, dorado (dorado o amarillo). Son cocos grampositivos catalasa-positivos dispuestos en cúmulos o racimos; se caracterizan por la presencia de coagulasa, proteína A, y ácido teicoico ribitol específico de la especie con residuos de N-acetilglucosamina (polisacárido A). Las colonias de *S. aureus* toman un color amarillo o dorado, como consecuencia de los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, dando el nombre a la especie, es la única especie presente en humanos que produce la enzima coagulasa.

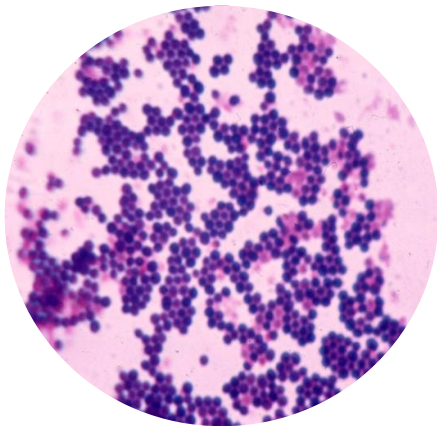


Figura 12 *Staphylococcus aureus* con tinción de Gram.

Los factores de virulencia implican componentes estructurales que facilitan la adherencia a los tejidos del hospedero y evitan la fagocitosis, así como distintas toxinas y enzimas hidrolíticas. Las enfermedades con que se relaciona son mediadas por toxinas (intoxicaciones alimentarias, síndrome de shock tóxico, síndrome de la escaldadura cutánea), enfermedades piógenas (impétigo, foliculitis, forúnculos, carbuncos, infecciones de heridas), entre otras enfermedades sistémicas.

7.8.2.2. *Staphylococcus epidermidis*

Tomando en cuenta que los estafilococos son bacterias que colonizan la piel y mucosas de humanos y otros mamíferos, *S. epidermidis* en particular forma parte de la mayoría de la microflora del epitelio humano, es predominante en axilas, cabeza y narinas.

S. epidermidis pertenece al grupo de coagulasa negativos, lo cual lo diferencia de *S. aureus*. Las infecciones por *S. epidermidis* son oportunistas, nosocomiales y generalmente esta asociado a los implantes de prótesis, catéteres e intervenciones quirúrgicas.³⁹

7.8.2.3. *Staphylococcus saprophyticus*

El nombre de la especie proviene de *sapros*, pútrido y *phyton*, planta (saprófito o que se desarrolla en tejidos muertos). Conocido por originar infecciones del tracto urinario e infecciones oportunistas, carece de coagulasa.⁴⁰

8. Metodología

8.1. Extracción de la antocianina

Se agregaron 100 gr de cáscara de ciruela⁴¹ en 1 litro de etanol acidificado al 0.01% con HCl, la mezcla fue licuada por 10 minutos y posteriormente filtrada con un filtro Whatman No.1, dejando reposar una noche. Se evaporó el etanol en un rotavapor Büchi a una temperatura no mayor a 40°C, con el fin de obtener el extracto concentrado y poder diluirlo a continuación.



Figura 13 Cáscara de ciruela roja (*Prunus domestica* L).

8.2. Purificación del pigmento

El extracto obtenido contiene los pigmentos de interés pero a su vez, al tratarse de un extracto derivado desde tejidos biológicos es susceptible de contener interferencias tales como compuestos fenólicos, azúcares y ácidos orgánicos, para su eliminación se realizó el siguiente método:

- **Resina PVPP (Polivinil-poli-pirrolidona).**- Su uso principalmente se enfoca al aislamiento de compuestos polares no fenólicos. Este procedimiento consiste en colocar en un embudo Büchner un filtro Whatman No.1 junto con una cama de 1 cm de la resina. Ésta se activa por medio de agua acidificada al 0.01% de HCl seguido de etanol acidificado al 0.01%. El extracto se pasa por la resina recuperando la antocianina con el etanol acidificado. Posteriormente se concentra la antocianina purificada evaporando en rotavapor a 40°C para evaporar el etanol.
- **Cartuchos fase reversa C18.**- Su propósito es separar compuestos relativamente hidrofóbicos como las antocianinas de compuestos más polares como azúcares y ácidos.

Se condiciona el cartucho con 5 ml de agua acidificada seguido de 5 mL de etanol acidificado y 3 mL de agua acidificada de nuevo, para remover el etanol restante. Se colocan 2 mL del extracto obtenido de la PVPP y se lava el cartucho con 4mL de agua acidificada en un matraz Kitasato; en seguida se agrega la antocianina por el cartucho por medio de 4mL de etanol acidificado en otro Kitasato. Como siguiente paso, se remueve el etanol para obtener el extracto concentrado por medio de rotavapor Büchi a 40°C.

8.3. Determinación de la concentración de antocianinas

De acuerdo al método de pH diferencial⁴², tomando en cuenta las estructuras que pueden formar las antocianinas al exponerlas a diferentes pH se midió la concentración de antocianinas totales en el extracto de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de antocianina } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A * PM * FD * 1000}{\epsilon * 1}$$

Donde:

$$A = (A_{\lambda \lambda_{\text{vis max}}} - A_{\lambda \lambda_{700 \text{ nm}}})_{\text{pH1}} - (A_{\lambda \lambda_{\text{vis max}}} - A_{\lambda \lambda_{700 \text{ nm}}})_{\text{pH4.5}}$$

Siendo $A_{\lambda \lambda_{\text{vis max}}}$ la absorbancia máxima de la antocianina, $A_{\lambda \lambda_{700 \text{ nm}}}$ es la lectura de corrección debida a sustancias interferentes, ϵ es la absortividad molar de la antocianina mayoritaria, PM es el peso molecular de la antocianina mayoritaria y FD es el factor de dilución.

Se añadió 1 mL de muestra purificada en 9 mL de buffer pH 1.0 de HCl 0.025M y se hizo un barrido espectroscópico en un espectrofotómetro Cary 50 Conc. Spectrometer desde 400 nm hasta 700 nm. Asimismo, se realizó este procedimiento para la muestra con el buffer de pH 4.5 de acetato de sodio 0.4M.

Como siguiente paso, se tomó el valor de $A_{\lambda \lambda_{\text{vis max}}}$ para la muestra a los dos pH y el valor de $A_{\lambda \lambda_{700 \text{ nm}}}$. Para los cálculos se tomó en consideración que la antocianina mayoritaria es cianidina-3-glucósido⁴³ cuya ϵ es de $29600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, de peso molecular 445.2g/mol, junto con un factor de dilución de 10.

Se tomó 1ml del sistema y se ajustó el pH a 1.0 con 10 µl de HCl concentrado, y a pH 4.5 con 10 µl de NaOH 4M, realizando mediciones en ambos pH de la longitud de onda máxima, y aquella a 700 nm para medir la concentración de antocianinas por el método del pH diferencial.

8.4. Determinación de actividad antioxidante por el método del DPPH

Entre los métodos para medir la capacidad antioxidante, la reacción con 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, DPPH es uno de los más reconocidos⁴⁴, este método se basa en medir la eliminación de radicales libres propiciada por los compuestos antioxidantes sobre el radical según el método descrito por Brand-Williams⁴⁵ y modificado por Kim et al⁴⁶.

Este método se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH· 100mM (3.9 mL) disuelto en metanol al 80%, a una longitud de onda de 517nm. Se añaden 0.1mL de la muestra, la mezcla se homogeniza cuidadosamente, y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. La concentración de DPPH· en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresan en TEAC (actividad equivalente a Trolox), gr Trolox/g de muestra. El porcentaje de inhibición se establece de acuerdo a la siguiente ecuación^{25, 47}.

$$\% \text{ inhibición} = \left\{ \left[(4.81) \left(\frac{\mu\text{g Trolox}}{\text{mL}} \right) \right] - 4.51 \right\} \quad R^2 = 0.99$$

Tanto el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%) utilizado como antioxidante de referencia, como el DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132) proceden de Sigma Aldrich (Dorset, UK).

Las muestras analizadas incluyen los extractos de cáscara de ciruela roja diluidos en etanol y muestras de sobrenadante y sedimento de las nanopartículas obtenidas a 25°C, 45°C y 65°C/3h, con un tratamiento de centrifugación en una microcentrífuga digital marca Dragon D2012 a 15000 RPM durante 5 minutos.

8.5. Biosíntesis

La biosíntesis de nanopartículas de cobre (CuNPs) mediante el uso de extracto de cáscara de ciruela roja se realizó diluyendo en etanol el extracto seco a una concentración de 11.4% peso volumen en un matraz de aforación de 25 ml.

Se preparó una solución de cloruro de cobre (CuCl₂) al 0.01 N añadiendo 0.1344g de sal de cloruro de cobre en 120 ml de etanol, procedentes de Sigma Aldrich (Dorset, UK).

La síntesis de nanopartículas se llevó a cabo en un equipo conformado por mantas de calentamiento para matraz bola con agitación constante con refrigerantes conectados a un sistema mecánico de recirculación de líquido refrigerante, con la disposición de termómetro y cronómetro para controlar tiempo y temperatura de la reacción.

- Experimento 1

Con la finalidad de ver la relación entre tiempo de reacción y temperatura con el tamaño de partícula

1mL de extracto -6 mL de etanol -1 mL de CuCl_2

Temperaturas de reacción: 25°C, 45°C, 65°C

Tiempo de reacción: 3 horas.

Análisis UV-Vis usando como línea base Solución A (1mL del extracto con 7mL de etanol)

Análisis UV-Vis diluido 1:1000 usando como línea base la Solución A diluida de 1:1000

Análisis infrarrojo de cada reacción (25°C, 45°C y 65°C)

- Experimento 2

1mL de extracto -6 mL de etanol -1 mL de CuCl_2

Temperaturas de reacción: 25°C, 45°C y 65°C

Tiempo de reacción: 30 min

Análisis UV-Vis usando como línea base Solución A (1mL del extracto con 7mL de etanol)

Análisis UV-Vis diluido 1:1000 usando como línea base la Solución A, diluida de 1:1000

Análisis infrarrojo de cada reacción (25°C, 45°C y 65°C)

- Experimento 3

Comprobar que el cambio es por la temperatura y tiempo de reacción y no está involucrado el oxígeno del aire.

1mL de extracto -6 mL de etanol -1 mL de CuCl_2

Temperaturas de reacción: 25°C, 45°C y 65°C

Tiempo de reacción: 3 horas

Con atmosfera inerte

Análisis UV-Vis usando como línea base Solución A (1mL del extracto con 7mL de etanol)

Análisis UV-Vis diluido 1:1000 usando como línea base la Solución A diluida de 1:1000

Análisis infrarrojo de cada reacción (25°C, 45°C y 65°C)

- Experimento 4

Como blanco de reacción para comprobar que la señal en ultravioleta visible es debido a las nanopartículas y no al extracto.

1 mL de extracto -7 mL de etanol

Temperaturas de reacción: 25°C, 45°C y 65°C

Tiempo de reacción: 3 horas

Análisis UV-Vis usando como línea base Solución A (1 mL del extracto con 7 mL de etanol)

Análisis UV-Vis diluido 1:1000 usando como línea base la Solución A diluida de 1:1000

Análisis infrarrojo de cada reacción (25°C, 45°C y 65°C)

8.6. Análisis mediante espectroscopia en el UV-Visible

Se realizaron los análisis en un espectrofotómetro Cary 50 Conc. Spectrometer desde 400 nm hasta 700 nm con el uso de una celda de cuarzo de 1 cm. Para realizar el análisis, línea base etanol, esta se medía siempre primero, posteriormente la celda de cuarzo se enjuagaba con etanol y se usaba hasta estar completamente seca, para medir alícuotas de cada una de las reacciones realizadas y la solución A sin CuNPs.

8.7. Análisis mediante espectroscopia FT-IR

Se realizaron en un espectrofotómetro infrarrojo Digilab Scimitar Series FT-IR spectrometer. Previa preparación manual de pastilla de bromuro de potasio se indica al equipo correr el fondo para que el aire circundante no interfiera con la medición, una vez realizado esto, a la pastilla de bromuro de potasio (KBr) se añade con una pipeta Pasteur una gota de muestra, ingresándola al aparato y corriendo el análisis que arroja el espectro el cual después de la corrección pertinente de la línea base se procede a guardar para su posterior impresión.

8.8. Microscopía Electrónica de Transmisión

Los Ensayos de TEM fueron realizados por el Dr. Odilón Vázquez Cuchillo, se envió 1 ml de cada disolución de CuNPs a 25°C, 45°C y 65°C, así como de la solución A y la solución de trabajo de cloruro de cobre en vial ámbar para evitar cualquier exposición a la luz durante el traslado con fecha 1 de enero de 2016.

8.9. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos, se tomaron en cuenta las especificaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute⁴⁸. Los ensayos se realizaron por triplicado.

- **Microorganismos:** Se ensayaron los diferentes extractos frente a una cepa bacteriana Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* y cuatro cepas bacterianas Gram-positivas, dos cepas *Staphylococcus epidermidis* (A y B) y dos cepas *Staphylococcus saprophyticus* (A y B) de origen ambiental aisladas en la zona urbana de la Ciudad de Puebla. La cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se utilizó como cepa testigo.
- **Medio de cultivo:** Se utilizó agar Mueller-Hinton (Difco™) y se preparó según las especificaciones del fabricante. Se realizaron cuatro pozos en cada placa, adicionando primero 20 ml del medio se dejó solidificar y se colocaron cilindros de 5 mm de diámetro y 10 mm de largo, posteriormente se agregaron 15 ml más de medio y se dejó solidificar.
- **Preparación del inóculo:** A partir de una placa de cultivo con crecimiento activo se tomó un inóculo y se colocó en solución salina isotónica (SSI) estéril, se ajustó la concentración al tubo 0,5 de MacFarland equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml.
- **Controles:** Como control negativo se utilizó solución salina estéril. El control positivo para las cepas de *Staphylococcus* fue Vancomicina (30 µg/ml) e Imipenem (10 µg/ml) para *Pseudomonas aeruginosa*.
- **Realización del ensayo:** Se realizó sembrado masivo con hisopo de cada una de las bacterias en SSI, en las diferentes placas de agar Mueller Hinton con los pozos. Posteriormente se adicionaron en los pozos 50 µl de cada uno de los extractos a probar, con control positivo y control negativo en cada placa. Las placas se incubaron a 37 °C por 18-24 horas. Después del tiempo de incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición en milímetros (mm).

9. Discusión de resultados

9.1. Determinación de la concentración de antocianinas

Tabla 3 Se indican los resultados de las absorbancias a 520 nm y 700 nm a pH 1.0 y 4.5 respectivamente, considerando un $FD=200$.

N° Muestra	pH 1.0		pH 4.5		Antocianinas monoméricas (mg/100g)
	A_{510nm}	A_{700nm}	A_{510nm}	A_{700nm}	
1	0.347	0.009	0.016	0.002	40.15
2	0.348	0.002	0.018	0.002	39.92
3	0.348	0.002	0.024	0.002	39.70

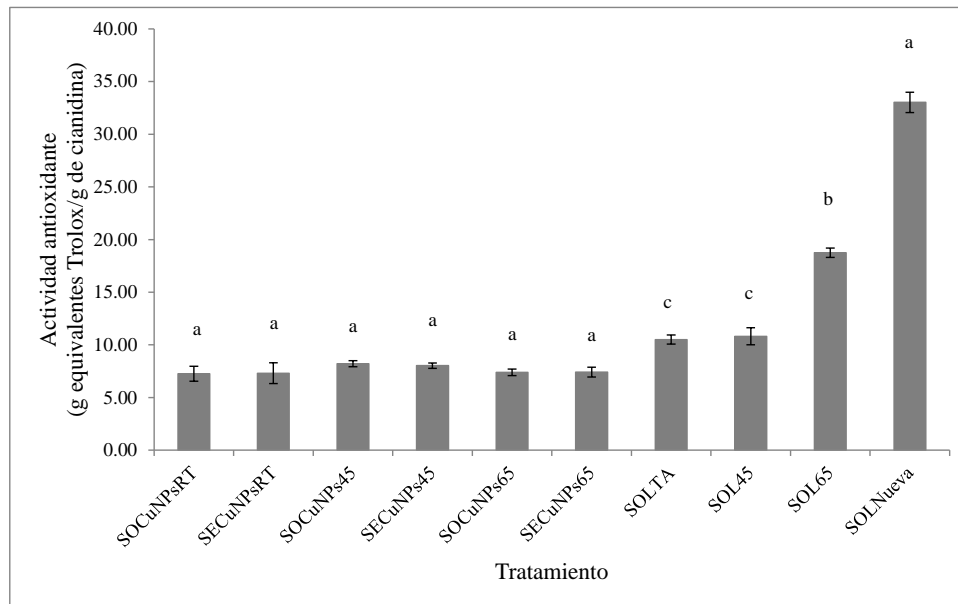
Antocianinas monoméricas promedio **39.92mg/100g** de cáscara.

Se obtuvo un promedio de **39.92mg/100g** de cáscara, lo cual según Timberlake, 1988, se encuentra sobre el rango reportado previamente de 2-25 mg/100g de fruta completa para algunas variedades de ciruela. Es importante destacar que la cáscara es el mayor depósito de antocianinas⁴¹, por lo cual la cantidad obtenida en este trabajo supera a lo reportado por Timberlake que midió la cantidad de antocianinas en fruta completa.

9.2. Determinación de la capacidad antioxidante por el método del DPPH

Tratamiento	Clave	% inhibición	TEAC ^a
Sobrenadante (CuNPs RT) 070814	SOCuNPsRT	12.9±1.7	7.3±0.7d
Sedimento (CuNPs RT) 070814	SECuNPsRT	13.0±2.4	7.3±1.0d
Sobrenadante (CuNPs 45°C) 070814	SOCuNPs45	15.2±0.7	8.2±0.3d
Sedimento (CuNPs 45°C) 070814	SECuNPs45	14.8±0.6	8.0±0.3d
Sobrenadante (CuNPs 65°C) 070814	SOCuNPs65	13.2±0.7	7.4±0.5d
Sedimento (CuNPs 65°C) 070814	SECuNPs65	13.3±1.1	7.4±0.5d
LB ECR + EtOH Sol A 1:7(RT)	SOLTA	20.7±1.0	10.5±0.4c
ECR + EtOH 45/3h 050214	SOL45	21.4±1.9	10.8±0.8c
ECR + EtOH 65/3h 050214	SOL65	40.5±1.0	18.8±0.4b
Sol A nueva (21082014)	SOLNueva	35.1±1.2	33.0±1.0a

^a(g de Trolox/g de cianidina)



Gráfica 1 Actividad antioxidante de las muestras de extracto de ciruela roja con nanopartículas (CuNPs) y sin nanopartículas.

La capacidad antioxidante de la ciruela roja (*Prunus domestica*) resultó alta, de 33 ± 1 g de Trolox/g de cianidina (TEAC) para la solución de *Prunus domestica* diluida en etanol 1:7. Las diluciones estudiadas presentan actividad antioxidante equiparable o mayor que Trolox. Estudios anteriores respecto a la actividad antioxidante de las antocianidinas y sus glucósidos, encontraron un porcentaje de radicales inhibidos de 32 ± 1 para la cianidina-3-O-glucósido, mientras que 33 ± 1 para la cianidina aglicona, usando la técnica del DPPH^{21, 49}.

Las muestras con nanopartículas presentaron una actividad antioxidante reducida en comparación con las muestras sin CuNPs, esto debido a que la actividad antioxidante de la antocianina se vio reducida por la presencia del cobre ocupando el mismo mecanismo de reducción de radicales libres que posee la cianidina-3-O-glucósido.

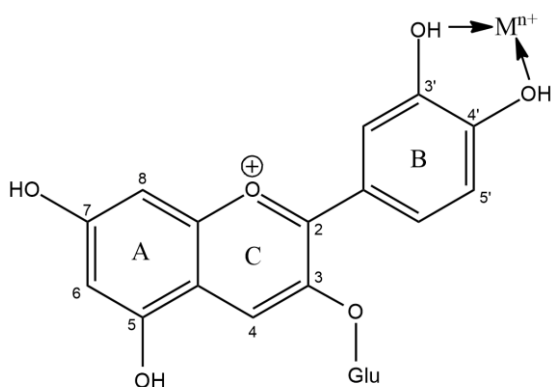


Figura 14 Estructura de la cianidina-3-O-glucósido reduciendo un metal.

Entre las mismas muestras de cianidina-3-O-glucósido sin nanopartículas también hubo diferencias considerables, esto debido al tiempo que pasó entre la preparación de la soluciones y el análisis

9.3. Biosíntesis



Figura 15 Equipo donde se llevaron a cabo las reacciones de biosíntesis de nanopartículas de cobre (CuNPs).

- **Experimento 1:** La mezcla de reacción se preparó en una proporción 1:6:1 de extracto de cáscara de ciruela roja, solvente y solución de sal de cobre, respectivamente; tomando 1 ml de solución al 11.4% de extracto de cáscara de ciruela roja se diluyó en 6 ml de etanol, la adición de cloruro de cobre no se realizó sino hasta que cada reacción alcanzara una temperatura estable en agitación constante. Se realizaron 3 reacciones a temperaturas diferentes: 25°C o temperatura ambiente, 45°C y 65°C con un tiempo de reacción de 3 horas cada una.

En un principio la dilución sin sal de cobre presentaba el color rojo característico, durante la reacción y posterior a la adición de la solución de cloruro de cobre, se observó que el color de la mezcla de reacción cambiaba a un color marrón oscuro, esto dependiendo de la temperatura, mientras mayor era la temperatura de reacción más rápido se daba el cambio de color.

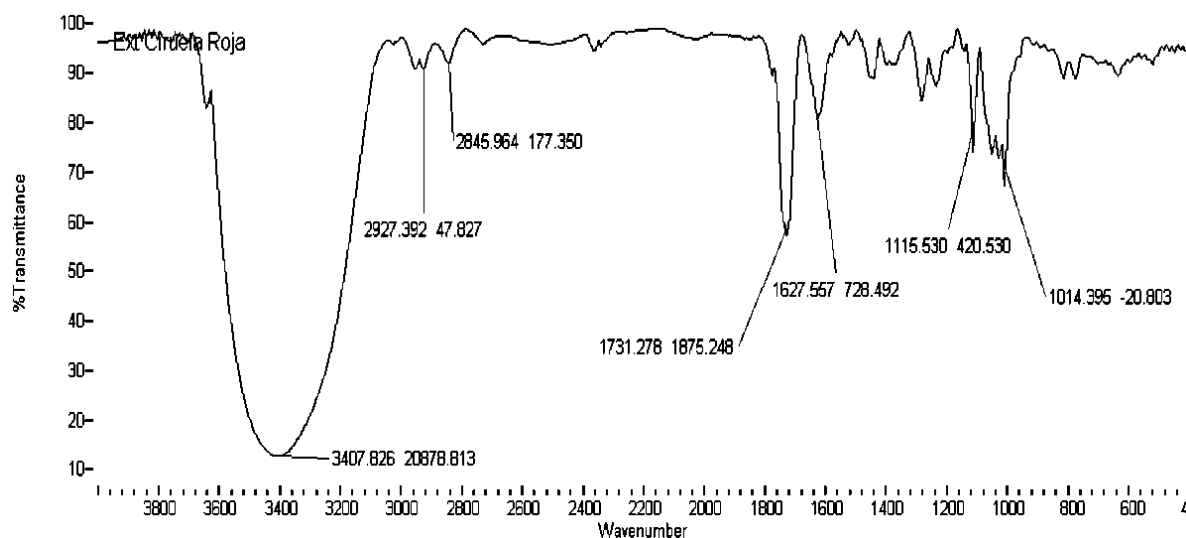
- **Experimento 2:** Se pudo apreciar un ligero cambio de color en cada una de las reacciones que no fue tan intenso dado el reducido tiempo de reacción, pero al haberlo se concluyó que hubo formación de nanopartículas.
- **Experimento 3:** Este experimento a llevarse a cabo con direcciones semejantes al experimento 1 con atmósfera inerte no se realizó debido a que mediante los análisis FT-IR se comprobó que la antocianina era estable pese a estar en contacto con el oxígeno del ambiente, además no se contaba con el equipo apropiado para realizar este experimento.
- **Experimento 4:** Este experimento como blanco de reacción se realizó sin la adición de CuCl_2 a la mezcla de reacción.

Otros grupos de estudio han obtenido nanopartículas de metales con extracto total de *Prunus domestica* L. a temperatura ambiente (25°C) con formación de nanopartículas a las 0.16 horas de reacción, con un pico máximo de formación de nanopartículas a las 4 horas de reacción⁵⁰, en contraste, el experimento realizado en el presente trabajo el extracto fue purificado para obtener la parte antociánica removiendo compuestos que pudieran interferir

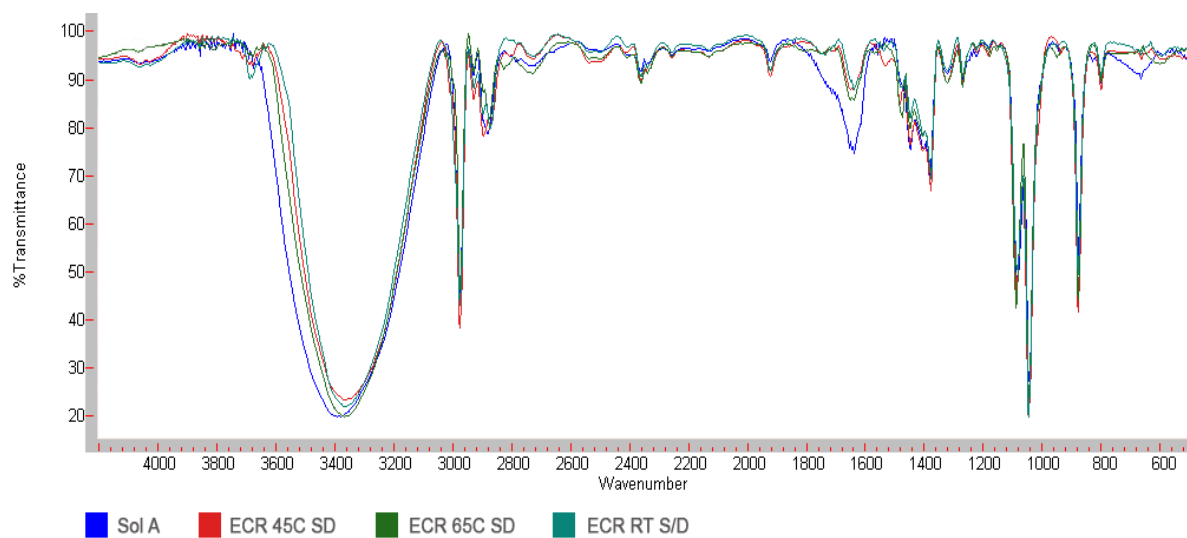
como compuestos fenólicos y ácidos y se buscó la capacidad de las antocianinas para reducir los iones de cobre y formar nanopartículas.

9.4. Análisis espectrofotométrico en el área infrarroja

Por medio de este análisis se comprobó que la antocianina de interés (Cianidina-3-O-glucósido) se presentó estable a las temperaturas de reacción, por lo que se determinó que se encontraba en su forma glucosilada que es la más estable^{13,51}, ya que la aglicona reporta una resistencia baja a temperaturas mayores de 45°C, en la gráfica 3 se presentan los espectros FT-IR donde no se aprecian cambios importantes respecto al extracto inicial con las señales alrededor de 3400 cm⁻¹ correspondiente a los hidroxilos, entre 2700 y 2900 cm⁻¹ de enlaces C-H, 1731.27 cm⁻¹ grupos acilo, 1627.5 cm⁻¹, 1444.5 cm⁻¹ enlaces C=C, enlaces C-O entre 1115.5 cm⁻¹ y 1014.3 cm⁻¹ en la estructura de la antocianina, a pesar de las temperaturas de reacción alcanzadas no perdió su estructura inicial, las bandas correspondientes al carbonilo C=O en 1731 cm⁻¹ disminuyeron en la gráfica 3 respecto a la gráfica 2 porque el extracto crudo podría tener la presencia de la forma oxidada debido al pH de la solución recién preparada, el cual tiene presencia de carbonilos respecto de hidroxilos cuando las soluciones ya habían sido tratadas con cobre y sometidas a las condiciones de reacción.



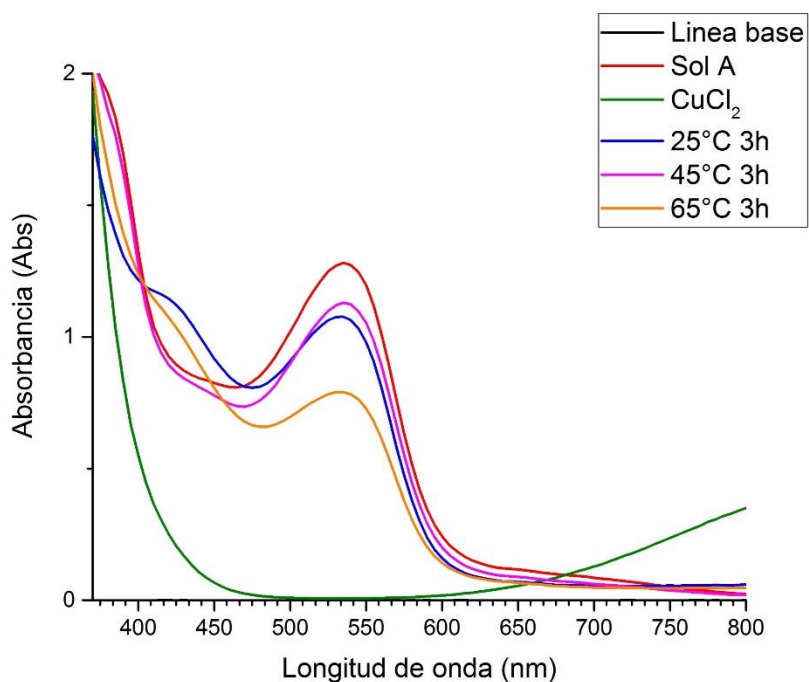
Gráfica 2 Primer espectro infrarrojo de extracto de cáscara de ciruela roja en etanol sin CuNPs.



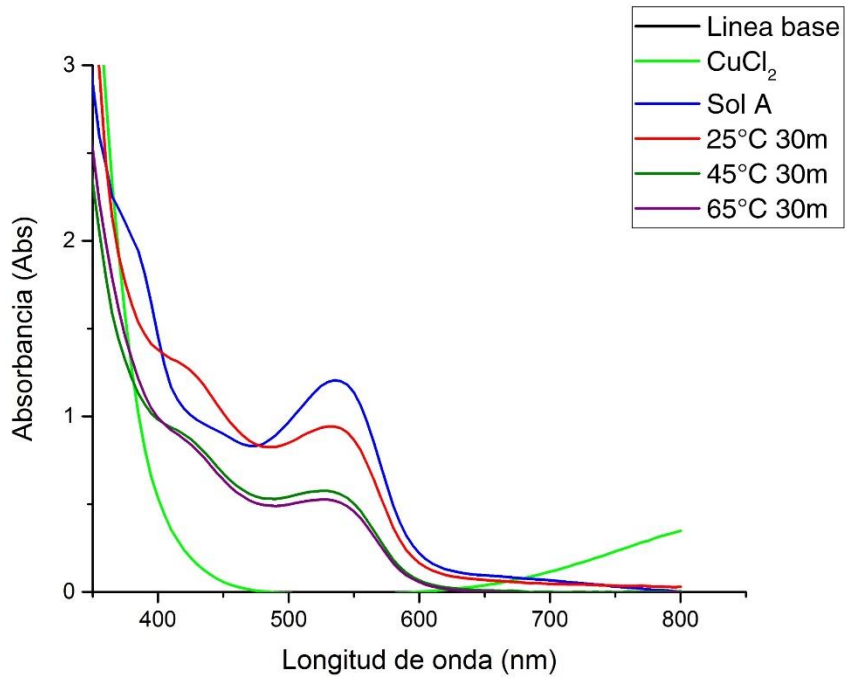
Gráfica 3 Comparativa de los espectros infrarrojos del experimento 1; Sol A sin CuNPs, ECR 45C SD con CuNPs, ECR 65C SD con CuNPs y ECR RT S/D con CuNPs.

9.5. Análisis espectrofotométrico en la región ultravioleta visible

Se presentaron pocas diferencias entre las nanopartículas formadas en el experimento 1 y 2, aparte de la cantidad formada, en ambos gráficos fue posible detectar la presencia de nanopartículas de cobre a una longitud de onda de 535 nm, la región en que según la bibliografía consultada^{50, 52, 53} absorbe la cianidina-3-O-glucósido es entre 510 y 530 nm^{21, 42}, así como mayor era la formación de nanopartículas entre mayor la temperatura y tiempo de reacción, esta tendencia se repite en todos los estudios consultados donde se usa la cianidina-3-O-glucósido como reductor de iones metálicos.



Gráfica 4 Análisis UV-VIS de las tres reacciones de extracto de ciruela roja con CuCl_2 (25°C, 45°C y 65°C a 3h), solución de CuCl_2 y solución de extracto sin CuCl_2 , línea base etanol.

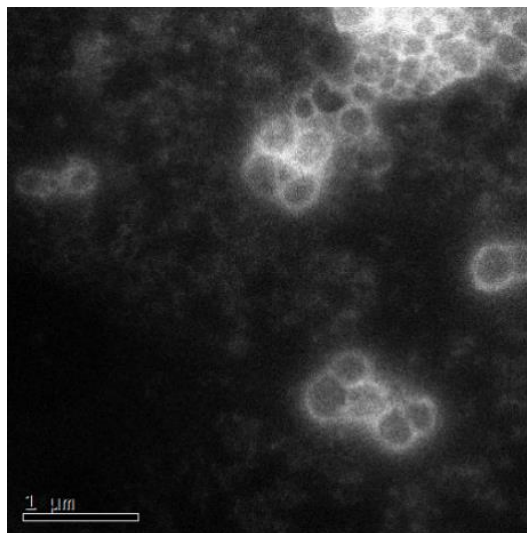


Gráfica 5 Análisis UV-VIS de las tres reacciones de extracto de ciruela roja con CuCl_2 (25°C, 45°C y 65°C a 30 min.), solución de CuCl_2 y solución de extracto sin CuCl_2 , línea base etanol.

9.6. Análisis de micrografías tomadas en microscopio electrónico de transmisión

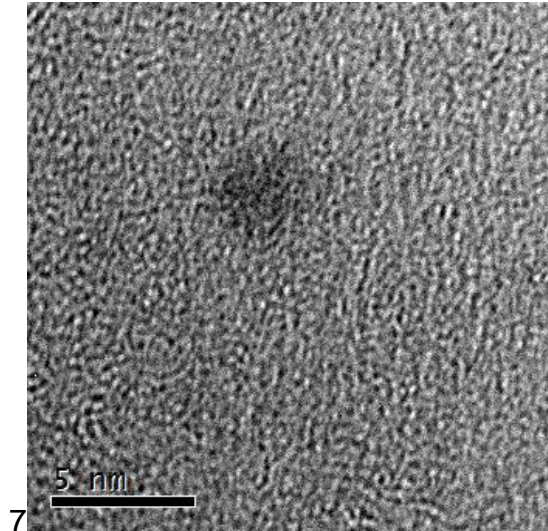
Temperatura ambiente 25°C (RT)

A 25°C hubo formación de partículas de aproximadamente 200 nm esféricas y en forma “de gota”, estas partículas no cumplen el criterio de nanopartículas pues exceden de 100 nanómetros.



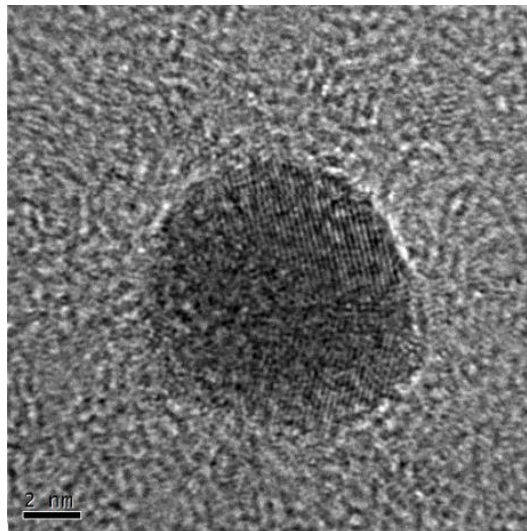
45°C

A 45°C se formaron CuNPs más pequeñas de 5 nm de diámetro esféricas, en muy poca cantidad.



65°C

A 65°C/3h se obtuvieron nanopartículas esféricas de 5-7 nm de diámetro más definidas.



9.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana

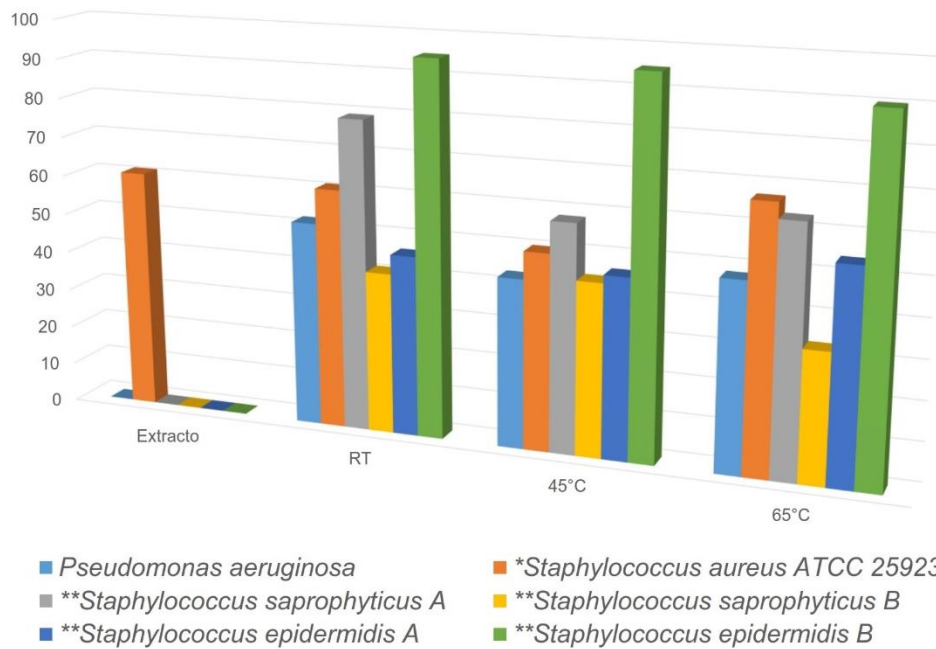
Los ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos se realizaron por triplicado con cada una de las cepas bacterianas, por lo que se obtuvieron datos promedio de resistencia/susceptibilidad de cada uno de los diferentes extractos ensayados.

Para el experimento se utilizó la cepa de *Staphylococcus aureus* como referencia, dado que no presenta factores de resistencia, el resto de las cepas fueron aisladas directamente del ambiente y presentan cierto grado de resistencia a los antibióticos utilizados como control positivo (Gráfica 6).

Tabla 4 Promedio de los halos de Inhibición de los diferentes extractos en milímetros (mm)/%IR * Cepa sensible a metilina ** Cepa bacteriana aislada del ambiente de diferentes zonas de la Ciudad de Puebla. R: Resistente.

CEPAS	Extracto seco	ECR Exp(1)RT/3h	ECR Exp(1)45°C/3h	ECR Exp(1) 65°C/3h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	11/52	9/43	10/48
* <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11/61	11/61	9/50	12/67
** <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	R	15/79	11/58	12/63
** <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	R	11/41	12/44	9/33
** <i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	11/46	11/46	13/54
** <i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	19/95	19/95	18/90

- El extracto de ciruela diluido en etanol no tuvo actividad ante ninguna de las cepas salvo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, esto porque dicha cepa de referencia no tiene factores de resistencia.
- Las CuNPs a temperatura ambiente tuvieron mejor inhibición relativa ante *Staphylococcus epidermidis* B, *Staphylococcus saprophyticus* A y *Pseudomonas aeruginosa*.
- La solución de CuNPs a 45°C tuvo una mayor inhibición contra la cepa B de *Staphylococcus epidermidis*.
- La solución de CuNPs a 65°C inhibió a las cepas A y B de *Staphylococcus epidermidis*, la cepa A de *Staphylococcus saprophyticus*, teniendo un efecto antimicrobiano moderado en *Pseudomonas aeruginosa*.



Gráfica 6 Porcentajes de inhibición relativa de los extractos evaluados.

El mecanismo de acción de las nanopartículas de cobre biosintetizadas con extracto de ciruela roja no es claro y supera los límites de este trabajo, sin embargo, se sospecha que puede tener un efecto a nivel de pared celular, inhibiendo enzimas y proteínas e impidiendo la respiración.

10. Conclusiones

1. En el presente trabajo se realizó la extracción del extracto de cáscara de *Prunus domestica* para llevar a cabo la biosíntesis de nanopartículas metálicas de cobre y su posterior caracterización por métodos espectrofotométricos y microscopía electrónica de transmisión.
2. Se realizó la purificación y acondicionamiento del extracto obtenido de ciruela roja, obteniendo un extracto seco rico en antocianinas.
3. Se cuantificó el contenido de antocianinas en el extracto de ciruela roja por medio del método de pH diferencial, obteniendo 39.92mg/100g de cáscara, comprobando que la parte antociánica fue obtenida exitosamente gracias al proceso de purificación.
4. Se midió la capacidad antioxidante de los extractos de ciruela roja con y sin nanopartículas de cobre encontrando que la capacidad antioxidante disminuye en las soluciones con nanopartículas debido a que el metal utiliza el mecanismo antioxidante de la molécula de antocianina.
5. Se encontró que el extracto rico en antocianinas de la cáscara de *Prunus domestica*, por medio de la cianidina en forma de glucósido con una molécula de glucosa formando la cianidina-3-O-glucósido es capaz de formar nanopartículas de cobre debido a su capacidad para reducir los iones Cu^{2+} a Cu^0 .
6. Se comprobó la influencia de tiempo y temperatura de reacción en la formación de nanopartículas, siendo 65°C durante 3 horas las mejores condiciones para la formación de nanopartículas de cobre.
7. Se comprobó que a pesar del tratamiento térmico al que fueron sometidas las antocianinas con y sin nanopartículas permanecieron estables en los análisis espectroscópicos, debido a su condición de agliconas que permite a las antocianinas resistir temperaturas de hasta 65°C.
8. Se halló formación de nanopartículas metálicas de cobre de 5nm a 7nm en muestras de diluciones a 45°C y 65°C, mientras que la solución tratada a 25°C presentó formación de partículas de 250nm, lo cual no cumple con el criterio para ser consideradas nanopartículas.
9. Se evaluó la capacidad antimicrobiana de los extractos con y sin nanopartículas contra cepas bacterianas obtenidas del ambiente, los extractos con nanopartículas reportaron una mayor capacidad antimicrobiana que el extracto de ciruela sin nanopartículas metálicas.

11. Perspectivas del trabajo

- Las condiciones de referencia para utilizar las nanopartículas de extracto de ciruela roja podrán ser 65°C a 3 horas de reacción.
- La mezcla de reacción deberá aumentar la proporción de cobre respecto a antocianinas presentes.
- En próximas investigaciones, la prueba de capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de cobre a 65°C por 3 horas deberá ser sobre cepas clínicas, que son las que poseen mayores factores de resistencia a antibióticos.
- Estudios posteriores tendrán una referencia para el uso de cianidina-3-O-glucósido en la biosíntesis de nanopartículas con otros metales como oro, plata o platino.
- Otras aplicaciones podrán ser investigadas, como actividad fotocatalítica, actividad en la quimioterapia contra cáncer y remediación de suelos.

12. Bibliografía

1. McKenzie, L.C., Hutchison, J. E., *Green nanoscience: An integrated approach to greener products, processes, and applications*, in *chimica oggi-Chemistry Today*. 2004. p. 25-28.
2. Akhtar, M.S., J. Panwar, and Y.-S. Yun, *Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2013. **1**(6): p. 591-602.
3. Blanca, G. and C. Díaz de la Guardia, *AMYGDALOIDEAE*, in *Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e islas Baleares*, E. CSIC, Editor. 2001. p. 447-448.
4. CONSUMER, E. *Propiedades de la ciruela*. Available from: <http://frutas.consumer.es/ciruela/>.
5. Bhagwat, S., Haytowitz D. B., Holden J. M. (ret.), *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Food*, U.S.D.o. Agriculture, Editor. 2013: Agricultural Research Service, Beltsville Human Nutrition Research Center, Nutrient Data Laboratory.
6. Lila, M.A., *Anthocyanins and human health: An In Vitro Investigative Approach*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004(5): p. 306–313.
7. Douglas A. Balentine, et al., *Recommendations on reporting requirements for flavonoids in research*. American Journal of Clinical Nutrition, 2015. **101**(6): p. 1113-1125.
8. Lago, J., et al., *Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Diseases*. Molecules, 2014. **19**(3): p. 3570.
9. Márquez, G.C., *Capacidad antioxidante y caracterización estructural de las antocianinas de los frutos rojos de Prunus domestica L., Ficus carica L. y Vitis vinifera L. c.v. "red globe" cultivados en Perú*, in *Facultad de Farmacia y Bioquímica*. 2011, Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Lima, Perú.
10. Mendoza, E. and C. Calvo, *Bromatología. Composición y propiedades de los alimentos*. 1st ed. Vol. 1. 2010, Mexico: McGraw-Hill interamericana editores, S.A. de C.V. 318.
11. Gould, K., D. Kevin, and W. Winefield, *Anthocyanins. Biosynthesis, Functions, and Applications*. 2009: Springer Science+Business Media, LLC. 345.
12. Clifford, M.N., *Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. **80**(7): p. 1063-1072.
13. Aguilera, M., Reza, M. C., Chew R. G., Meza, J. A., *Propiedades funcionales de las antocianinas*. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, 2011. **XIII**(2): p. 16-22.
14. Brouillard, R. and J. Lang, *The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin*. Canad. J. Chem., 1990(68): p. 755-761.
15. Furtado, P., et al., *Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins*. J. Photochem. Photobiol., 1993. **75**: p. 113-118.
16. Schwartz, J.J., *Chromatography*. 2015, Salem Press.
17. Catherine A. Rice-Evans and L. Packer, *Flavonoids in Health and Disease*, Catherine A. Rice-Evans and L. Packer, Editors. 2003, Marcel Dekker, Inc.
18. Xiao, Z.-P., et al., *Flavonoids Health Benefits and Their Molecular Mechanism*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2011. **11**: p. 169-177.
19. McGhie, T.K., et al., *Anthocyanin Glycosides from Berry Fruit Are Absorbed and Excreted Unmetabolized by Both Humans and Rats*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003(51): p. 4539-4548.
20. Kuskoski, E.M., et al., *Actividad antioxidante de pigmentos antocianínicos*. Food Science and Technology (Campinas), 2004. **24**: p. 691-693.
21. Kahkonen, M.P. and M. Heinonen, *Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(3): p. 628-33.
22. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine. Second edition*. 2nd ed. 1989, Oxford, UK.: Clarendon Press.

23. Avello, M. and M. Suwalsky, *Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*. Atenea, 2006. **494**(II Sem. 2006): p. 161-172.
24. Sies, H., *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Experimental Physiology, 1997(82): p. 291-295.
25. Sánchez-Moreno, C., J.A. Larrauri, and F. Saura-Calixto, *A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols*. J Sci Food Agric, 1998. **76**: p. 270-276.
26. Fallon, L.F.J.P., *Microscopy*, in *Magill's Medical Guide*. 2013, Salem Press.
27. Wolfe, S.L., *Transmission electron microscopy*, in *Salem Press Encyclopedia of Science*. 2015, Salem Press.
28. LaGoo, L.B.S.M.S., *Spectroscopy*, in *Salem Press Encyclopedia of Science*. 2015, Salem Press.
29. Wade, L.G., *Química orgánica. Volumen 1*. 2011, México: PEARSON EDUCACIÓN.
30. Wade, L.G., *Química orgánica. Volumen 2*. Vol. 2. 2011, México: PEARSON EDUCACIÓN.
31. Mira, L., et al., *Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity*. Free Radical Research, 2009. **36**(11): p. 1199-1208.
32. Dobson, P., H. Jarvie, and S. King, *Nanoparticle*, in *Encyclopædia Britannica*. 2014.
33. Nath, D. and P. Banerjee, *Green nanotechnology - a new hope for medical biology*. Environ Toxicol Pharmacol, 2013. **36**(3): p. 997-1014.
34. Shende, S., et al., *Green synthesis of copper nanoparticles by Citrus medica Linn. (Idlimbu) juice and its antimicrobial activity*. World J Microbiol Biotechnol, 2015. **31**(6): p. 865-73.
35. Tiwari, M., et al., *Biosynthesis and wound healing activity of copper nanoparticles*. IET Nanobiotechnol, 2014. **8**(4): p. 230-7.
36. Armendariz, V., et al., *Size controlled gold nanoparticle formation by Avena sativa biomass: use of plants in nanobiotechnology*. Journal of Nanoparticle Research, 2004(6): p. 377-382.
37. Song, J.Y., H.-K. Jang, and B.S. Kim, *Biological synthesis of gold nanoparticles using Magnolia kobus and Diopyros kaki leaf extracts*. Process Biochemistry, 2009. **44**(10): p. 1133-1138.
38. López, J.M. and T.U. Berrueta. *Generalidades de bacterias*. 2015; Available from: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>.
39. Otto, M., *Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(8): p. 555-67.
40. Murray, P.R., K.S. Rosenthal, and M.A. Pfaller, *Microbiología Médica*. 7a ed. 2013: ELSEVIER. 890.
41. Díaz-Mula, H.M., et al., *Changes in hydrophilic and lipophilic antioxidant activity and related bioactive compounds during postharvest storage of yellow and purple plum cultivars*. Postharvest Biology and Technology, 2009. **51**(3): p. 354-363.
42. Giusti, M.M. and R.E. Wrolstad, *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy*, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001, John Wiley & Sons, Inc.
43. Tokusog˘lu, Ö. and C.H. III, *Fruit and Cereal Bioactives Sources, Chemistry, and Applications*. Vol. 1. 2011: CRC Press.
44. Castañeda, C.B., L.E. Ramos, and V.L. Ibáñez, *Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas*. Revista Horizonte Médico, 2008. **8**(1): p. 56-72.
45. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset, *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*. LWT - Food Science and Technology, 1995. **28**: p. 25-30.
46. Kim, D.-O.L., K.W.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. , *Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002(50): p. 3713-3717.
47. Ock Kyong, C., Dae-Ok K., Hae Yeon M., Hee Gon, K., Chang Yong, L., *Contribution of Individual Polyphenolics to Total Antioxidant Capacity of Plums*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(25): p. 7240-7245.

48. Institute, C.L.S., *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard. Document M100-S18. NCCLS, Wayne, PA. 2011.*
49. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem*, 2005. **53**(6): p. 1841-1856.
50. Dauthal, P. and M. Mukhopadhyay, *Prunus domestica Fruit Extract-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles and Its Catalytic Activity for 4-Nitrophenol Reduction. Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2012. **51**(40): p. 13014-13020.
51. Astrid, G., *Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Acta Biol. Colombia*, 2008. **13**(3).
52. Kayano, S., Yamada, N.F., Suzuki, T., Ikami, T., Shioaki, K., Kikuzaki, H., Mitani, T., Nakatani, N., *Quantitative Evaluation of Antioxidant Components in Prunes (Prunus domestica L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. **51**(5): p. 1480-1485.
53. Usenik Valentina, Štampar Franci, and V. Robert, *Anthocyanins and fruit colour in plums (Prunus domestica L.) during ripening. Food Chem.*, 2009. **114**(2): p. 529–534.