

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



ANÁLISIS FITOQUÍMICO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Ruellia inundata* Kunth
Y SU APLICACIÓN EN LA SÍNTESIS FOTOINDUCIDA DE NANOPARTÍCULAS DE
PLATA (AgNPS)

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR
FRANCISCO ALESSANDRO PERLA RODRÍGUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE 2024

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN GENERAL DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD-HONOREM)

MAESTRA KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES

DOCTOR WILLBER DAVID CASTRO GODOY

DOCTOR MARVIN JOSÉ NUÑEZ RIVAS

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORES DE AREA EN APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

MAESTRA ANA MIRIAM SANTAMARÍA DE CAMPOS

DOCTOR DAVID FRANCISCO TORRES ROMERO

INVESTIGADOR ASOCIADO

LICENCIADO ULISES OSWALDO GUARDADO CASTILLO

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y el universo, por darme la capacidad y entendimiento para concluir una etapa que he anhelado por años. Le agradezco a Camila, Anita, Levi, Diana, Dama, Tefa y Gerson porque “No hay amor más grande que él que da la vida por sus amigos”, no habría sido posible todo esto sin el apoyo de quienes yo considero amigos, que, contados con las manos, los tengo muy presente.

También a mi sangre y familia, en especial a Alcira Cabrera y Ana Lilian Rodríguez, que me han cuidado, apoyado y visto crecer, que, sin ellas, la mayoría de mis logros no se hubieran cumplido, las amo mucho. Agradezco a Alejandra Ruiz, Sonia Valladares, Paola Córdova y Kevin Álvarez que los considero mi familia “adoptiva” ayudándome a salir delante de una u otra forma, los quiero.

Mi gratitud esta con aquellos que pusieron su fe y apoyo en mi persona, al igual que aquellos que no, porque me alentaban a demostrar mi capacidad, ver mis límites y lograr superarlos con éxito. A mis asesores de tesis, Ulises Guardado, Marvin J. Núñez y Willber Castro, sin ellos no habría aprendido tanto en estos meses de la pasantía de investigación, les agradezco grandemente, espero poder retribuirles todo lo que aprendí, al igual que Zaldaña, quien con poco tiempo de conocerle me demostró y enseñó mucho de la vida, gracias viejito; al igual que Lic. Ana Miriam y Lic. Morena que siempre me brindaron su apoyo en todo momento, las recordare siempre.

A José Raúl Rodríguez, siempre creyó que sería un gran químico farmacéutico y un excelente profesional, aquí está “el catracho” terminando una etapa importante, se le extraña.

De forma muy especial agradezco a mis padres, Fredy Perla, un gran apoyo a lo largo de los años, siempre pendiente de mi bienestar, espero poder verlo pronto, le amo mucho papi y a María Elena Rodríguez “Nena”, mi razón de ser, por quien día a día sigo vivo, luchando, demostrando que todo el esfuerzo, sangre y sudor que dio por nosotros, ha rendido fruto; si mil vidas vivo, mil vidas te quiero como mamá, porque, ante todo, deseo ser tu orgullo, te amo, mami.

Francisco Perla

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a Dios, para que hoy y siempre me haga aceptar las cosas que no puedo cambiar. tener el coraje de cambiar las cosas que pueda, y poseer la sabiduría para conocer la diferencia.

Dedicó este trabajo a todos mis compañeros, colegas, amigos que cursan química y farmacia, y tienen a alguien que los cuida desde el cielo, que el final se ve lejos, pero mientras no olvidemos por quienes lo hacemos, siempre tendrán un motivo para seguir adelante.

Sobre todo, a mi madre, María Elena Rodríguez, que sin ella no habría tenido motor ni estímulo para seguir, la mujer que dio literalmente la vida por mí, y por la que aun sigo vivo luchando con la frente en alto y afrontando todo lo que venga, siempre mi sol, guía y felicidad.

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

CAPÍTULO I

1.INTRODUCCIÓN 17

CAPÍTULO II

2.OBJETIVOS 21

CAPÍTULO III

3.0.MARCO TEÓRICO 23

3.1. Familia Acanthaceae 23

3.2. Generalidades del género *Ruellia* 23

3.3. Análisis fitoquímico 24

3.3.1. Metabolitos secundarios 24

3.3.2. Métodos de extracción 26

3.3.3. Método cromatográfico de separación de metabolitos secundarios 28

3.3.4. Cromatografía de capa fina 29

3.3.5. Análisis fitoquímico preliminar 30

3.4. Actividad antioxidante (12-13) 34

3.4.1. Estrés oxidativo 34

3.4.2. Radicales libres 35

3.4.3. Antioxidantes 35

3.4.4. Ensayo de capacidad de captación de radicales libres de DPPH 36

3.5. Síntesis de nanopartículas de plata (16) 37

3.5.1. Nanotecnología 37

3.5.2. Síntesis de nanomateriales 38

3.5.3. Síntesis verde (17) 39

3.5.4. Nanopartículas de plata: características, propiedades y aplicaciones 40

3.5.5. Técnicas de caracterización de NPs 42

3.5.6. Espectrofotometría de absorción de luz Ultravioleta-Visible	43
--	----

CAPÍTULO IV

4.0.DISEÑO METODOLÓGICO **45**

4.1. Tipo de estudio	45
4.2. Investigación bibliográfica	45
4.1.Investigación de campo	45
4.4. Parte experimental	46
4.4.1. Pretratamiento de la muestra	46
4.4.2. Análisis fitoquímico	47
4.4.2.1. Obtención del extracto acuoso de <i>R. inundata</i>	47
4.4.2.2. Preparación de material para Cromatografía de Capa Fina	47
4.4.2.3. Identificación de glicósidos saponínicos	48
4.4.2.4. Identificación de grupo de metabolitos por CCF	48
4.4.3. Determinación de la actividad antioxidante de <i>R. inundata</i>	49
4.4.3.1. Obtención del extracto acuoso de <i>R. inundata</i>	49
4.4.3.2. Preparación de la curva de calibración	49
4.4.3.3. Preparación de la muestra	49
4.4.3.4. Preparación del reactivo DPPH	50
4.4.3.5. Preparación de las celdas para la determinación de la actividad antioxidante	50
4.4.3.6. Medición de absorbancias de las muestras y estándares en espectrofotómetro UV-Vis	50
4.4.4. Síntesis de AgNPs empleando el extracto acuoso de las partes aéreas de <i>R. inundata</i>	51
4.4.4.1. Obtención del extracto acuoso de <i>Ruellia inundata</i>	51
4.4.4.2. Síntesis de nanopartículas	51
4.4.4.3. Preparación de las muestras para mediciones en el espectrofotómetro UV-Vis	51
4.4.4.4. Medición de absorbancias de las muestras en el espectrofotómetro UV-Vis	51

CAPÍTULO V

5.0.RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS **54**

5.1. Recolección e identificación botánica de <i>R. inundata</i>	54
5.2. Resultados e interpretación de resultados del tamizaje químico preliminar	54
5.3. Cuantificación de la actividad antioxidante por espectrofotometría UV-Vis...	56

5.4.Síntesis de nanopartículas de plata	57
5.4.1.Escalado de la reacción de biosíntesis de AgNPs y empleo de la luz solar	65
5.5.Caracterización de nanopartículas de plata	66
CAPÍTULO VI	
6.0. CONCLUSIONES	69
CAPÍTULO VII	
7.0. RECOMENDACIONES	72
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág.
1.	Partes aéreas de <i>Ruellia inundata</i> .	24
2.	Técnica de cromatografía en capa fina.	29
3.	Cromatografía de capa fina.	30
4.	2,2,-difeníl-1-picrilhidracilo (radical libre) y ,2,-difeníl-1-picrilhidracilo (no radical).	37
5.	Técnicas de síntesis de nanopartículas.	39
6.	Clasificación de diferentes morfologías típicas de las AgNPs y AuNPs y su localización el espectro UV-Vis según la absorción provocada por la SPR.	40
7.	Imagen ilustrativa de diversas formas de AgNPs.	41
8.	Síntesis biológica de nanopartículas y sus aplicaciones.	42
9.	Cuantificación de la actividad antioxidante utilizando el método de DPPH con espectrofotometría UV-Vis al extracto acuoso de <i>Ruellia inundata</i>	57
10.	Condiciones iniciales de la síntesis de AgNPs	57
11.	Fotografía del sistema de reacción. (A) Solución de AgNO ₃ , (B) mezcla de reacción antes de irradiar y (C) mezcla de reacción después de la irradiación	58
12.	Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs estudiando el tipo de extracción acuosa de <i>Ruellia inundata</i> óptimo para la reacción	59

13.	Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs. Optimización del tipo de extracción acuosa de <i>Ruellia inundata</i> para la reacción	60
14.	Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPS optimización de la fuente de irradiación	60
15.	Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs optimizando el volumen necesario del extracto acuoso de las partes aéreas de <i>Ruellia inundata</i> para la reacción	61
16.	Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs utilizando diferentes tipos de estabilizantes	62
17.	Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs a diferentes tiempos de irradiación	63
18.	Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs en ausencia de estabilizante y de la atmósfera inerte	64
19.	Condiciones optimizadas para la biosíntesis de AgNPs	65
20.	(a) Espectro UV-Vis de la síntesis optimizada de AgNPs empleando <i>R. inundata</i> irradiando con luz solar. (b) Sistema de síntesis de AgNPs escalado	66
21.	Espectro UV-Vis de la síntesis optimizada de nanopartículas de plata empleando <i>R. inundata</i>	67
22.	Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación de actividad antioxidante y el IC ₅₀ del ácido ascórbico	88

ÍNDICE DE TABLAS

Figura N°		Pág.
1.	Grupos de algunos metabolitos secundarios.	25
2.	Tipos de extracción utilizando disolventes	27
3.	Metabolitos secundarios, núcleo, breve descripción y propiedades	31
4.	Mecanismos de acción de flavonoides, taninos, cumarinas y terpenoides.	33
5.	Condiciones para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios por CCF.	48
6.	Análisis fitoquímico preliminar de <i>Ruellia inundata</i> Kunth.	54
7.	Curva de calibración de ácido ascórbico en el ensayo antioxidante	83
8.	Diluciones del extracto acuoso de <i>R. inundata</i> 1:10 g/mL (Solución madre).	83
9.	Estudio de fuente de irradiación	83
10.	Datos experimentales de la curva de calibración utilizando ácido ascórbico	87
11.	Porcentaje de rendimiento del extracto seco de <i>Ruellia inundata</i>	88
12.	Datos experimentales de la cuantificación de la actividad antioxidante realizado a <i>Ruellia inundata</i>	89

ÍNDICE ANEXOS

Figura N°

1. Tablas de actividad antioxidante y síntesis de nanopartículas de plata
2. Datos experimentales

ABREVIATURAS

DPPH	2,2,-difenil-1-picrilhidracilo
AceOEt	Acetato de etilo
Ace	Acetona
Ac. Acé.	Ácido acético
H₂O	Agua
Low	Bajo peso molecular
CCF	Cromatografía de capa fina
c.s.p.	Cantidad suficiente para...
DL₅₀	Dosis letal media
TNF-α	Factor de necrosis tumoral Alfa
TNF-κ	Factor de necrosis tumoral Kappa
NF-κB	Factor nuclear kappa B
PVDF	Fluopolímero termoplástico semicristalino opaco
n-Hex	Hexano
IL-12	Interleucina 12
LIPN	Laboratorio de Investigación en Productos naturales
MeOH	Metanol
Med	Mediano peso molecular
MBC	Mini Ball Clear
NPs	Nanopartículas
AgNPS	Nanopartículas de plata
AgNO₃	Nitrato de plata
N/D	No disponible
PVP	Polímero sintético de monómeros de vinilpirrolidona
SPR	Resonancia del plasmón superficial
UV-Vis	Ultravioleta – visible

SIMBOLOGÍA

cm	Centímetros
°C	Grados Celsius
g	Gramos
h	Horas
lb	Libras
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
μM	Micromolar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
nm	Nanómetros

RESUMEN

En El Salvador existen numerosas plantas con prometedoras aplicaciones químicas, biológicas y farmacéuticas, en este sentido, esta investigación se enfocó en la recolección, identificación botánica, análisis fitoquímico, evaluación de la actividad antioxidante y la síntesis de nanopartículas de plata de la especie vegetal *Ruellia inundata* Kunth, siendo este el primer abordaje científico de esta planta. Se recolectaron 0.7 Kg de partes aéreas de esta planta y su identificación fue confirmada por el Museo de Historia Natural de El Salvador. El análisis fitoquímico se realizó por medio de pruebas cualitativas en Cromatografía de Capa Fina y reveló la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, terpenoides, cumarinas y taninos, utilizando reveladores específicos.

Para evaluar la actividad antioxidante, se empleó el método del radical libre DPPH, donde los extractos acuosos de las partes aéreas de la planta mostraron una capacidad significativa para neutralizar los radicales libres. La capacidad antioxidante se cuantificó mediante espectrofotometría UV-Vis, expresada en μg equivalentes de ácido ascórbico/mL. Obteniéndose un valor de $\text{IC}_{50} = 596.64 \pm 15.80 \mu\text{g/mL}$. El resultado obtenido supero $\text{IC}_{50} > 450.0 \mu\text{g/mL}$ que la especie vegetal no presenta actividad antioxidante sobresaliente a las concentraciones analizadas.

La síntesis de nanopartículas de plata se llevó a cabo utilizando el extracto acuoso como agente reductor y fotocatalizador bajo luz artificial. La formación de las AgNPs fue confirmada por espectroscopía UV-Vis, presentando el pico característico entre 400 a 450 nm. Logrando desarrollar una metodología que no hace uso de una atmosfera inerte para llevar a cabo el proceso de reducción de los iones plata lo cual es beneficioso ya que el sistema de reacción funcionó en condiciones aeróbicas.

Los resultados del estudio proporcionan un primer acercamiento a las utilidades y aprovechamientos que se le pueden dar a las partes aéreas de *Ruellia inundata*, esto gracias a los metabolitos secundarios mayoritarios identificados y la capacidad de sintetizar nanopartículas de plata. Este trabajo representa un paso significativo en la valorización de la biodiversidad local y su potencial aplicación en nanotecnología. Siendo a su vez amigable con el medio ambiente.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

El Salvador, el país más pequeño de Centroamérica, posee una flora con biodiversidad notable, a pesar de su tamaño. Esta es diversa, con una amplia variedad de especies que se distribuyen a lo largo de sus diferentes ecosistemas. En este contexto, la familia Acanthaceae incluye más de 4000 especies en todo el mundo, es conocida por su diversidad morfológica y su adaptación a variados hábitats.

Las especies de la familia Acanthaceae tienen importancia ecológica, medicinal y económica. Estas plantas han sido utilizadas tradicionalmente en la medicina popular por sus propiedades curativas tales como antimicrobiano, antiinflamatorio, antiviral, antioxidante, antipirético, expectorante, diurético, entre otros. La investigación científica moderna ha comenzado a explorar y validar muchos de estos usos tradicionales a través de análisis fitoquímicos. Este análisis se refiere al estudio de los metabolitos secundarios mayoritarios que contienen las plantas, y pueden tener efectos biológicos beneficiosos para el ser humano.

El género *Ruellia* es un grupo de interés fitoquímico que forma parte de las Acanthaceae, comprende alrededor de 150 especies con diferentes metabolitos secundarios como lignanos, flavonoides, alcaloides, cumarinas, terpenoides, esteroides, glicósidos fenólicos, entre otros; estos grupos de compuestos otorgan a que las plantas tengan diferentes actividades: antioxidante, citotóxica, antibacteriano, purgativo, etc.

Dentro de la investigación de las diferentes actividades biológicas que ejercen la presencia de metabolitos secundarios en las plantas; una de las áreas de mayor interés es el estudio de la actividad antioxidante de las plantas. Los antioxidantes son compuestos que pueden prevenir o retrasar el daño celular causado por los radicales libres, que son moléculas inestables que pueden causar daño celular y contribuir al desarrollo de diversas enfermedades. La actividad antioxidante de las plantas de la familia Acanthaceae ha sido objeto de numerosos estudios, que han demostrado que muchas de estas plantas poseen potentes propiedades antioxidantes.

Además, en los últimos años, la investigación en el campo de las nanopartículas ha avanzado significativamente, ofreciendo nuevas posibilidades para el uso de compuestos de plantas. En este

contexto, por primera vez se ha estudiado el extracto acuoso de *Ruellia inundata* Kunth como un agente reductor amigable con el medio ambiente en la biosíntesis de nanopartículas de plata. Las nanopartículas son partículas de tamaño nanométrico que tienen propiedades físicas y químicas únicas debido a su pequeño tamaño y gran superficie específica, debido a ello, presentan propiedades físicas y químicas únicas como su potencial bactericida y antiséptico, lo que les permite tener aplicaciones en diversos campos, incluyendo la medicina, agricultura, farmacia y cosmética.

Ruellia inundata, especie vegetal en estudio carece de información científica, por lo cual esta investigación se centra en darle el carácter científico a través de la recolección, identificación botánica, análisis fitoquímico de la planta, determinación de la actividad antioxidante, seguida de la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata utilizando el extracto acuoso de sus partes aéreas, con el objetivo de otorgar a las nanopartículas así obtenidas posibles aplicaciones en diferentes áreas como la medicina, agricultura, biotecnología, etc.

La recolección se llevó a cabo en Cinquera, Departamento de Cabañas oeste, Posteriormente, se procedió a la identificación botánica en colaboración con curadores del Museo de Historia Natural de El Salvador, asignándole un número de voucher para su identificación en investigaciones futuras.

El análisis fitoquímico incluyó la extracción de compuestos bioactivos mediante el método de la decocción, realizando al extracto las pruebas cualitativas aplicando reveladores específicos en cromatografía de capa fina. Identificándose la presencia de flavonoides, taninos, terpenoides y cumarinas.

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Se prepararon extractos acuosos de las partes aéreas de la planta y se cuantifico su capacidad para neutralizar los radicales libres. Los resultados se determinaron aplicando regresión lineal a la ecuación de la curva, expresándolo en la concentración inhibidora media máxima con las unidades de μg equivalentes de ácido ascórbico/mL. Obteniéndose una baja actividad antioxidante.

Para la síntesis de nanopartículas de plata se optimizaron procesos reportados en diferentes bibliografías, utilizando el extracto acuoso de las partes aéreas de *Ruellia inundata* Kunth como agente reductor siendo fotocatalizadas por luz artificial. La formación de las nanopartículas se confirmó mediante espectroscopía UV-Vis. Logrando optimizar las condiciones iniciales planteadas con la experiencia previa de los asesores y literatura reportada, empleando con éxito el extracto acuoso de la especie vegetal.

La presente investigación se realizó en el periodo de febrero a agosto del año 2024, con la finalidad de llevar a cabo el primer estudio respecto a *Ruellia inundata* Kunth.

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS

Objetivo General:

Realizar el análisis fitoquímico, actividad antioxidante de *Ruellia inundata* y su aplicación en la síntesis fotoinducida de nanopartículas de plata (AgNPs).

Objetivos específicos:

- Llevar a cabo la recolección e identificación botánica de *Ruellia inundata*.
- Definir por medio de pruebas fitoquímicas cualitativas, los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto acuoso de las partes aéreas de *Ruellia inundata*.
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto acuoso de las partes aéreas de *Ruellia inundata* por medio de la prueba DPPH.
- Sintetizar nanopartículas de plata a partir del extracto acuoso de las partes aéreas de *Ruellia inundata*.
- Caracterizar las nanopartículas de plata obtenidas empleando espectroscopía UV-Vis.

CAPÍTULO III

3.0. MARCO TEÓRICO

3.1. Familia Acanthaceae

El Salvador, territorio de aproximadamente 21,000 km² de clima tropical con zonas que abarca zonas húmedas hasta áreas áridas a pesar de su reducida extensión, en consecuencia, otorga una amplia gama de diversas especies naturales esenciales para el bienestar y desarrollo humano influyendo de forma directa en la calidad del agua, regulación climática, salud de los suelos, y la aplicación etnobotánica de las especies vegetales. (1)

Diversas familias de especies vegetales se encuentran en el territorio salvadoreño, de las cuales no todas han sido estudiadas en su totalidad, tal es el caso de la familia de las Acantáceas, una familia importancia económica ejerciendo un rol importante a nivel ecológico proveyendo polen y néctar a polinizadores, abejas, colibríes, murciélagos, entre otros (2). Siendo de importancia etnomédica en el uso como antimicrobiano, antiinflamatorio, antiviral, antioxidante, antipirético, expectorante, diurético, entre otros (3).

Entre las especies de la familia Acanthaceae juegan un papel clave para el tratamiento de múltiples enfermedades por los múltiples grupos de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, fenoles, terpenoides, taninos, para uso terapéutico (3). Hasta la fecha, diversas especies vegetales de la familia Acanthaceae se encuentran inexploradas o poco estudiadas a pesar de sus múltiples aplicaciones.

3.2. Generalidades del género *Ruellia*

El género *Ruellia* perteneciente a la familia Acanthaceae comprende alrededor de 150 especies; Son hierbas o arbustos perennes erectos de 1 m de altura con tallos jóvenes pubescentes con glándulas dispersas en dos bandas bajo los nudos; cistolitos conspicuos. (4), siendo algunas utilizadas para el tratamiento de la gonorrea, sífilis, úlceras oculares e infecciones renales (5).

Según se reporta en el género *Ruellia* los constituyentes químicos incluyen lignanos, flavonoides, alcaloides, cumarinas, triterpenos, esteroides, glicósidos fenólicos, entre otros (5). Entre las

aplicaciones del género *Ruellia* se encuentra la actividad cicatrizante, actividad cardiovascular, anti hiperglucémico, anti nociceptivo, antiinflamatorio, actividad antioxidante, citotóxico, antibacteriano, purgativo, anti-leishmaniasis, entre otros (5).



Figura N°1. Partes aéreas de *Ruellia inundata*. Fuente: Elaboración propia.

En vista que las bibliografías describen al género *Ruellia* con diversas propiedades de interés, se espera que la planta en estudio: *R. inundata* manifieste dichas actividades. No obstante, actualmente de la especie *R. inundata* no hay bibliografía que describa su composición fitoquímica o que corrobore las aplicaciones de su género, usos etnobotánicos.

En condiciones en las que la bibliografía es escasa y se requiere establecer un punto inicial, para esto, se llevan a cabo diversos análisis para determinar la composición de la planta o sus posibles aplicaciones.

3.3. Análisis fitoquímico

3.3.1. Metabolitos secundarios

Las plantas al igual que los seres humanos poseen una serie de reacciones químicas en el cuerpo involucradas en el desarrollo, crecimiento y reproducción, conjunto de reacciones que constituyen al metabolismo primario (6), no obstante, las plantas presentan una serie de compuestos llamados

metabolitos secundarios, los cuales no influyen directamente en procesos de fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, entre otros, sino, en la adaptación al estrés ambiental, defensa ante patógenos y competencia por alimentación, etc. (7).

Los metabolitos secundarios son un conjunto de compuestos químicos que se sintetizan en cantidades mínimas en la planta y no de forma general, algunos metabolitos secundarios están restringidos a ciertos tipos de familia, genero, llegando incluso a ser exclusivos de algunas especies (7); estos tienen diversas funciones en la planta: atrayente de polinizadores con químicos volátiles, pigmento en flores y frutos, defensa contra depredadores repeliéndolos al amargar la planta, hacerla venenosa o difícil de digerir (7). Los metabolitos secundarios se agrupan de la siguiente forma en la tabla N° 1 (8):

Tabla N°1. Grupos de algunos metabolitos secundarios.

Fuente: elaboración propia.

Grupo	Metabolito
Terpenos	Hemiterpeno
	Monoterpeno
	Sesquiterpenos
	Diterpenos
	Triterpenos
	Carotenoides
	Esteroides
Compuestos fenólicos	Cumarinas
	Flavonoides
	Taninos
Glicósidos	Cardiotónicos
	Saponinas
	Antraquinonas
Alcaloides	Derivados de la ornitina
	Derivados de la fenilalanina y tirosina
	Derivados del triptófano
	Bases xánticas

Cada metabolito secundario posee su propia naturaleza tanto en grupos funcionales, esqueleto base como en polaridades, esto último siendo de utilidad en la separación de metabolito a metabolito en una extracción.

3.3.2. Métodos de extracción

La extracción es el método por el cual se extraen los metabolitos secundarios de una planta, ya sea fresca o seca y molida, existiendo diferentes maneras y procesos para realizarlo (9):

Mecánicos: técnica en la cual se obtiene un “jugo”, fluidos de la planta en la que se encuentran dispersos los metabolitos. Esta puede realizarse:

- Por expresión: aplicación de presión sobre la droga.
- Calor.
- Mediante cortaduras por las que fluyen los fluidos de la planta

Destilación: técnica aplicable a metabolitos secundarios termoestables. Basado en las diferentes volatilidades de los compuestos de la droga vegetal, permitiendo una separación de componentes más volátiles de los menos o nada volátiles.

Extracción con gases en condiciones supercríticas: se trabaja con dispositivos que controlan las condiciones ambientales de la extracción como temperatura y presión, pero a niveles críticos. Utilizando con regularidad gases como el dióxido de carbono y butano. Presenta una extracción muy selectiva y no contamina la muestra por su facilidad para eliminar el gas extractor, no obstante, resulta bastante cara y encontrar las condiciones óptimas de extracción es complicado.

Extracción con disolventes: se pone en contacto el material vegetal con un solvente con la capacidad de solubilizar los metabolitos secundarios, pasando de la planta al disolvente, obteniendo un extracto líquido. Para una extracción óptima se toman en cuenta factores como las características de la droga vegetal, naturaleza del disolvente, temperatura, tiempo de contacto droga-solvente y control de la difusión celular.

Este método es el más utilizado por su facilidad para aplicar en diferentes matrices, sean sólidas o líquidas, no requiere equipo complejo en la mayoría de los casos, se pueden disolver una amplia gama de compuestos y la elección correcta de disolvente minimiza la extracción de impurezas, volviéndolo un método más eficiente, por ello es el método predilecto para utilizar durante la estancia de investigación.

Los tipos de extracciones pueden agruparse en dos conjuntos principales, como se muestra en la tabla N° 2:

Tabla N° 2: Tipos de extracciones utilizando disolventes (9). Fuente: Elaboración propia.

Extracción	Procedimientos
<p>Discontinua: la droga se introduce en su totalidad en el disolvente extractor, permitiendo una difusión en todas direcciones por parte de la droga.</p>	<p>Maceración: se coloca el material vegetal seco y molido a temperatura ambiente, dejando en reposo de 4 a 15 días. Se utiliza para metabolitos secundarios termolábiles.</p>
	<p>Infusión: se trabaja con agua. Primero se humedece la muestra vegetal con agua fría, y a continuación se agrega agua próxima a ebullición, dejando en reposo por unos minutos.</p>
	<p>Decocción: El material vegetal se pone en contacto con agua, en conjunto se lleva a temperatura de ebullición, manteniéndola durante 10 a 20 minutos, una vez enfriado, se filtra. La extracción es eficiente y rápida, con el cuidado de no utilizar con especies que posean compuestos termolábiles.</p>
	<p>Digestión: Como la maceración, pero con altas temperaturas.</p>
	<p>Reflujo: la sustancia se coloca en un balón y se trabaja a temperaturas de ebullición.</p>

Tabla N° 2: Tipos de extracciones utilizando disolventes (9). Fuente: Elaboración propia.
(Continuación)

<p>Continua: el disolvente se va renovando y es unidireccional. La droga se pone en contacto con el solvente adecuado, manteniendo en todo momento el desequilibrio entre la concentración de metabolitos de la droga y el disolvente, para que se produzca la difusión celular.</p>	<p>Percolación: Proceso a temperatura ambiente. El material vegetal se coloca en una columna, en la cual está en contacto permanente con el disolvente que gotea por la parte superior, atravesando el material vegetal, extrayendo los metabolitos, mientras en la parte inferior se recogen el extracto. Los rendimientos son buenos, no obstante, se utiliza demasiado solvente.</p>
	<p>Soxhlet: sistema sólido-líquido, en esta el solvente se recicla por un sistema de llenado y vaciado, concentrando en un matraz de fondo plano los metabolitos.</p>

Una vez obtenida la extracción, se filtra para eliminar impurezas y esta puede manipularse más fácilmente, siendo útil para preparación de fitofármacos, uso tradicional y estudio fitoquímico, este último generalmente es para plantas que no se han investigado o poseen poca información al respecto, ejecutando pruebas para identificar sus posibles metabolitos secundarios, utilizando diferentes técnicas, tanto de separación como de identificación.

3.3.3. Método cromatográfico de separación de metabolitos secundarios

Es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla en base a sus polaridades y pesos moleculares basándose en dos efectos opuestos:

- **Retención:** efecto sobre los componentes de la mezcla en una fase estacionaria, llegando a ser sólida o líquida.
- **Desplazamiento:** efecto que transporta los componentes de la mezcla, es la fase que se mueve o eluye a través de la fase estacionaria, denominada fase móvil, siendo líquida o gaseosa.

La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distintas velocidades, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. La repetición sucesiva de las operaciones elementales de retención y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original.

El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la móvil, recibe el nombre de elución (11).

3.3.4. Cromatografía de capa fina

La cromatografía en capa fina (CCF) se basa en la preparación de una capa uniforme de un absorbente, siendo gel de sílice el más usado, sostenido en una placa generalmente de aluminio, pero pueden ser de plástico o aluminio. Los requisitos para realizar una CCF son: un absorbente, placas y una cámara cromatográfica (figura 2).

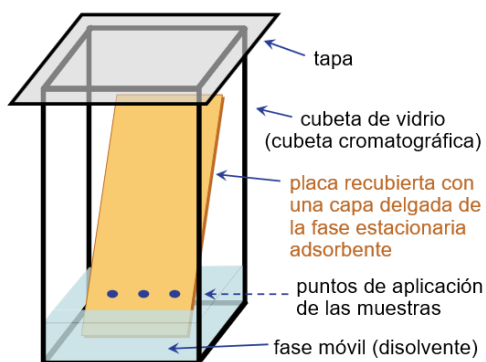


Figura N° 2: Técnica de cromatografía en capa fina (9).

La placa cromatográfica se marca a una pequeña distancia en el borde inferior, aplicando con un capilar de vidrio la muestra a analizar (Figura 3.A). Se coloca la placa con ayuda de una pinza en una cámara cromatográfica, la cual contiene la fase móvil (Figura 3.B), lo recomendable es esperar a que la fase móvil eluya $\frac{3}{4}$ partes del largo de la placa u observar donde llega el frente del solvente, marcando en ambos casos.

La fase estacionaria es un componente polar y la fase móvil o eluyente, tiende a ser un poco menos polar que la estacionaria, de forma que los menos polares desplazaran con mayor velocidad.

Una vez la muestra ha eluido, se procede a la detección, paso importante para desvelar los posibles metabolitos que un extracto pueda llegar a tener, algunos presentan a su vez fluorescencia, la cual se ve identificada con los reveladores, reactivos encargados de reaccionar con los grupos funcionales de los metabolitos secundarios y generar una mancha que, dependiendo del tipo de revelador y metabolito secundario, así será el color de la mancha que se observara a la luz visible o al ultravioleta (UV) (Figura 3.C).

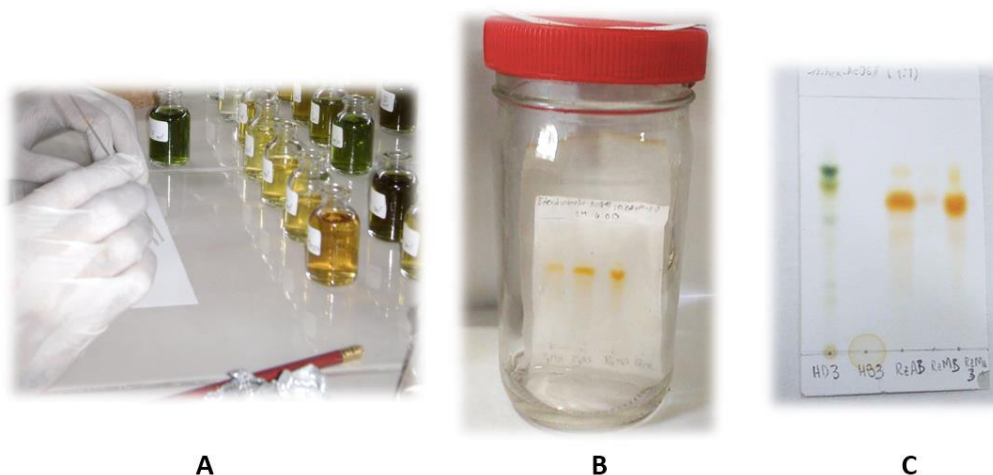


Figura N° 3: Cromatografía de capa fina. A: Aplicación de la muestra en la placa cromatográfica; B: Cubeta cromatográfica con fase móvil; C: Compuestos separados en la placa cromatográfica ya revelada (11).

El método de cromatografía de capa fina puede ser tradicional, pero en la actualidad sigue siendo de utilidad por el hecho que brinda información relevante de los grupos mayoritarios de metabolitos secundarios que un extracto posee.

3.3.5. Análisis fitoquímico preliminar

Un análisis fitoquímico preliminar implica identificar los metabolitos en una planta. Determinando la presencia de metabolitos secundarios como taninos, flavonoides, antraquinonas, cardiotónicos, saponinas, cumarinas, sesquiterpenlactonas, entre otros; aplicando técnicas de cromatografía,

espectroscopia y pruebas químicas específicas. Proporciona una idea inicial de la composición fitoquímica del extracto y las posibles actividades que podría llegar a tener con base a los metabolitos secundarios presentes. A continuación, se presentan una breve descripción, un ejemplo de estructura química del grupo de metabolitos secundarios y sus propiedades:

Tabla N°3: Metabolitos secundarios, núcleo, breve descripción y propiedades (9).

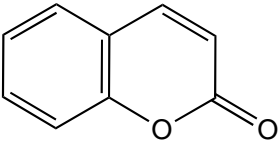
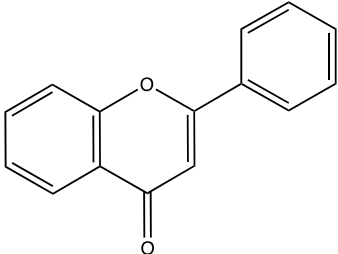
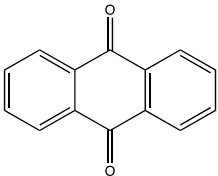
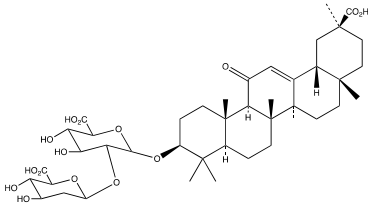
Metabolito secundario	Núcleo	Descripción	Propiedades
Cumarina		Derivados de benzo- α -pirona, clasificadas en su mayoría como fenólicas.	Venotónicos, antiinflamatorios, antiespasmódicos, sedantes y anticoagulantes.
Flavonoides y relacionados		Estructuras hidroxiladas en el anillo aromático y, por lo tanto, son poli fenólicas. Pueden encontrarse de forma libre o en forma de O-heterósidos o C-heterósidos, siendo la glucosa el azúcar más frecuente.	Antirradicales libres, antiinflamatorio, antibacterianos, antifúngicos, antivíricos, antiespasmódicos y antihemorrágicos.
Antraquinonas		Sistema tricíclico del antraceno, pero con el anillo central más o menos oxidado. Generalmente se encuentran como heterósidos O-, C- u O y C en el mismo esqueleto.	Potentes laxantes, efecto purgante, efecto hidragogo y colagogo.
Saponinas		Estructuras formadas por un azúcar y un aglicón denominado sapogenina. Estos pueden producir espuma disminuyendo la tensión superficial.	Hemático, antiinflamatorio, expectorantes, antitúxicos y diurético.

Tabla N°3: Metabolitos secundarios, núcleo, breve descripción y propiedades (9). (Continuación)

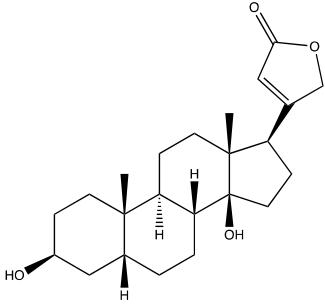
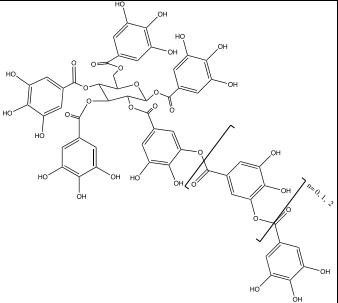
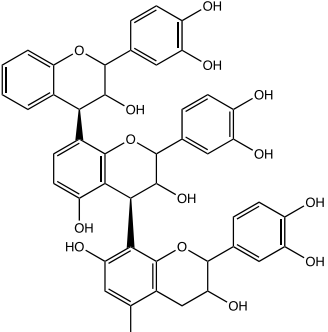
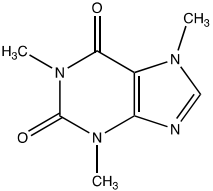
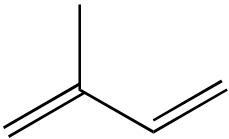
Cardiotónicos		Heterósidos (aglicon + azúcar) capaces de modular el funcionamiento del corazón, actuando directamente sobre la contractibilidad del músculo cardíaco (miocardio) y sobre la circulación aurículo-ventrículo,	Mejoran la circulación general, aumentan la filtración renal y aumentan la fuerza de contracción del miocardio.
Taninos	 <p style="text-align: center;">Tanino hidrolizable</p>  <p style="text-align: center;">Tanino condensado</p>	Amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura poli fenólica, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina).	Antioxidantes, antisépticos, protectores, astringentes y antídoto en intoxicaciones con alcaloides.
Alcaloides		Sustancias orgánicas nitrogenadas con carácter básico y mayoritariamente de origen vegetal. Estructuras complejas con capacidad de ejercer acciones fisiológicas incluso a dosis bajas.	Mayoritariamente tóxicos, por lo que se deben tener extrema precaución.

Tabla N°3: Metabolitos secundarios, núcleo, breve descripción y propiedades (9). (Continuación)

Terpenoides		Son muy numerosos y de estructuras diversas, se pueden encontrar tal cual o formando estructuras más complejas. Algunos compuestos tienen solo una parte isoprenoide y se consideran de origen mixto.	Antifúngicos, anti mutagénicos, anticancerígenos, antiviral, antioxidante, antidiabética, antiinflamatoria y anti-protozoos.
-------------	---	---	--

Algunos de los metabolitos de la tabla N° 4 presentan diferentes mecanismos por los cuales median y ejecutan las diferentes actividades en el ser humano:

Tabla N° 4: Mecanismos de acción de flavonoides, taninos, cumarinas y terpenoides. Fuente: elaboración propia.

Metabolito secundario	Mecanismo de acción
Flavonoide	<p>Antioxidante:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reaccionan de forma directa con especies reactivas, oxidándose y estabilizando el radical libre (23). - Se unen a cadenas enzimáticas transportadoras de hormonas y de ADN. También puede quelar iones metálicos, catalizar la cadena de electrones y depurar radicales libres (24). <p>Antiinflamatorio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inhiben el metabolismo del ácido araquidónico (23). - Bloquean la respuesta antiinflamatoria al inhibir las enzimas óxido nítrico sintasas, la expresión de ciclooxigenasas y mediadores de la respuesta inflamatoria (24). - Inhiben la formación de prostaglandinas y la vía de la ciclooxigenasa (25). - Suprimen las reacciones catalizadas de síntesis de prostanoides (25).
Taninos	<p>Antioxidante:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inhiben la peroxidación lipídica y las lipooxigenasas <i>in vitro</i> (26). - Purga los radicales libres (26). Capturan las especies reactivas o inactivan los precursores de la oxidación (27). - Los taninos condensados son inhiben de forma no competitiva a la enzima xantina oxidasa (28).

Tabla N° 4: Mecanismos de acción de flavonoides, taninos, cumarinas y terpenoides. Fuente: elaboración propia. (Continuación).

Cumarinas	<p>Antioxidante:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Capturan los radicales libres e intervienen en las cadenas enzimáticas para la producción de tirosina kinasas (29). - Algunas cumarinas como la escopoletina ejercen una inhibición no competitiva a la enzima xantina oxidasa (29). - Actúan como depuradores de las especies reactivas a la vez que ejerce un efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica (30). <p>Antiinflamatorio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estimulan la fagocitosis al detener la liberación del líquido edematoso de las células involucradas en procesos inflamatorios (30). - En el espacio tisular, las cumarinas son transportadas en las microvasculaturas permeables, pero si la permeabilidad capilar es menor, las cumarinas son incapaces de actuar. Por lo tanto, pueden disminuir el nivel de hinchazón de los tejidos y ayudar a relajar los músculos lisos (30).
Terpenoides	<p>Antioxidante:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Depuran las especies reactivas donando hidrógenos o realizan un efecto de antirradicales de monoterpenos y sesquiterpenos, así como la inhibición efectiva de la peroxidación lipídica (31). <p>Antiinflamatorio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inhibe procesos enzimáticos y expresiones de la óxido nítrico sintasa a través de la inhibición de la activación del NF-kb en la cadena de los macrófagos murino (32). - El andrografólido inhibe la producción de TNF-κ e IL-12 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con lipopolisacárido (LPS). Se describió la inhibición de la activación de NF-κB por andrografólido (32). - La mayoría de monoterpenos podrían inhibir la producción del factor de inflamación del óxido nítrico, interleucinas y TNF-α inducidos por lipopolisacáridos (33).

3.4. Actividad antioxidante (12-13)

3.4.1. Estrés oxidativo

Se define como el desequilibrio entre especies reactivas (radicales libres) y el sistema antioxidante intrínseco de la homeostasis en el organismo. Una alteración en el funcionamiento normal de esta relación radical libre-antioxidante puede desencadenar en un estrés oxidativo excesivo, causando

afecciones inflamatorias que desembocan en enfermedades, induciendo la apoptosis en las células y acelerar el proceso de envejecimiento celular en el cuerpo.

3.4.2. Radicales libres

Especies químicas que en su estructura poseen electrones desapareados, altamente reactivos con la capacidad de formar otros radicales libres en cadena, algunos tienen vida media prolongada, porque su reactividad es baja, en otros casos poseen una vida media casi que instantánea, propagándose y dañando con facilidad, tanto que un solo radical puede perjudicar a millones de moléculas mediante una reacción en cadena.

Los radicales libres pueden generarse por factores intrínsecos de reacciones bioquímicas en el cuerpo o por factores exógenos como tabaquismo, alcoholismo, contaminación ambiental, estrés emocional o físico, mala alimentación, etc.

Estos reaccionan con otras moléculas para obtener el electrón faltante, al ser donado, la molécula que lo proporciona pasa a ser un radical libre, siguiendo el ciclo de quitar y dar hasta encontrarse con una especie poco reactiva o con un antioxidante.

3.4.3. Antioxidantes

Compuestos afines a los radicales libres de origen exógeno o endógeno que intervienen en la iniciación, propagación o finalización de un proceso oxidativo. Poseen la capacidad de anular el efecto oxidante de los radicales libres; estos a pesar de encontrar en concentraciones relativamente bajas, ejercen un gran efecto sobre las especies reactivas, previniendo, inhibiendo o retardando la oxidación.

Los antioxidantes son capaces de donar electrones para reducirlos, logrando mantener así la proporción correcta de oxidante y antioxidante. Los metabolitos secundarios con mayor actividad antioxidante son:

- Flavonoides, compuestos fenólicos y polifenoles.
- Terpenoides

- Alcaloides que en su estructura posean nitrógeno o azufre.

Al poseer grupos funcionales con capacidad de donar electrones, los convierten en los metabolitos secundarios con la capacidad de intervenir en las cadenas oxidativas.

Para estudiar la actividad antioxidante en un extracto existen diferentes tipos de métodos: los que se basan en una única reacción de transferencia de electrones o de átomos de hidrógenos tipo oxidoreducción, presentando variaciones en su coloración relacionadas a la concentración de especies antioxidantes presente en la muestra, entre ellos se encuentran:

- Ensayo de capacidad de captación de radicales libres de 2,2,-difencil-1-picril-hidrazilo (DPPH)
- Ensayo de reducción de cobre (CUPRAC)
- Ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (ABTS o TEAC)
- Ensayo de capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP)

También están los métodos basados en la competencia termodinámica de sustrato y antioxidante por el radical peroxilo, y como resultado, la formación de sondas fluorescentes que pueden monitorearse e interpretar mediante curvas cinéticas. Ejemplos:

- Ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)
- Ensayo de capacidad de captación de peroxil (PSC)
- Ensayo del parámetro antioxidante (TRAP) que atrapa los radicales libres

3.4.4. Ensayo de capacidad de captación de radicales libres de 2,2-difencil-1-picril-hidracilo (DPPH)

Radical de nitrógeno con un electrón de valencia desapareado estable en virtud de la deslocalización del electrón de reserva sobre la molécula, de modo que no se dimeriza, a su vez esto le brinda el característico color púrpura espectral con absorción en etanol en un rango de longitud de onda de 515 a 520 nm.

La solución de DPPH pierde intensidad en su coloración al estar en presencia de donantes de electrones tomando un color amarillo según la concentración de especies donadoras, pasando de un radical libre estable a un no radical (14); los cambios de color ocurren cuando el átomo desapareado del DPPH recibe electrones de los antioxidantes.

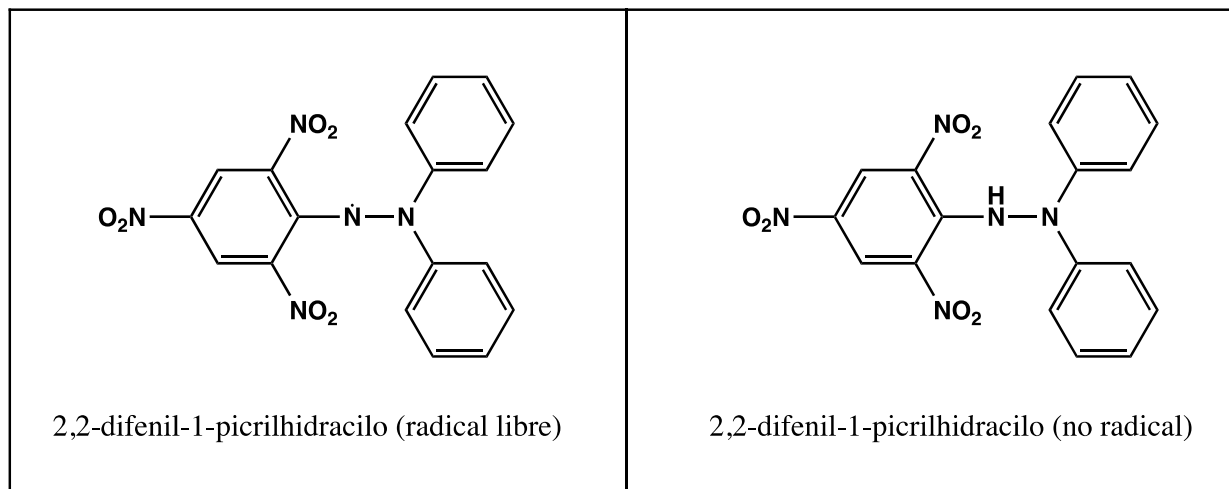


Figura N° 4: 2,2,-difenil-1-picrilhidracilo (radical libre) y ,2,-difenil-1-picrilhidracilo (no radical) (14).

Para expresar la concentración de antioxidantes dentro de un extracto, una de las formas es realizar el cálculo del IC₅₀, un estimado estadístico de los valores de concentración mínima necesaria de una sustancia (por ejemplo: sustancia antioxidante) para inhibir al 50% la concentración de una sustancia oxidante dentro de una solución de trabajo como el ácido ascórbico (15), realizando el cálculo mediante la función de la recta aplicando regresión lineal a la curva de calibración del estándar de ácido ascórbico, esto con el propósito de determinar la eficiencia de los antioxidantes dentro del extracto acuoso, siendo está la metodología a aplicar a la especie vegetal *R. inundata* durante la pasantía de investigación.

3.5. Síntesis de nanopartículas de plata (16)

3.5.1. Nanotecnología

“Podría definirse como la disciplina centrada en el estudio, diseño, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales, mediante el control de la materia a nanoescala y la explotación de fenómenos y propiedades...” (17). Dependiendo de la disminución

del tamaño, el radio entre el área de superficie y el volumen incrementan significativamente, modificando sus parámetros físicos, químicos y biológicos.

El tamaño de las nanopartículas oscila entre los 1 a 100 nm, lo que le confiere propiedades únicas que no poseen sus contrapartes a macro escala. Pueden sintetizarse de diferentes materiales, entre estos el uso de metales como el cobre, plata, oro, entre otros. Actualmente las nanopartículas poseen diferentes aplicaciones encontrándose en prendas deportivas para controlar los malos olores, cremas de protección solar, administración de medicamentos, nanofiltros de agua y aire, además por su tamaño estos poseen reactividad química aumentada lo que lo convierte en buenos catalizadores.

3.5.2. Síntesis de nanomateriales

Dependiendo la procedencia pueden ser de origen natural, origen incidental y el más común, origen artificial, utilizando dos técnicas:

- Descendente (top-down): consiste en un proceso de desgaste de un macro material hasta disminuirlo a un tamaño de partícula nano.
- Ascendente (bottom-up): consiste en la elaboración de nanopartículas con capacidad de autoensamblaje a través de la condensación de átomos. El reto que presentan es que de forma espontánea de autoensamblaje sobre el cambio de un iniciador químico o físico específico, ya sea cambio de pH, concentraciones de los solutos o aplicación de un campo eléctrico.

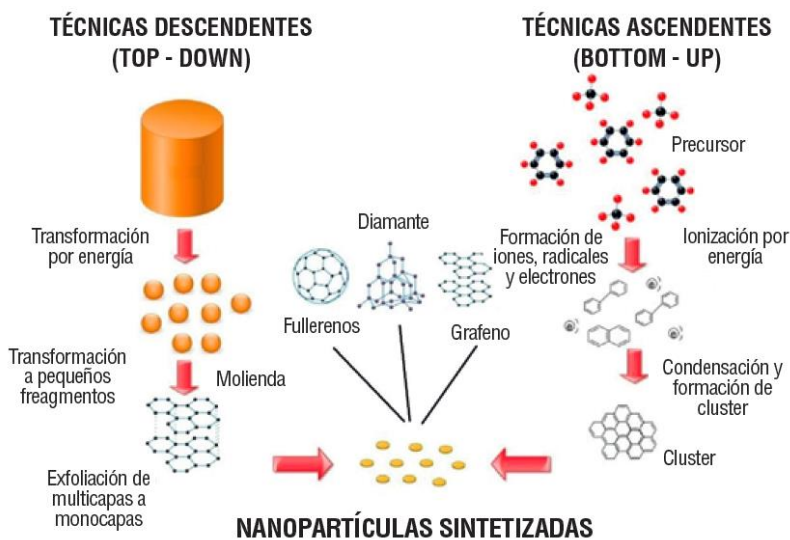


Figura N° 5: Técnicas de síntesis de nanopartículas (17).

En la actualidad las nanopartículas más estudiadas y utilizadas son a partir de los iones de plata, por su conductividad, estabilidad, actividad catalítica y antibacteriana.

Muchos de los efectos adversos se han asociado a la toxicidad de los métodos químicos y físicos, por los componentes adsorbidos en la superficie de las nanopartículas (16). En consecuencia, se han buscado alternativas más amigables con el medio ambiente y con menos o ningún efecto adverso aplicando microorganismos, hongos o extractos de plantas. Estos procesos han pasado a formar parte de una rama de la nanotecnología denominada: “Síntesis verde”.

3.5.3. Síntesis verde (17)

La síntesis tradicional involucra materiales tóxicos como solventes y surfactantes que dañan el medio ambiente. La síntesis verde es un método alternativo de bioproducción junto con metales (oro, cobre, plata y óxidos metálicos), buscando ser más compatibles con los ecosistemas.

Estos procesos se basan en la reducción de metales utilizando plantas que en su composición fitoquímica posean metabolitos secundarios de carácter antioxidante como los flavonoides, taninos, compuestos fenólicos, cumarinas y alcaloides. Adicionalmente, se ha comprobado que sistemas biológicos como los extractos de plantas son un sustituto adecuado de agentes químicos reductores, siendo a su vez, amigables con la naturaleza, simples, rápidos, estables y rentables (18).

Los pasos para realizar una síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando extractos de planta son los siguientes (19):

1. Recolectar las partes de plantas a utilizar.
2. Lavar y colocar a decocción la muestra vegetal.
3. Filtrar
4. Agregar la solución de AgNO_3 .
5. Cambio de color de solución.

Tomando en cuenta que, al realizar cualquier síntesis de NPs, se deben considerar factores como el pH, la concentración del extracto, tiempo de reacción y la temperatura; estos factores pueden alterar de forma significativa los resultados de las nanopartículas de plata.

3.5.4. Nanopartículas de plata: características, propiedades y aplicaciones

Las nanopartículas presentan atractivos propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, catalíticas, magnéticas y electrónicas, esto correlacionado a su tamaño, forma, composición y estructura de la nanopartícula.

Así, en el caso de las AgNPs, presentan soluciones coloidales de colores fuertes cuyas frecuencias de resonancia aparecen en el rango del UV-Vis y que dependiendo de la forma y tamaño así será a la longitud de onda que presentaran su mayor pico (Figura 6):

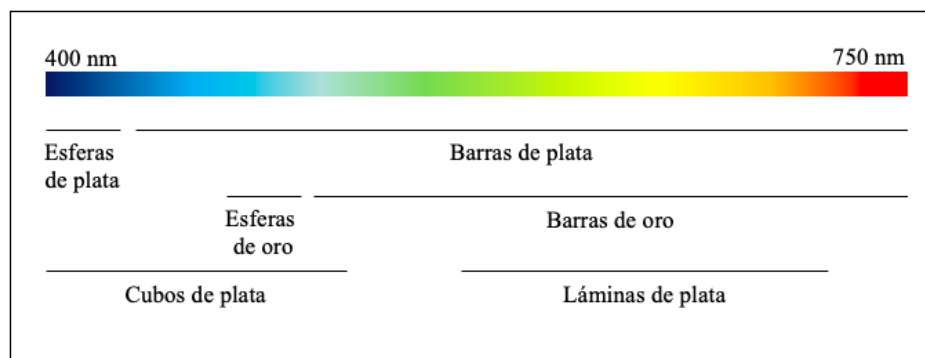


Figura N°6: Clasificación de diferentes morfologías típicas de las AgNPs y AuNPs y su localización en el espectro UV-Vis según la absorción provocada por la SPR (16).

La plata como tal, ha sido utilizado en tiempos antiguos como desinfectante del agua. No obstante, es hasta el siglo XVII que se reportan usos medicales con múltiples propósitos y a finales del siglo XIX que se introduce por primera vez el uso del nitrato de plata en gotas oftálmicas para los recién nacidos (20). Existen indicativos de que las AgNPs han estado presentes en la naturaleza desde hace más de 100 años, siendo uno de los nanomateriales más aprovechados.

El primer reporte de síntesis de AgNPs data en 1889 por M. C. Lea (20), reportando plata coloidal estabilizada por citrato, obteniendo un tamaño de partícula de 7 nm a 9 nm, posteriormente se comercializo en 1897 como “Collargol”, empleándolo en aplicaciones terapéuticas en medicina.

Las AgNPs están en la vanguardia de la investigación y el desarrollo debido a sus propiedades especiales y su amplia gama de posibles aplicaciones. Su capacidad para interactuar a nivel molecular y su efectividad en pequeñas concentraciones las hace especialmente valiosas en nuevas tecnologías y soluciones innovadoras. Son foco de interés para la incorporación y desarrollo en productos a la vanguardia, por su gran actividad antimicrobiana y capacidad bactericida.

Las AgNPs varían de características en función del tamaño y forma, reportando que, al disminuir el tamaño de partícula, incrementa su poder bactericida, ya que presentan mayor superficie de contacto.

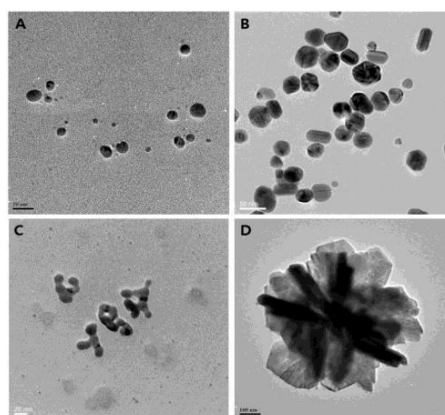


Figura N° 7: Imagen ilustrativa de diversas formas de AgNPs (16).

Su estructura depende mucho de los procesos y condiciones en los que se sintetizan, tales como, la temperatura, tipo de método, presencia de un sustrato, entre otros; hay diferentes formas, por ejemplo: esféricas, mixtas, en flor, ramificadas y triangulares (figura 7). Entre sus aplicaciones destacan:

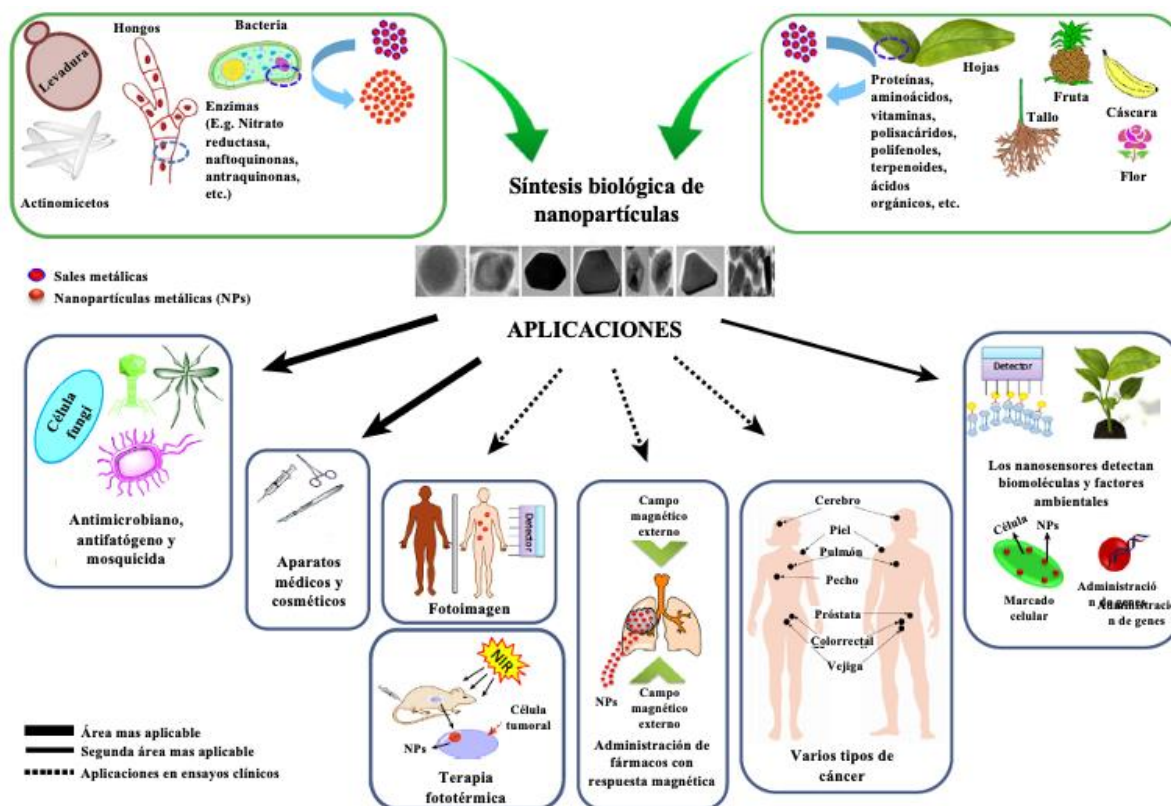


Figura N° 8: Síntesis biológica de nanopartículas y sus aplicaciones. Imagen adaptada del inglés a español de (18).

Por ello es importante caracterizar las nanopartículas, ya que sus características y propiedades ópticas dependen de su forma, lo cual es fundamental para su identificación.

3.5.5. Técnicas de caracterización de NPs

La caracterización de las AgNPs es una etapa fundamental para comprender y controlar la síntesis, así como conocer las aplicaciones posteriores que se les pueden atribuir. Para ello utilizan una amplia gama de técnicas instrumentales basados en:

- Propiedades ópticas y análisis elemental
 - Espectrofotometría de absorción de luz Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

- Espectrofotometría de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR)
- Espectroscopía fotoelectrónica de Rayos (XPS)
- Espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y espectroscopía de absorción atómica (FAAS)
- Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

- Morfología
 - Microscopía electrónica de transmisión (TEM)
 - Microscopía electrónica de barrido (SEM)
 - Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

- Análisis estructural
 - Difracción de Rayos X (XRD)
 - Dispersión dinámica de luz (DLS)

Con estas técnicas podemos recopilar información de parámetros como: conformación, estructura, morfología, cristalinidad, tamaño del poro, entre otros. Esto interpretando la interacción de una señal (luminosa, eléctrica, térmica, etc.) (16)

3.5.6. Espectrofotometría de absorción de luz Ultravioleta-Visible

Es de las técnicas más utilizadas para la primera línea de caracterización de NPs sintetizadas, a su vez, se utiliza como marcador para dirigir la síntesis de las AgNPs. Es sencilla, rápida y aplicable en diferentes tipos de NPs. El método está basado en la absorción UV-Vis por parte del analito, en consecuencia, genera un estado excitado que consecutivamente elimina el exceso de energía en forma de calor.

Las AgNPs poseen características ópticas que los hacen reaccionar de forma intensa con longitudes de onda específicas; la posición y forma de la banda se ve influenciada por diferentes factores tales como el tamaño, la forma, la polidispersidad de las partículas y las sustancias adsorbidas en las superficies de las NPs. La presencia de un pico entre los 400-500 nm es indicativo de AgNPs (16).

CAPÍTULO IV

4.0. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Tipo de estudio

Exploratorio: Al ser la *R. inundata* una especie sin estudiar de la familia Acanthaceae, se hará el primer acercamiento respecto a su composición fitoquímica, actividad antioxidante y aplicaciones en otras áreas como la síntesis de nanomateriales. Todo lo antes mencionado con el objetivo de abrir nuevas líneas de investigación respecto a la familia Acanthaceae.

Experimental de laboratorio: Aplicando técnicas de separación e identificación cualitativa con reactivos específicos, se obtendrán los grupos mayoritarios de metabolitos secundarios en el extracto de la muestra. Además, a partir de un procedimiento de laboratorio basado en Magoni (21), se realizarán modificaciones al método para adaptarlo al extracto acuoso de la muestra y cuantificar la concentración de antioxidantes aplicando DL_{50} . A su vez se desarrollará una técnica apta para la síntesis de nanopartículas de plata y su caracterización.

4.2. Investigación bibliográfica

Las consultas fueron realizadas en las siguientes bases de datos:

- Google Scholar
- Academia
- ResearchGate
- Royal Botanic Garden
- Biblioteca virtual UES
- OriginLab

4.1. Investigación de campo

Universo: Familia Acanthaceae perteneciente a la flora salvadoreña.

Muestra: La especie *Ruellia inundata* Kunth recolectada en los viajes de campo realizados.

Recolección e identificación de la muestra: se recolectó 0.7 kg de la muestra vegetal seleccionada con los ensayos iniciales, en área protegida del “Parque ecológico Bosque de Cinquera”, Departamento de Cabañas oeste, el material de la planta como brácteas, flores y tallo, el cual, con ayuda de los curadores, se presentó en el Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador para su identificación al curador del herbario, otorgándonos un número de voucher, útil para establecer trazabilidad para posteriores investigaciones. Se registró la siguiente información: nombre común, nombre científico, fecha de recolecta, lugar de recolecta, persona que lo recolectó, coordenadas GPS y nombre del botánico que identificó la especie vegetal.

Selección de la muestra: Inicialmente se realizaron ensayos de síntesis de nanopartículas con las condiciones reportadas en bibliografías (2)(3); La especie vegetal fue escogida con base a ensayos iniciales con 8 especies vegetales de la familia Acanthaceae, recolectadas en viajes de campo realizados en los años 2023 y 2024, tomando en cuenta también la disponibilidad en el período de realización de la pasantía y su accesibilidad respecto a la recolección e identificación.

4.4. Parte experimental

4.4.1. Pretratamiento de la muestra

Secado: Para la experimentación en todos los métodos y la síntesis, la especie vegetal se mantuvo al aire libre 1 semana y se secó en una estufa de aire circulante por 5 días a 40° C.

Molido: Una vez lo suficientemente seco, el material vegetal se fragmentó en un molino de cuchillas modelo n° 4 de Thomas-Willey, Laboratory Mill, con un tamizador de 2 mm. El material vegetal molido se almacena en bolsas plásticas de polietileno.

Los procedimientos realizados fueron en ausencia de luz a una temperatura de 25°C ± 5°C en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Universidad de El Salvador. En el LIPN, el material vegetal se mantuvo al aire libre por 1 semana y fue secado en una estufa de aire circulante por 5 días. Posteriormente, una vez alcanzando el punto óptimo de secado (<10% de humedad), se molió en un molino de cuchillas modelo n° 4 de Thomas-Willey, Laboratory Mill, utilizando un tamiz de tamaño de poro de 2 mm, obteniendo 578.9 g de material seco y molido.

Para almacenar, se utilizaron bolsas de polietileno con una capacidad de 5 lb y se rotularon con el nombre común, nombre científico, lugar de recolección y el peso en gramos.

4.4.2. Análisis fitoquímico

4.4.2.1. Obtención del extracto acuoso de *R. inundata*

1. Pesar 10 g de las partes aéreas molidas en un Erlenmeyer de 125 mL y extraer con 100 mL de agua desmineralizada en un hot plate 20 minutos a ebullición.
2. Filtrar el extracto con papel filtro Fisherbrand P5 cualitativo de porosidad media y recibir en un beaker de 50 mL.
3. Almacenar y rotular.

4.4.2.2. Preparación de material para Cromatografía de Capa Fina

1. Preparación de extracto acuoso de partes aéreas de *Ruellia inundata* Kunth.
2. Preparar una solución de 0.1 mg/mL (mismo procedimiento para todos los testigos)
3. Cada fase a preparar debe ser rotulada con la siguiente información:
 - Reactivos en orden de polaridad ascendente
 - Proporciones de cada reactivo
 - Grupo de metabolito a eluir.
4. Marcar e identificar en la cromatoplaca.
5. Aplicar 5 a 10 μ L con un capilar el extracto acuoso y el testigo (si aplica).
6. Introducir la placa en la cámara cromatográfica saturada con la fase móvil.
7. Eluir la fase móvil $\frac{3}{4}$ partes de la placa o hasta el frente del solvente. Retirar de la cámara y marcar el frente del solvente.
8. Dejar secar el exceso de fase móvil, posterior a ello, utilizar agentes reveladores.
9. Reportar la evidencia.

La mayoría de las pruebas utilizaran esta metodología, siguiendo las condiciones de la tabla N° 4 en el punto 4.4.2.4.

4.4.2.3. Identificación de glicósidos saponínicos

- Método de la espuma

1. Pesar 0.5 g del material vegetal seco y triturado, consecutivamente, colocar en un tubo de ensayo.
2. Adicionar 4 mL de agua destilada.
3. Agitar enérgicamente durante 30 segundos y dejar reposar.
4. Medir con una regla la altura de espuma formada a los siguientes tiempos: 1 minuto, 5 minuto, 10 minuto y 30 minutos.

Evidencia positiva: espuma abundante que perdura durante 30 minutos, con una altura mínima de 1 cm.

4.4.2.4. Identificación de grupo de metabolitos por CCF

Tabla N° 5: Condiciones para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios por CCF. N/D corresponde a los testigos de los cuales no se tenía disponibilidad.

Grupo de metabolito	Fase móvil	Revelador	Evidencia positiva	Testigo
Glicósidos cardiotónicos	AceOEt:MeOH:H ₂ O (8:1.5:0.5)	Kedde	Manchas de color lila	K-estrofantina
Flavonoides	Ace:MeOH:H ₂ O (8:1.5:0.5)	Tricloruro de aluminio	Fluorescencia amarilla, verde claro y anaranjado a la luz UV-365 nm	Quercetina
Antraquinonas	n-hex:AceOEt (1:1)	Hidróxido de potasio 5% en metanol	Manchas color rosado, rojo o violeta	N/D
Taninos	Ace:MeOH:Ac. Acé:H ₂ O (5:4:0.5:0.5)	Tricloruro de hierro	Manchas de color azul morado para taninos hidrolizables y manchas de color verde oscuro para taninos condensados	Ácido tánico

Tabla N° 5: Condiciones para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios por CCF. N/D corresponde a los testigos de los cuales no se tenía disponibilidad. Fuente: Elaboración propia. (Continuación).

Alcaloides	AceOEt:MeOH:H ₂ O (5:4:1)	Dragendorff	Manchas de color anaranjado	Sulfato de hiosciamina
Sesquiterpenlactonas	n-Hex:AceOEt (7:3)	Baljet	Manchas de color anaranjado	N/D
Cumarinas	Ace:MeOH:H ₂ O (5:4:1)	Hidróxido de potasio 5% en metanol	Manchas fluorescentes de color celeste o púrpura en UV-365 nm	N/D
Terpenoides	Ace:MeOH:H ₂ O (5:4:1)	Vainillina en ácido sulfúrico	Manchas de color rosado, morado, violetas o verde.	N/D

4.4.3. Determinación de la actividad antioxidante de *R. inundata*

4.4.3.1. Obtención del extracto acuoso de *R. inundata*

1. Pesar 10 g de las partes aéreas molidas en un Erlenmeyer de 125 mL y extraer con 100 mL de agua desmineralizada en un hot plate 20 minutos a ebullición.
2. Filtrar el extracto con papel filtro Fisherbrand P5 cualitativo de porosidad media y recibir en un beaker de 50 mL.
3. El extracto recuperado en el beaker de 50 mL, se filtra por segunda vez utilizando un filtro con un tamaño de poro de 0.45 µm PVDF hidrofílico de 25 mm Thermo Scientific.
4. Almacenar y rotular.

4.4.3.2. Preparación de la curva de calibración

1. Preparar solución madre de ácido ascórbico de 5000 µM.
2. Para establecer la curva se tomarán alícuotas de la solución madre de ácido ascórbico para preparar diferentes concentraciones y ejecutar la línea de calibración.
3. Se preparó un blanco de 950 µL de DPPH y 50 µL de agua en una celda descartable.

4.4.3.3. Preparación de la muestra

1. Del extracto filtrado a través del poro de 0.45 μm , preparar las diferentes concentraciones, estas se expresarán en $\mu\text{g/mL}$.

4.4.3.4. Preparación del reactivo DPPH

1. Preparar una solución 1 mg/mL de DPPH.
2. Disolver por 10 minutos en baño ultrasonido a temperatura constante 25° C.
3. Retirar vial y dejar reposando mientras alcanza la temperatura ambiente.
4. En un Erlenmeyer de 125 mL preparar una solución madre de DPPH al 75 μM .

4.4.3.5. Preparación de las celdas de muestras y estándares para la determinación de la actividad antioxidante

1. En un recipiente que proteja de la luz las celdas descartables nuevas, ordenar y rotularlas.
2. Para cada celda a analizar se deben agregar 950 μL de la solución de DPPH al 75 μM .
3. Tomar alícuotas de 50 μL de las diferentes concentraciones de los estándares de ácido ascórbico y agregarlas en las celdas con DPPH.
4. Preparar un blanco en una celda descartable
5. Agregar 50 μL de las diferentes concentraciones realizadas a partir del extracto acuoso de *Ruellia inundata* filtrado.
6. Cubrir las celdas de la luz y dejar reposar por 30 min.

4.4.3.6. Medición de absorbancias de las muestras y estándares en espectrofotómetro UV-Vis, modelo GENESYS 10S UV-Vis

Tanto para muestra como estándares, el procedimiento de lectura fue el mismo, tomando en cuenta el tiempo de reacción de cada set.

1. Encender el equipo e ingresar al programa.
2. Programar la longitud de onda de 515.0 nm.
3. Introducir las unidades y concentraciones de las soluciones estándares.
4. Colocar la celda blanco.

5. Realizar las diferentes mediciones a una longitud de onda de 515.0 nm. Almacenar datos.

4.4.4. Síntesis de AgNPs empleando el extracto acuoso de las partes aéreas de *R. inundata*

4.4.4.1. Obtención del extracto acuoso de *Ruellia inundata*

1. Pesar 10 g de las partes aéreas molidas en un Erlenmeyer de 125 mL y extraer con 100 mL de agua desmineralizada en un hot plate 20 minutos a decocción.
2. Filtrar el extracto con papel filtro Fisherbrand P5 cualitativo de porosidad media y recibir en un beaker de 50 mL.
3. El extracto recuperado en el beaker de 50 mL, se filtra por segunda vez con un filtro de 0.45 μm PVDF hidrofílico de 25 mm Thermo Scientific.

4.4.4.2. Síntesis de nanopartículas

1. Pesar 17 mg AgNO_3 en un vial con capacidad de 10 mL.
2. Agregar 3.75 mL de agua desmineralizada.
3. Introducir un agitador magnético al vial, seguido de 1.25 mL de la solución de PVP 40 al 4%.
4. Utilizando una jeringa, agregar el extracto acuoso filtrado.
5. Irradiar con luz LED azul de 3 W con agitación constante por 1 hora.

4.4.4.3. Preparación de las muestras para mediciones en el espectrofotómetro UV-Vis

1. En cada celda agregar la cantidad de 2.85 mL de agua desmineralizada y 0.15 mL de la microdispersión de nanopartículas plata sintetizadas y homogenizar.
2. Para el blanco agregar la misma cantidad de agua desmineralizada (2.85 mL) y de extracto filtrado a 0.45 μm (0.15 mL).

4.4.4.4. Medición de absorbancias de las muestras en el espectrofotómetro UV-Vis, modelo GENESYS 10S UV-Vis

1. Encender el equipo e ingresar al programa.
2. Colocar el blanco.
3. Introducir las celdas con las muestras en el equipo.
4. Realizar las lecturas en el rango de 300 a 800 nm.

CAPÍTULO V

5.0. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

5.1. Recolección e identificación botánica de *R. inundata*

Se recolectaron 0.7 kg de partes aéreas (brácteas, tallo, botón floral y flores) de especie vegetal fresca en área protegida del “Parque ecológico Bosque de Cinquera”, Departamento de Cabañas oeste, en las coordenadas GMS 13°53'03.0"N 88°57'51.0"W, con una altitud de 383 m.s.n.m. El material se transportó al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales (LIPN). Además, se identificó y registró a *R. inundata* en la base de datos del Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador por el curador del herbario Gabriel Cerén, obteniendo un código de voucher: “GC 5813”.

5.2. Resultados e interpretación de resultados del tamizaje químico preliminar

Las partes aéreas de *R. inundata* Kunth., de nombre común “Calcetín” constaban de flores, botón floral, brácteas, y tallo. A estas se les realizó un análisis fitoquímico preliminar con el objetivo de indagar los grupos de metabolitos secundarios mayoritarios dentro de la especie vegetal, utilizando CCF y aplicando agentes reveladores, obteniendo los resultados expresados en la tabla N° 6.

Tabla N° 6: Análisis fitoquímico preliminar de *Ruellia inundata* Kunth. Positivo (+), negativo (-) e indeterminado (\pm). Fuente: elaboración propia.

Metabolitos secundarios	Resultado
Glicósidos saponínicos	-
Glicósidos cardiotónicos	-
Flavonoides	+
Antraquinonas	-
Taninos	+
Alcaloides	\pm
Sesquiterpenlactonas	-
Cumarinas	+
Terpenoides	+

Se ha reportado que en el género *Ruellia* predominan los siguientes grupos de metabolitos secundarios: flavonoides, triterpenos, cumarinas, alcaloides, glicósidos fenólicos, entre otros constituyentes (5), al igual que Khurram Afzal y colaboradores (22) reportan glicósidos, alcaloides, flavonoides y triterpenos, lo cual concuerda con los metabolitos encontrados en este estudio y reportados en la tabla N° 6.

Nabil M., y col. (5) y Afzal K., y col. (22), documentan alcaloides en el género *Ruellia*; el análisis fitoquímico realizado a la especie vegetal *R. inundata* obtuvo como resultado que a simple vista no se puede identificar si es positivo o negativo en la CCF aplicando Dragendorff como revelador, no obstante, el grupo de metabolitos secundarios no puede descartarse por completo, ya que necesario realizar otras pruebas más sensibles para corroborar si posee en pequeñas cantidades alcaloides.

Desde un enfoque general, los grupos de metabolitos secundarios que dieron positivo en el extracto acuoso de las partes aéreas de *R. inundata*, son aquellos que han sido reportados con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias [10]. Cabe recalcar que los ensayos realizados en este estudio no son lo suficientemente sensibles para poder descartar la presencia de grupos de metabolitos secundarios en mínimas cantidades.

Los metabolitos secundarios son los responsables de ejercer el efecto farmacológico, y por ende son atribuidos diferentes usos etnobotánicos, sin embargo, actualmente no se reportan usos etnobotánicos para esta especie vegetal, no obstante, el género *Ruellia* ha sido utilizado en la medicina ayurvédica como antihelmíntico, diurético, antidiabético, antipirético, analgésico, antioxidante, antihipertensivo, agente gastroprotector y en el tratamiento de la gonorrea (22).

La presencia de grupos hidroxilos y porciones acetiladas en las estructuras químicas les confieren las propiedades antioxidantes a los diferentes metabolitos de la tabla N° 4. La bibliografía menciona la actividad antioxidante como unas de las propiedades predominantes en el género *Ruellia*. Los metabolitos como taninos, flavonoides, y terpenoides poseen grupos funcionales que les otorgan una intensa capacidad de donar electrones lo cual los puede convertir en un buen antioxidante (5).

5.3. Cuantificación de la actividad antioxidante por espectrofotometría UV-Vis empleando el método de DPPH.

Para poder cuantificar la actividad antioxidante, se preparó una curva de calibración de ácido ascórbico (5 μM a 600 μM), partiendo de una solución madre de 5000 μM (Ver anexo N° 1 y figura N° 22).

Del extracto acuoso de partes aéreas de *R. inundata* 1:10, se prepararon diferentes concentraciones (Ver anexo N° 1). Utilizando el espectrofotómetro UV-Vis, se realizaron las lecturas a una longitud de onda de 515.0 nm utilizando cubetas descartables.

Para obtener el IC_{50} (Estimado estadístico de los valores de concentración mínima necesaria de antioxidantes para inhibir al 50% la concentración de DPPH) (34-35), se utilizó mediante la ecuación de la recta aplicando regresión lineal en función de la mitad de la absorbancia del DPPH (Ver Anexo N° 2).

El ácido ascórbico presento un IC_{50} de $78.75 \pm 1.49 \mu\text{g/mL}$ (Ver Anexo N° 2), mientras que el extracto acuoso de *R. inundata* mostró un IC_{50} de $596.64 \pm 15.80 \mu\text{g/mL}$ (Ver Anexo N° 2), considerando el resultado obtenido, no posee una marcada actividad antioxidante, al menos no a las concentraciones analizadas, ya que, tomando criterios previos, no presenta una buena concentración inhibitoria ($\text{IC}_{50} > 450 \mu\text{g/mL}$) (44).

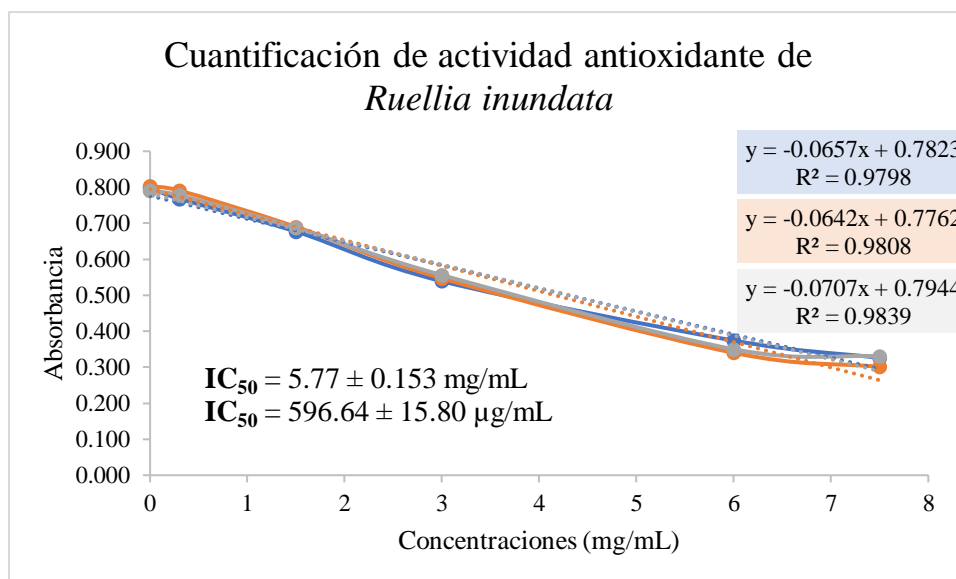


Figura N° 9: Cuantificación de la actividad antioxidante utilizando el método de DPPH con espectrofotometría UV-Vis al extracto acuoso de *Ruellia inundata*. Fuente: Elaboración propia.

Teniendo en cuenta, además, que este dato de la capacidad antioxidante reportado en este estudio es el determinado en el extracto que se utilizó para la síntesis de AgNPs, el cual incluía calor en su método de extracción, por lo que se esperaría que al aplicar otro método y condiciones de extracción que no involucre calor, la capacidad antioxidante de esta planta aumentaría.

5.4. Síntesis de nanopartículas de plata

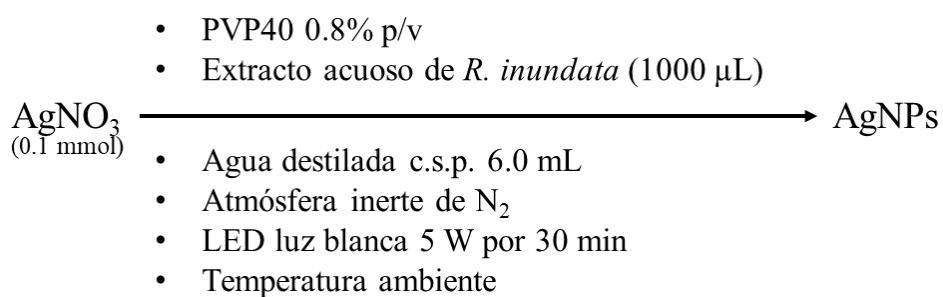


Figura N° 10: Condiciones iniciales de la síntesis de AgNPs. Fuente: Elaboración propia.

El presente estudio se inició con la elección de las condiciones iniciales para la síntesis de AgNPs. Estas condiciones fueron seleccionadas tomando como base la información publicada en diferentes fuentes científicas (36-41) y la experiencia previa de los docentes asesores.

La síntesis biológica (biosíntesis) de AgNPs se realizó empleando el extracto acuoso obtenido de la decocción de las partes aéreas de *R. inundata* (1000 μ L), AgNO_3 (17 mg, 0.1mmol) como fuente de iones plata, y PVP40 (1250 μ L de solución PVP40 al 4% p/v) como estabilizante, agua desmineralizada cantidad suficiente para 6.0 mL, atmósfera inerte de N_2 (burbujeo por 5 minutos), y como fuente de irradiación se empleó luz LED blanca de 5W por 30 minutos. La figura 11 muestra las imágenes de los resultados obtenidos bajo las condiciones anteriormente detalladas.

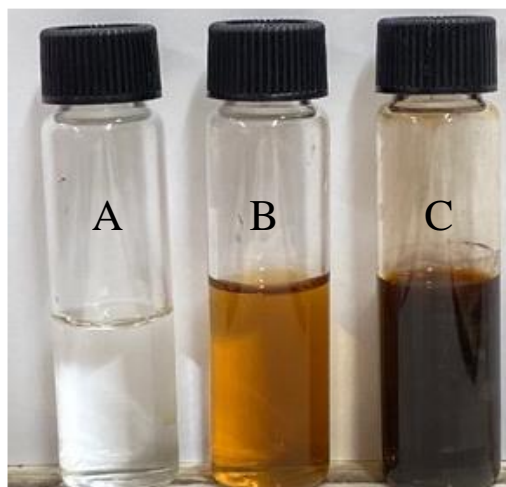


Figura N° 11: Fotografía del sistema de reacción. (A) Solución de AgNO_3 , (B) mezcla de reacción antes de irradiar y (C) mezcla de reacción después de la irradiación. Fuente: Elaboración propia.

Tal como puede observarse en las imágenes de la figura 11, al inicio (figura N° 11B) la mezcla de reacción presentaba un color amarillo el cual se atribuye al extracto de la planta empleado, después del tiempo de irradiación se observó un cambio en el color de la solución a un tono café oscuro (figura N° 11C) lo cual nos confirma la posible presencia de AgNPs.

Este resultado nos corrobora que se ha llevado a cabo la reducción de los iones Ag^+ (foto-reducción). Para corroborar la formación de las AgNPs se midió el espectro de absorción de esta mezcla de reacción obteniendo el espectro de la figura N° 12, donde se observa una banda de absorción a 444 nm lo cual está en concordancia con el espectro de absorción reportado para AgNPs en bibliografía científica previamente publicada (37). Además, se incluye el espectro de absorción de la mezcla de reacción antes de irradiar donde se corrobora que antes de la irradiación no se tenía la presencia de AgNPs.

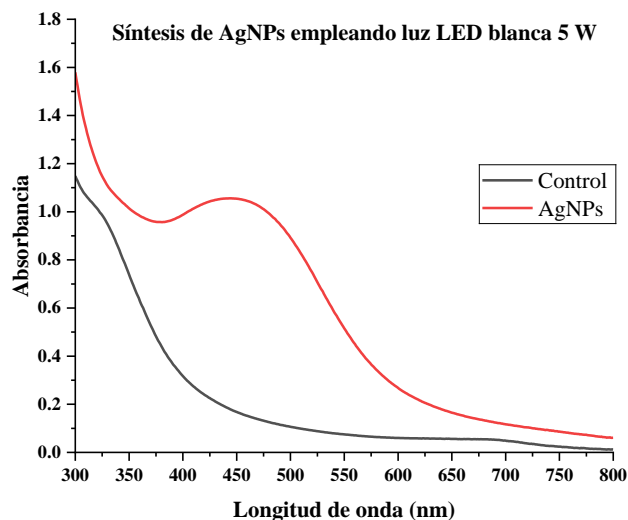


Figura N° 12: Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs en las condiciones iniciales. Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente con este resultado preliminar se procedió a optimizar las condiciones para la síntesis biológica de AgNPs, modificando las condiciones iniciales (Figura 10) con el fin de obtener mejores resultados.

A continuación, se optimizó el procedimiento para realizar el extracto acuoso de *R. inundata*: Maceración asistida por ultrasonido durante 30 minutos, maceración asistida por ultrasonido durante 1 hora y 30 minutos y decocción durante 20 minutos. Los resultados obtenidos se detallan en la figura 13.

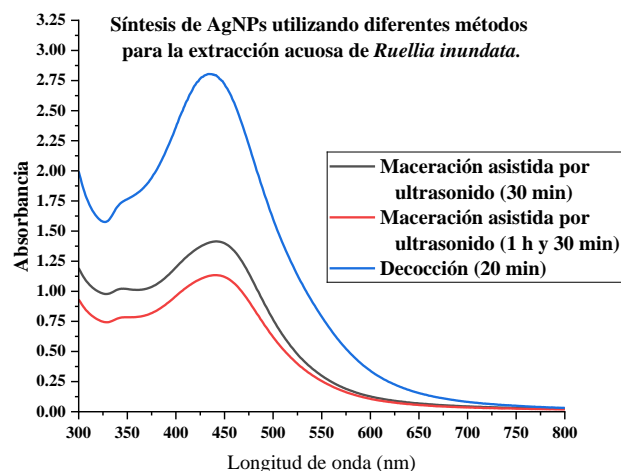


Figura N° 13: Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs. Optimización del tipo de extracción acuosa de *Ruellia inundata* para la reacción. Fuente: Elaboración propia.

Con base a los resultados obtenidos el mejor de los tres métodos de extracción probados fue la extracción por decocción durante 20 minutos ya que fue la que mostró una mayor intensidad en la banda de absorción a 435 nm de las AgNPs formadas (Figura N° 13).

Posteriormente, se optimizó la fuente de irradiación, utilizando diferentes tipos de fuentes LEDs. Los resultados obtenidos se detallan en la figura N° 14.

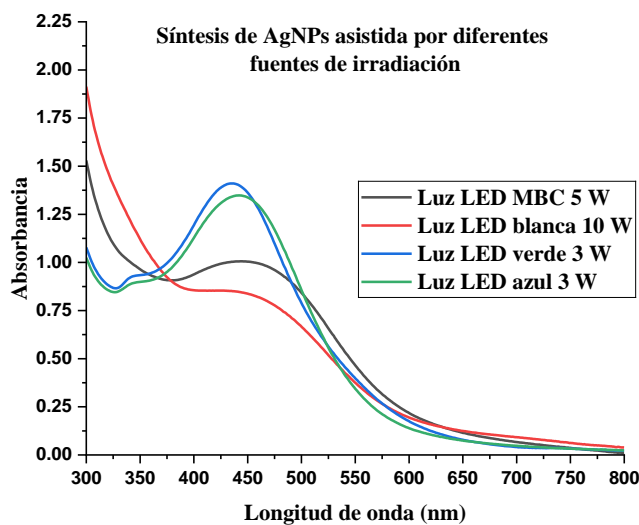


Figura N° 14: Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPS optimización de la fuente de irradiación. Fuente: Elaboración propia.

Con base a los resultados, la luz LED azul de 3W y luz LED verde de 3W se consideran fuentes adecuadas para irradiar el sistema de reacción, para el presente estudio se decidió optar por la luz LED azul de 3W (Figura N° 14).

A continuación, se optimizó la cantidad de extracto acuoso de la especie vegetal, para esto se probaron diferentes volúmenes del extracto a adicionar en los viales para la síntesis de AgNPs. Sabiendo que los metabolitos presentes en el extracto de la planta juegan un papel importante en la reducción de iones metálicos, además, estos pueden actuar como agentes de recubrimiento y estabilizar las AgNPs; se ha demostrado en otras investigaciones que los grupos funcionales tales como los grupos hidroxilos y carbonilo juegan un papel crucial en la formación y estabilización de las NPs metálicas (18). Los resultados obtenidos en esta prueba se detallan en la figura N° 15.

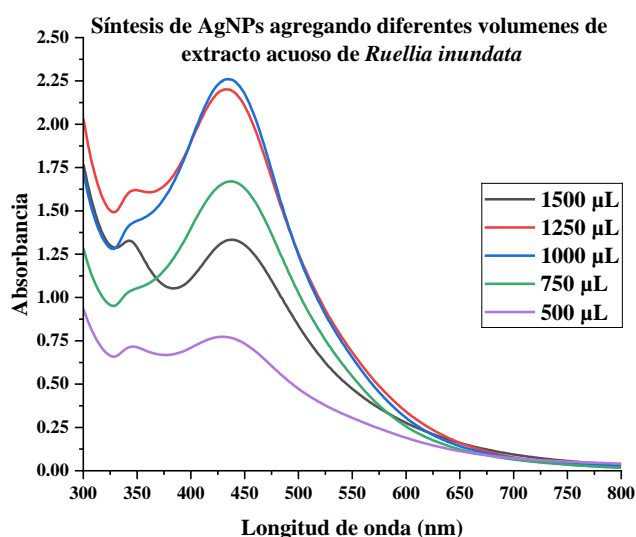


Figura N° 15: Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs optimizando el volumen necesario del extracto acuoso de las partes aéreas de *Ruellia inundata* para la reacción. Fuente: Elaboración propia.

De los resultados obtenidos se puede observar que la diferencia entre agregar 1250 µL y 1000 µL del extracto de la planta no fue significativo (Figura N° 15), por lo tanto, se mantuvo el volumen del extracto en 1000 µL para los posteriores ensayos.

Posteriormente, se probaron diferentes tipos de estabilizantes, desde origen animal como los quitosanos, vegetal como el almidón de maíz y sintéticos como la carboximetilcelulosa, PVP-K30 y el PVP40. La función del estabilizante es prevenir aglomeraciones entre las AgNPs, controlando al mismo tiempo el tamaño y forma de estas (45).

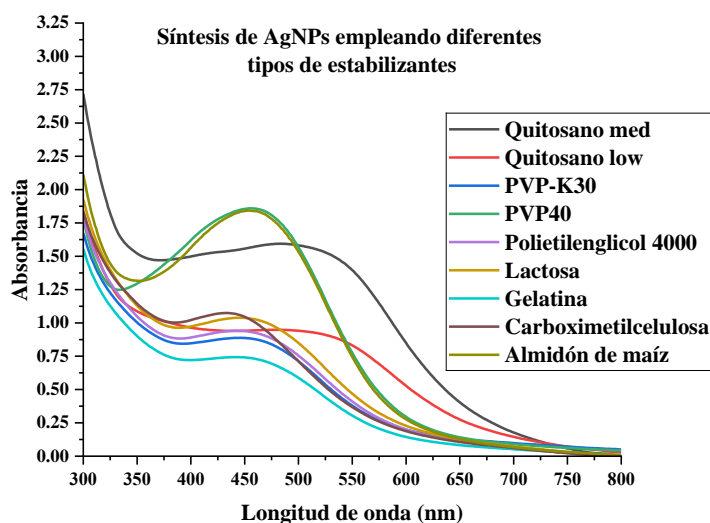


Figura N° 16: Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs utilizando diferentes tipos de estabilizantes. Fuente: Elaboración propia.

De los nueve estabilizantes ensayados, el almidón de maíz y el PVP40 fueron los que mostraron mejores resultados. Pese a ello, se optó por utilizar PVP40 debido a su estabilidad, ya que el almidón de maíz se observaba que se floculaba la solución final pasada unas horas de la reacción además se sabe que el almidón tiene susceptibilidad a contaminación microbiana en soluciones acuosas (49).

Siguiendo con nuestro estudio, se procedió a optimizar el tiempo de reacción, ya que este puede determinar en gran medida la concentración en la que se obtiene la formación de las AgNPs. Los resultados obtenidos se expresan en la figura N° 17.

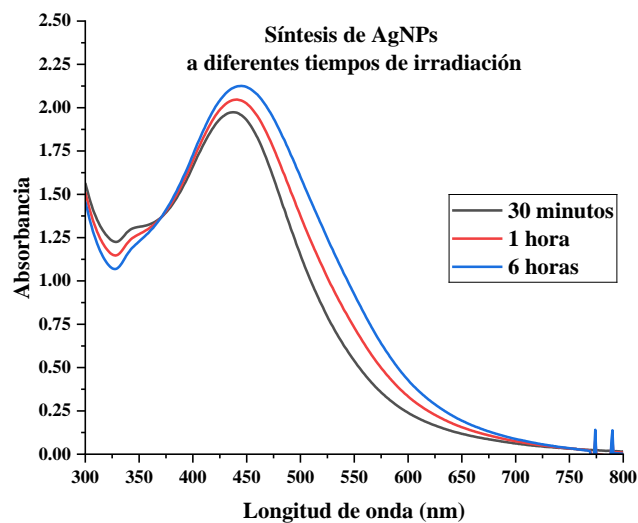


Figura N° 17: Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs a diferentes tiempos de irradiación.
Fuente: Elaboración propia.

Conforme a los resultados, se optó por irradiar 1 hora, ya que la muestra no presentó cambios significativos en la intensidad de la banda de absorción de las AgNPs al ser irradiadas por 1 o 6 horas, seleccionando 1 h de reacción se reduce el gasto energético del sistema (Figura N° 17).

A continuación, se estudió el comportamiento del sistema de reacción al no utilizar el estabilizante, esto nos permitirá corroborar si los metabolitos presentes en el extracto pueden ejercer la función de estabilizar las AgNPs, previniendo así la aglomeración de estas y su precipitación (45). Además, se probó en condiciones aeróbicas. Los resultados se detallan en la figura N° 18.

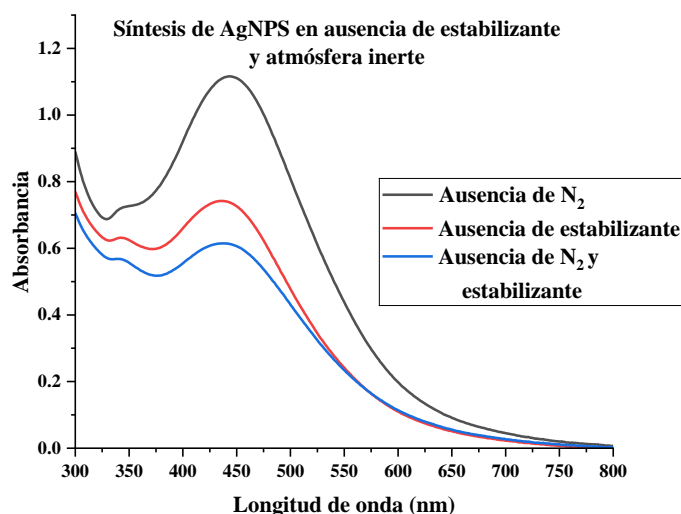


Figura N° 18: Espectro UV-Vis de la síntesis de AgNPs en ausencia de estabilizante y de la atmósfera inerte. Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo con los resultados, en la figura N° 18 las bandas de absorción obtenidas fueron las esperadas para las AgNPs, sin embargo, se observó una síntesis poco efectiva de nanopartículas, ya que la intensidad de la banda observada era menor a la obtenida en experimentos previos, además se observó la formación de un espejo de plata en las paredes del frasco de reacción lo cual evidencia la reducción de los iones plata pero al no estar adecuadamente estabilizadas se aglomeraban hasta formar un espejo de plata, esto nos demostró que si es necesario la adición de un agente estabilizante para mejorar la eficiencia de la síntesis de las NPs.

Respecto a la ausencia de la atmósfera inerte, se analizó el comportamiento de las AgNPs en un ambiente aeróbico, este experimento nos permitió denotar que la ausencia de N₂ no afectaba la obtención de las AgNPs, eliminar la necesidad de una atmósfera inerte de nitrógeno facilita el diseño del sistema de reacción (Figura N° 18).

Una vez finalizadas las reacciones de optimización, podemos concluir que las condiciones optimizadas para la síntesis de AgNPs serían las siguientes (figura 19):

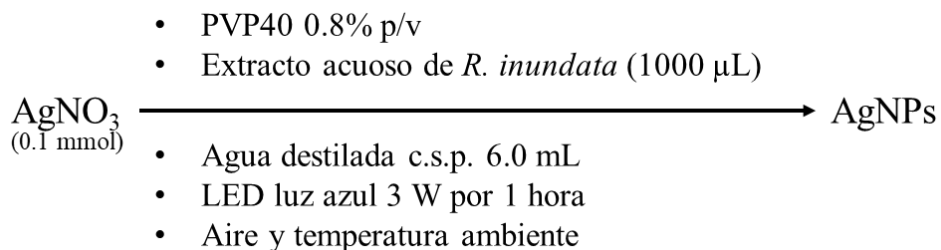


Figura N° 19: Condiciones optimizadas para la biosíntesis de AgNPs. Fuente: Elaboración propia.

5.4.1. Escalado de la reacción de biosíntesis de AgNPs y empleo de la luz solar

Una vez optimizadas las condiciones para la biosíntesis de AgNPs, se escaló el sistema a 10 veces más el volumen de las proporciones utilizadas en el esquema de la figura N° 19, en esta reacción se empleó luz solar como fuente de irradiación, debido a que la luz solar se considera una fuente de irradiación limpia, económica y abundante, disminuyendo los costos y la contaminación del uso de la electricidad, ya que se considera una energía de tipo renovable y favorece el diseño de sistemas de reacción más sustentables y amigables con el medio ambiente (46-48).

El uso del extracto de una planta en combinación de la luz solar favorece la producción de AgNPs de una manera más verde y biocompatible, siendo útiles para aplicaciones en los campos de la medicina, la farmacia, y la cosmética.

El resultado del uso de luz solar como fuente de irradiación para la síntesis de AgNPs en el escalado de la reacción se observa en la figura N° 20a, demostrando que es posible sintetizar NPs empleando este tipo de fuente de luz, volviéndolo una alternativa sustentable y con cumplimiento de los principios de química verde para futuras investigaciones respecto a las AgNPs.

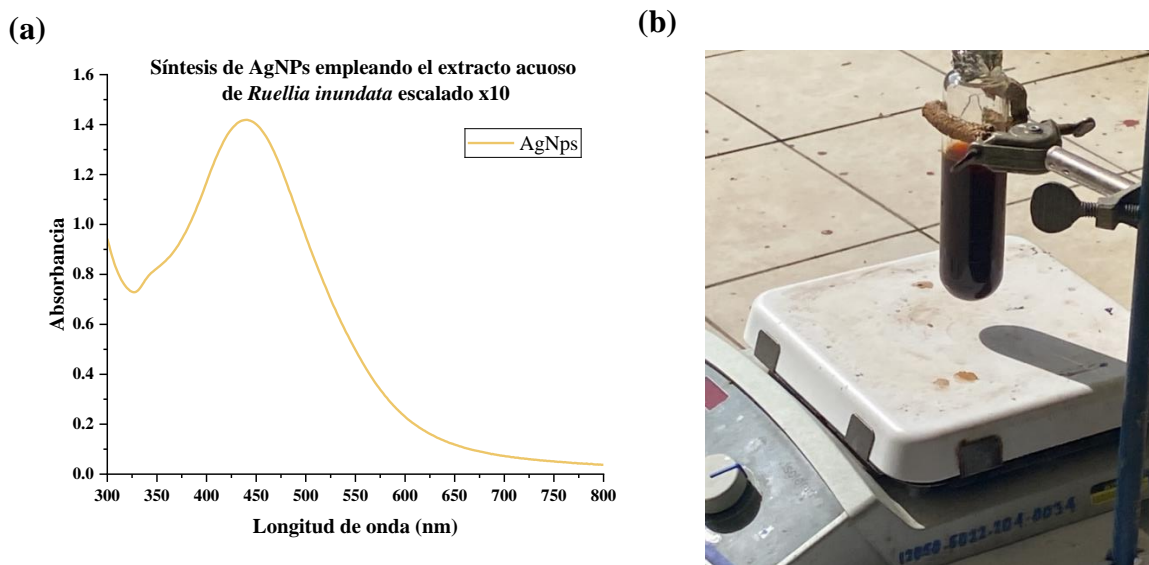


Figura N° 20: (a) Espectro UV-Vis de la síntesis optimizada de AgNPs empleando *R. inundata* irradiando con luz solar. (b) Sistema de síntesis de AgNPs escalado. Fuente: Elaboración propia.

5.5. Caracterización de nanopartículas de plata

La caracterización de las AgNPs es una etapa fundamental para comprender y controlar la síntesis, así como conocer las aplicaciones posteriores que se les pueden atribuir. La espectrofotometría de luz UV-Vis es una de las técnicas más utilizadas para caracterizar AgNPs debido a su rapidez y sencillez. (16).

A lo largo de toda esta pasantía, la producción de AgNPs se monitoreo empleando un espectrofotómetro UV-Vis GENESYS 10S. Para esto, el espectro de absorción de las AgNPs se midió en el rango de 300 a 800 nm. La figura N° 21 muestra el espectro de absorción de las AgNPs en las condiciones optimizadas en esta pasantía, donde podemos observar que se forma una banda de absorción entre los 400 a 500 nm con un máximo de absorción a 443 nm, la cual es característica de la síntesis de AgNPs y que ya ha sido reportado en trabajos científicos previos (17,19, 36-38).

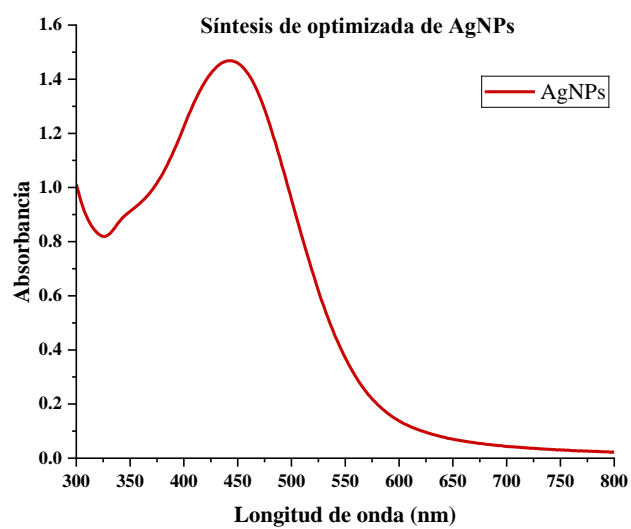


Figura N° 21: Espectro UV-Vis de la síntesis optimizada de nanopartículas de plata empleando *R. inundata*. Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO VI

6.0. CONCLUSIONES

1. La recolección e identificación de *Ruellia inundata* se realizó con éxito, asignándole un número de voucher “GC 5813”; Siendo útil como referencia para futuras investigaciones, facilitando su replicabilidad y seguimiento de la especie vegetal, asegurando que toda la información esté vinculada y sea accesible para cualquier estudio. Además, esta especie se encuentra fácilmente en nuestra flora salvadoreña, por lo que facilita su estudio a futuro.
2. Se realizó por primera vez el análisis fitoquímico del extracto acuoso de las partes aéreas de *Ruellia inundata*, determinando la presencia de flavonoides, cumarinas, terpenoides y taninos. Los metabolitos secundarios encontrados son beneficiosos para la salud humana y de acuerdo con bibliografíaa presentan efectos antioxidantes y antiinflamatorios, característico de las especies de la familia Acanthaceae.
3. La actual investigación se considera como el primer reporte en cuanto a la actividad antioxidante de *R. inundata*. Aunque el análisis fitoquímico presentara grupos de metabolitos secundarios que se consideran antioxidantes, el extracto acuoso de *R. inundata* obtuvo un valor $IC_{50} > 450.0 \mu\text{g/mL}$, por lo que, no presenta una marcada actividad antioxidante a las concentraciones analizadas.
4. En la actual investigación se optimizaron las condiciones de síntesis de AgNPs partiendo de datos experimentales previamente publicados. Obteniendo un sistema que emplea PVP40 como estabilizante, el extracto acuoso de *Ruellia inundata* Kunth, c.s.p. de agua destilada, la fuente de irradiación utilizada es LED luz de color azul 3 W en condiciones de aire y temperatura ambiente.
5. Se empleo exitosamente el extracto acuoso de *Ruellia inundata* como fotocatalizador de la síntesis de nanopartículas de plata. Además, se logró desarrollar una metodología que no hace uso de una atmósfera inerte para llevar a cabo el proceso de reducción de los iones plata lo cual es beneficioso ya que el sistema de reacción funcionó en condiciones aérobicas, por otra parte, el sistema de reacción también fue eficiente cuando se empleó luz solar como fuente de irradiación.

6. La especie vegetal *Ruellia inundata* Kunth posee diversos metabolitos secundarios con múltiples grupos funcionales que favorecen su uso como agentes reductores para la obtención y síntesis de nanopartículas de plata, el uso de estos extractos se considera amigable con el medioambiente ya que se evita el uso de sustancias químicas sintéticas adicionales.

7. Se caracterizaron las AgNPs sintetizadas haciendo uso del espectrofotómetro UV-Vis, ya que estas presentan una banda de absorción característica entre 400 y 500 nm debido al fenómeno de resonancia del plasmón, confirmando la formación de AgNPs.

CAPÍTULO VII

7.0. RECOMENDACIONES

1. Realizar una descripción botánica detallada por parte de los botánicos a cargo de la recolección e identificación en investigaciones futuras.
2. Seguir estudiando la familia Acanthaceae en la búsqueda de especies vegetales con potenciales aplicaciones etnobotánicas, fitoquímica y usos en otras áreas de la ciencia.
3. Para complementar la información de la especie *Ruellia inundata*, se recomienda realizar estudios de toxicidad y analizar el contenido de metales pesados, minerales y oligoelementos, sirviendo a la vez como parámetro de la calidad del suelo y uso de pesticidas donde se recolecte la muestra vegetal.
4. Complementar el estudio de la actividad antioxidante de *Ruellia inundata* utilizando métodos de extracción y condiciones diferentes a este estudio, además, determinaciones como contenido de fenoles y flavonoides totales.
5. Para investigaciones futuras, se recomienda llevar a cabo estudios de robustez estadística del método de cuantificación de la actividad antioxidante por espectrofotometría UV-Vis empleando el método de DPPH, con el fin de identificar posibles variaciones frente a diversos factores, tales como: pH, temperatura, exposición a la luz, tiempos de disolución y tiempos de reacción.
6. En la síntesis de nanopartículas se recomienda optimizar otros factores críticos como el pH, otros tipos de estabilizantes, extractos acuosos de diferentes plantas, el uso de otros metales tales como oro, cobre o platino y el control de la temperatura. Estos parámetros son cruciales para obtener nanopartículas con propiedades específicas y estables.
7. Explorar las aplicaciones de las nanopartículas de plata utilizando el extracto acuoso de *Ruellia inundata* en áreas tales como la medicina, la biotecnología, la farmacia y la cosmética, ya que se sabe que las AgNPs poseen propiedades catalíticas, bactericidas y antibacterianas lo que las hacen especialmente útil en estos campos.

8. Caracterizar las nanopartículas de plata con otros métodos y equipos como el microscopio electrónico de barrido, infrarrojo, microscopio electrónico de transmisión, entre otros.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Centro cultural de España en El Salvador. Paisajes verdes. Flora silvestre y reforestación en El Salvador. [Lugar]: [editor], [Consultado 4 Jun 2024]. Disponible en: <https://www.ccesv.org/evento/paisajes-verdes-flora-silvestre-y-reforestacion-en-el-salvador/#:~:text=La%20flora%20incluye%20caoba%2C%20cedro,árboles%20frutales%20y%20plantas%20medicinales>
2. Villanueva R, Et. al. Sinopsis de la familia Acanthaceae en el Perú. RFP. 2019 [Consultado 4 Jun 2024]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Rosa-Villanueva-2/publication/334187445_Sinopsis_de_la_familia_Acanthaceae_en_el_Peru/links/5d1c28dd92851cf44060283a/Sinopsis-de-la-familia-Acanthaceae-en-el-Peru.pdf
3. Khan I. Et al. Etnobotany and medicinal uses of folklore medicinal plantas belonging to family Acanthaceae: An updated review. MOJ biol. med. 2017 [Consultado 4 Jun 2024]. Disponible en: <https://medcraveonline.com/MOJBM/MOJBM-01-00009.pdf>
4. Royal Botanic Gardens. *Ruellia* Plum. Ex L. [Consultado 4 Jun 2024]. Disponible en: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:326011-2/general-information>
5. Samy MN. Et al. CHEMICAL CONSTITUENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF GENUS RUELLIA. IJP. 2015 [Consultado 5 Jun 2024]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Mamdouh-Samy/publication/280114487_Chemical_Constituents_and_Biological_Activities_of_Genus_Ruellia/links/55aad3b08ae481aa7fbcc72/Chemical-Constituents-and-Biological-Activities-of-Genus-Ruellia.pdf?sg%5B0%5D=started_experiment_milestone&origin=journalDEtail&rtd=e30%3D
6. Sánchez HL. Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. RDU. 2022 [Consultado 5 Jun 2024]. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/hevila/Revistadigitaluniversitaria/2022/vol23/no2/2.pdf>

7. García AA. Et al. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). 2009 [Consultado 5 Jun 2024]. Disponible en: <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/26b94db5-92de-4aaf-8822-8f063c180904/content>
8. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda edición. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
9. Hernández SF. Análisis fitoquímico y determinación de metales pesados, minerales y oligoelementos, en plantas medicinales comercializadas en el mercado central de San Salvador [Tesis]. [San Salvador (El Salv.)]: Universidad de El Salvador; 2017. Figura 5, Técnica de cromatografía en capa fina; p. 42.
10. Kuklinski C. Capítulo 5: Métodos generales de obtención de los principios activos. En: [Editor]. Farmacognosia. [Edición]. Barcelona: Ediciones Omega; 2000. p. 32-41.
11. Flores KC. Et al. Análisis fitoquímico preliminar de los extractos orgánicos de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima* de la familia Celastraceae pertenecientes a la flora salvadoreña [Tesis]. [San Salvador (El Salv.)]: Universidad de El Salvador; 2017. Figura 24, Cromatografía de capa fina; p. 64.
12. Gálvez AM., Zaldaña JD. Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH en diez frutos de especies vegetales pertenecientes a la flora salvadoreña [Tesis]. [San Salvador (El Salv.)]: Universidad de El Salvador, 2020. Capítulo 3, marco teórico; p. 26-48.
13. Joachin EA. Determinación de la actividad antioxidante y fenoles totales en el Kino de *Eucalyptus citriodora* (Myrtaceae) [Tesis]. [San Salvador (El Salv.)]: Universidad de El Salvador, 2020. Capítulo 3, marco teórico; p. 26-70.

14. Kedare SB. Et al. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011 [Consultado 10 Jun 2024]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-011-0251-1>
15. Araújo Montoya JE, Chávez Cuéllar FV. Estudio de la actividad antioxidante de especies de la flora salvadoreña: *O. veraguensis*, *N. martinicensis*, *P. americana* y *C. arábica* [Tesis]. [San Salvador (El Salv.)]: Universidad de El Salvador, 2023. [Consultado 10 Jun 2024]. Disponible en: <https://oldri.ues.edu.sv/id/eprint/30856/1/DOCUMENTO%20FINAL%20G33-22.pdf>
16. Sánchez M. Nanopartículas de plata: preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos [Tesis maestría]. [Juárez, CDMX (Mex.)]: Universidad Nacional de Educación a Distancia. Capítulo 1; Capítulo 4, Técnicas de caracterización de las AgNPs; p 4-11, p. 32-34.
17. Gómez M. Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Repert. Med. Cir.* 2018 [Consultado 12 Jun 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.31260/RepertMedCir.v27.n2.2018.191>
18. Singh P. Et al. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends Biotechnol.* 2016 [Consultado 12 Jun 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>
19. Hassan AA. Et. al. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Biomedical Applications. In *Handbook of Green and Sustainable Nanotechnology: Fundamentals, Developments and Applications*, Shanker, U., Hussain, C. M., Rani, M. Eds.; Springer International Publishing, 2023; pp 47-71.
20. Cardoso PC. Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños (B. Aires).* 2016 [Consultado 13 Jun 2024].

Disponible en: <http://revistapediatria.com.ar/wp-content/uploads/2016/04/260-Nanopart%C3%ADculas-de-plata.pdf>

21. Magoni, C., Bruni, I., Guzzetti, L., Regonesi, M. E., Sangiovanni, E., Dell'Agli, M., & Labra, M. (2015). Coffee pulp waste as a source of antioxidant phytocomplexes. Expo Milano Nutrire Il Pianeta Energia per La Vita.
22. Afzal K. Et al. Genus *Ruellia*: pharmacological and phytochemical importance in ethnopharmacology. Acta Pol. Phar. 2015 [Consultado 4 Jul 2024]. Disponible en: https://ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2015/5/821.pdf
23. Nijveldt RJ. Et al. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. 2018 [Consultado 11 Jul 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>
24. Limón D. Et al. Flavonoides: Mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. 2010 [Consultado 11 Jul 2024]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Liliana-Mendieta/publication/259344548_LOS_FLAVONOIDES_MECANISMO_DE_ACCION_NEUROPROTECCION_Y_EFECTOS_FARMACOLOGICOS/links/0c96052b1e26d58038000000/LOS-FLAVONOIDES-MECANISMO-DE-ACCION-NEUROPROTECCION-Y-EFECTOS-FARMACOLOGICOS.pdf
25. Rathee P. Et al. Mechanism of Action of Flavonoid as Anti-inflammatory Agents: A review. Inflamm Allergy & Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued). 2009 [Consultado 11 Jul 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/187152809788681029>

26. Haslam E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J. Nat. Prod.* 1996 [Consultado 11 Jul 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/np960040+>
27. Cintli Martínez-Ortíz-De-Montellano. Mecanismos de acción de las plantas ricas en taninos sobre la población adulta de nematodos gastrointestinales de los pequeños rumiantes. *Animal biology*. Institut National Polytechnique de Toulouse – INPT; Universidad autónoma de Yucatán (Mérida, México), 2010. Español. NNT: 2010INPT0085.
28. Olivas-Aguirre FJ. Et al. Taninos hidrolizables: bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutr Hosp.* 2015 [Consultado 11 Jul 2024]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/264237320_Taninos_hidrolizables_bioquimica_aspectos_nutricionales_y_analiticos_y_efectos_en_la_salud
29. Wu L. Et al. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. *Curr Med Chem.* 2009 [Consultado 11 Jul 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/092986709789578187>
30. Garg S.S. Et al. An insight into the therapeutic applications of coumarin compounds and their mechanisms of action. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2020 [Consultado 12 Jul 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105424>
31. Graßmann J. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam Horm.* 2005 [Consultado 12 Jul 2024]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S008367290572015X>
32. Hortelano S. Molecular basis of the anti-inflammatory effect of terpenoids. *Inflamm Allergy-Drug Targets Former Curr Drug Targets-Inflamm Allergy (Discontinued)*. 2009 [Consultado 12 Jul 2024]. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/iadt/2009/00000008/00000001/art00006>

33. Yang W. Et al. Advances in pharmacological activities of terpenoids. Nat. Prod. Commun. 2020 [Consultado 12 Jul 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1934578X20903555>
34. López T. Et al. Estudio fitoquímico, actividad antioxidante y toxicidad sobre *Artemia salina* de los extractos de las hojas de *Justicia secunda* Vahl. (Acanthaceae), recolectada en Mérida-Venezuela. Rev Colomb Cienc Quím-Farm. 2022 [Consultado 19 Jul 2024]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v51n1/1909-6356-rccqf-51-01-213.pdf>
35. Gómez Casco L. Et al. Actividades genotóxica y antioxidante del extracto etanólico de flores de *Mangifera indica* L. evaluadas mediante el método de captura del radical DPPH● y detección de alteraciones nucleolares en células meristemáticas de *Allium cepa* L. Steviana. Copyright, 2019 [Consultado 19 Jul 2024]. Disponible en: https://www.facen.una.py/wp-content/uploads/2021/05/Steviana-11-2_online.pdf#page=58
36. Sinha SN. Et al. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Andrographis paniculata* leaf extract and evaluation of their antibacterial activities. Spectrosc Lett. 2015 [Consultado 24 Jul 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/00387010.2014.938756>
37. Palithya S. Et al. Biofabrication of silver nanoparticles by leaf extract of *Andrographis serpyllifolia* and their antimicrobial and antioxidant activity. Int J Nano Dimens. 2018 [Consultado 24 Jul 2024]. Disponible en: https://journals.iau.ir/article_660764_94e13abc62f03aebdf05859f4c0e4561.pdf
38. Madhankumar R. Et al. Antibacterial and larvicidal activity of silver nanoparticles synthesized by the leaf extract of *Andrographis serpyllifolia* Wight. J Clust Sci. 2020 [Consultado 24 Jul 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01679-5>

39. Kuppurangan G. Et al. Biogenic synthesis and spectroscopic characterization of silver nanoparticles using leaf extract of *Indoneesiella echioides*: in vitro assessment on antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity potential. *Appl Nanosci.* 2016 [Consulta 24 Jul 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0514-7>
40. Bose D. Et al. Antibacterial activity of green synthesized silver nanoparticles using Vasaka (*Justicia adhatoda* L.) leaf extract. *Indian J Microbiol.* 2015 [Consultado 24 Jul 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0512-1>
41. Kudle KR. Et al. Investigation on the cytotoxicity of green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Justicia adhatoda* leaves on human epitheloid carcinoma cells and evaluation of their antibacterial activity. *Int J Drug Dev Res.* 2014 [Consultado 24 Jul 2024]. Disponible: https://www.researchgate.net/profile/Ramchander-Merugu/publication/287412945_Investigation_on_the_Cytotoxicity_of_Green_Synthesis_and_Characterization_of_Silver_nanoparticles_using_Justicia_adhatoda_Leaves_on_human_epitheloid_carcinoma_cells_and_evaluation_of_their_antibacteri/links/5dbedec44585151435e348ac/Investigation-on-the-Cytotoxicity-of-Green-Synthesis-and-Characterization-of-Silver-nanoparticles-using-Justicia-adhatoda-Leaves-on-human-epitheloid-carcinoma-cells-and-evaluation-of-their-antibacteri.pdf
42. Jeyaraj M. Et al. An investigation on the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using *Podophyllum hexandrum* on human cervical carcinoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013 [Consultado 24 Jul 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.09.042>
43. Flores CY. Nanopartículas con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida [Tesis]. [Buenos Aires (Arg.)]: Universidad Nacional de la Plata, 2014. Capítulo 2: Técnicas fisicoquímicas de caracterización; p. 23-49.

44. Mbopi P.Y. Et al. Chemical constituents, total phenolic contec, antioxidante activity and bactericidal effect of *Dicliptera verticillate* (Acanthaceae). South Afr J Bot. 2021 [Consultado 4 Ago 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.07.001>
45. Oroz M.M. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. An Quím RSEQ. 2009 [Consultado 19 Ago 2024]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2931286>
46. Nocera D.G. On the future of global energy. Dedalus. 2006 [Consultado 19 Ago 2024]. Disponibles: <https://www.jstor.org/stable/20028080>
47. Lewis N.S. Toward cost-effective solar energy use. Science. 2007 [Consultado 19 Ago 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1137014>
48. Morton O. Solar Energy: A new day dawning?. Silicon Valley sunrise. Nature. 2006 [Consultado 19 Ago 2024]. Disponible en: <https://rdcu.be/dRDom>
49. Rowe R. Et al. Handbook of pharmaceutical excipients. 6th edition pharmaceutical press. Lond Engl. 2009. Pág 685-691

ANEXOS

ANEXO N° 1:
TABLAS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS
DE PLATA

Tabla N° 7: Curva de calibración de ácido ascórbico en el ensayo antioxidante. Fuente: Elaboración propia.

Concentración final (μM)	Concentración ácido ascórbico utilizado (μM)	Alícuota de la solución de trabajo (μL)	Alícuota de agua bidestilada (μL)	Volumen total (μL)
600	5000	600	4400	5000
400	5000	400	4600	5000
200	5000	200	4800	5000
100	200	2500	2500	5000
50	100	2500	2500	5000
25	50	2500	2500	5000
5	25	1000	4000	5000

Tabla N° 8: Diluciones del extracto acuoso de *R. inundata* 1:10 g/mL (Solución madre). Fuente: Elaboración propia.

Concentración (mg/mL)	Alícuota de la solución madre (μL)	Alícuota de agua bidestilada (μL)	Volumen total
0	15	4985	5000
0.3	75	4925	5000
1.5	150	4850	5000
3	300	4700	5000
6	450	4550	5000

Tabla N° 9: Estudio de fuente de irradiación. (+++) Muy evidente, (++) Evidente, (+), ligeramente evidente. *Las nanopartículas de plata precipitaron en el vial. Fuente: Elaboración propia.

Entrada	Estabilizante	Extracto acuoso	Solución de AgNO ₃	Atmosfera saturada de N ₂	Fuente de irradiación	Resultado
1	X	X	X	X	Luz cálida LED 5 W	+
2	X	X	X	X	Luz fría LED 5 W	+
3	X	X	X	X	Luz blanca LED 10 W	++

4	X	X	X		Luz blanca LED 10 W	++
5		X	X		Luz blanca LED 10 W	++*
6	X	X	X	X	Luz azul 3 W	+++
7	X	X	X		Luz azul 3 W	+++
8		X	X		Luz azul 3 W	++*
9	X	X	X	X	Luz verde 3 W	+++
10	X	X	X		Luz verde 3 W	+++
11		X	X		Luz verde 3 W	++*

ANEXO N° 2:
DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS.

Tabla N° 10: Datos experimentales de la curva de calibración utilizando ácido ascórbico. Fuente:
Elaboración propia.

Concentración (μM)	A 1	A 2	A 3	Promedio	Desviación estándar	CV (%)
600	0.218	0.211	0.205	0.211	0.007	3.079
400	0.436	0.459	0.448	0.448	0.012	2.570
200	0.683	0.693	0.674	0.683	0.010	1.391
100	0.777	0.799	0.778	0.785	0.012	1.583
50	0.832	0.874	0.853	0.853	0.021	2.462
25	0.865	0.895	0.863	0.874	0.018	2.050
5	0.885	0.912	0.890	0.896	0.014	1.604
IC₅₀ (μM)	454.636	438.000	448.727	447.121	8.434	1.886
IC₅₀ (μg/mL)	80.071	77.141	79.030	78.747	1.485	1.886

- Para el estándar de ácido ascórbico

$$y = -0.0012x + 0.9054$$

Donde:

y= Absorbancia al 50% del DPPH, siendo 0.797 el 100%

x= IC₅₀ del estándar de ácido ascórbico

Despejamos “x” de la ecuación:

$$x = \frac{y - 0.9054}{-0.0012}$$

$$IC_{50} \text{ de ácido ascórbico} = \frac{0.399 - 0.9054}{-0.0012} = 422.00 \mu M = 422.00 \frac{\mu mol}{L}$$

$$IC_{50} \text{ de ácido ascórbico} = (422.00 \frac{\mu mol}{L}) (\frac{176.12 \times 10^6 \mu g}{1.0 \times 10^6 \mu mol}) (\frac{1 L}{1000 mL}) = 74.32 \mu g/mL$$

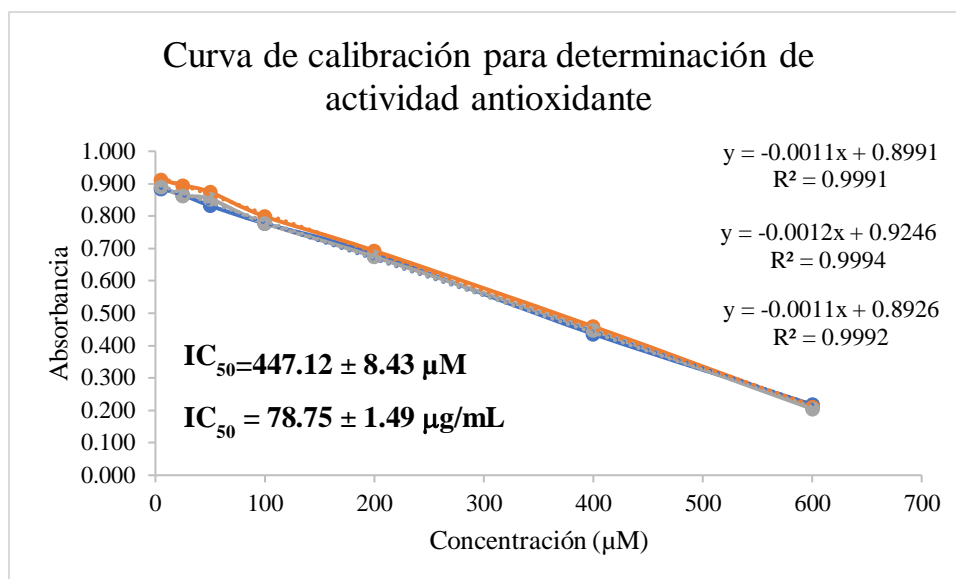


Figura N° 22: Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación de actividad antioxidante y el IC_{50} del ácido ascórbico. Fuente: elaboración propia.

Tabla N° 11: Porcentaje de rendimiento del extracto seco de *Ruellia inundata*. Fuente: Elaboración propia.

Repetición	Peso material vegetal (g)	Tara (g)	Tara + extracto seco (g)	Peso neto del extracto (g)	% De rendimiento
1	1.036	59.8256	59.9243	0.0987	9.87
2	1.048	60.1183	60.2109	0.0926	9.26
3	1.045	59.8482	59.9526	0.1044	10.44
4	1.054	59.948	60.0625	0.1145	11.45
5	1.007	59.9353	60.0439	0.1086	10.86
6	1.005	59.4001	59.502	0.1019	10.19
				PROMEDIO	10.345

El extracto acuoso fue preparado como en la sección 4.4.3.1. y fue llevado a sequedad bajo presión reducida en un equipo Genevac EZ-Plus durante 4 h a 40° C. Obteniendo los pesos netos del extracto seco indicado en la tabla N° 11.

Tabla N° 12: Datos experimentales de la cuantificación de la actividad antioxidante realizado a *Ruellia inundata*. Fuente: Elaboración propia.

Concentración (mg de planta/mL)	A RI1	A RI2	A RI3	Promedio	Desviación estándar	CV (%)
0	0.798	0.803	0.790	0.797	0.007	0.823
0.3	0.768	0.791	0.778	0.779	0.012	1.480
1.5	0.677	0.690	0.687	0.685	0.007	0.994
3	0.539	0.547	0.556	0.547	0.009	1.554
6	0.374	0.340	0.350	0.355	0.017	4.927
7.5	0.326	0.301	0.330	0.319	0.016	4.927
IC50 (mg/mL) Planta	5.834	5.875	5.593	5.767	0.153	2.648
IC50 (mg/mL) Extracto	0.604	0.608	0.579	0.597	0.016	2.648
IC50 (µg/mL) Extracto	603.537	607.809	578.559	596.635	15.799	2.648

- Para el extracto acuoso de la especie vegetal

Ejemplo utilizando la ecuación de la recta de las absorbancias 1:

$$y = -0.0657x + 0.7823$$

Donde:

y= Absorbancia al 50% del DPPH, siendo 0.797 el 100%

x= IC₅₀ planta

Despejamos “x” de la ecuación:

$$x = \frac{y - 0.7823}{-0.0657}$$

$$IC_{50} \text{ de planta} = \frac{0.399 - 0.7823}{-0.0657} = 5.834094368 \text{ mg planta/mL}$$

Sabiendo que el rendimiento del extracto acuoso de *Ruellia inundata* fue de 10.345%:

$$IC_{50} \text{ del extracto} = \left(5.834094368 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \left(\frac{103.45 \text{ mg extracto}}{1000 \text{ mg planta}} \right)$$

$$= 0.603537062 \text{ mg extracto/mL}$$

$$IC_{50} \text{ del extracto} = \left(0.603537062 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \right) = 603.5370624 \mu\text{g/mL}$$