

Influencia del método de obtención del extracto de perfolia de maíz en la biosíntesis de nanoestructuras de AgCl/Ag y fitotoxicidad en plántulas de *Latuca sativa* L. var. *longifolia*

YÑEZ-CRUZ, Maria Guadalupe†, VILLANUEVA-IBÁÑEZ, Maricela*, ÁLVAREZ-GARCÍA, Rocío, FLORES-GONZÁLEZ, Marco Antonio, TOVAR-JIMÉNEZ, Xochitl, CADENA-RAMÍREZ, Arturo y HERNÁNDEZ-PÉREZ, María de los Ángeles

Recibido 30 de Julio, 2017; Aceptado 29 de Agosto, 2017

Resumen

En la obtención de nanopartículas (NPs) por métodos verdes, los extractos de plantas han demostrado tener la capacidad de fungir como agentes reductores de varios iones debido a los metabolitos presentes en ellas. Las NPs a base de plata tienen mayores aplicaciones en la industria dadas sus propiedades antimicrobianas, lo que ha propiciado una rápida proliferación de éstas en el ambiente siendo necesario evaluar su impacto ya que las características fisicoquímicas de las NPs, dictadas en parte por su método de obtención, tienen estrecha relación con su actividad biológica y comportamiento en el medio. En este trabajo se estudió la influencia del método de obtención del extracto y el volumen del mismo, en la obtención de NPs de AgCl/Ag estables y dispersas, así como la evaluación de su toxicidad en *L. sativa*. Los resultados dieron a conocer que la manera en la que se extraen los metabolitos influye directamente en la capacidad de estabilización de las NPs. La adición de las mismas inhibió la germinación de semillas y completa formación de estructuras esenciales que les permitirá crecer y desarrollarse, tal efecto se atribuyó a la absorción y distribución de partículas en diferentes tejidos de la plántula.

Biosíntesis, Nanopartículas, *Lactuca sativa*, Ensayos in vitro

Abstract

In obtaining nanoparticles (NPs) by green methods, plant extracts have been shown to have the ability to function as reducing agents of various ions due to the metabolites present in them. The silver based NPs have greater applications in the industry due to their antimicrobial properties, which has led to a rapid proliferation of these in the environment, being necessary to evaluate their impact since the physicochemical characteristics of NPs, dictated in part by their method of obtaining, are closely related to their biological activity and behavior in the environment. In this work the influence of the extraction method and the volume of the extract was studied, in the production of stable and dispersed AgCl/Ag NPs, as well as the evaluation of its toxicity in *L. sativa*. The results showed that the way in which the metabolites are extracted directly influences the stabilization capacity of NPs. The addition of the same inhibited the germination of seeds and complete formation of essential structures that will allow them to grow and develop, such effect was attributed to the absorption and distribution of particles in different tissues of the seedling.

Biosynthesis, Extract, nanoparticles, *Lactuca sativa*, In vitro assays

Citación: YÑEZ-CRUZ, Maria Guadalupe†, VILLANUEVA-IBÁÑEZ, Maricela*, ÁLVAREZ-GARCÍA, Rocío, FLORES-GONZÁLEZ, Marco Antonio, TOVAR-JIMÉNEZ, Xochitl, CADENA-RAMÍREZ, Arturo y HERNÁNDEZ-PÉREZ, María de los Ángeles. Influencia del método de obtención del extracto de perfolia de maíz en la biosíntesis de nanoestructuras de AgCl/Ag y fitotoxicidad en plántulas de *Latuca sativa* L. var. *longifolia*. Revista de Ingeniería Biomédica y Biotecnología. 2017, 1-1: 20-25

* Correspondencia al autor (email: villanueva@upp.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor

Introducción

Las nanopartículas (NPs) a base de plata (Ag) son ampliamente requeridas debido a sus propiedades antimicrobianas (Silambarasan & Abraham, 2013), y sus métodos de obtención van desde los físicos hasta los químicos. En la agricultura se está investigando su uso en la conservación de frutos y para el control de plagas de insectos o como fungicida (Sekhon, 2014), dando lugar al contacto con cultivos de importancia, por lo que es vital estudiar su efecto sobre éstos. Un método alternativo de obtención de este tipo de partículas es la biosíntesis, donde el uso de extractos de plantas puede ser ventajoso sobre otros procesos biológicos que involucran el mantenimiento de cultivos celulares; no obstante, debido a la naturaleza compleja y vasta de los metabolitos presentes, es difícil identificar un único compuesto responsable de la formación de NPs. La interacción de biomoléculas tales como terpenos, ácidos orgánicos, quinonas, flavonoides, polisacáridos, proteínas y alcaloides da lugar al proceso de reducción de iones metálicos y estabilización de las NPs, donde se ha reportado que la disponibilidad de éstas es uno de los factores que interviene en la forma y tamaño de NPs obtenidas (Gan & Li, 2012). En este contexto, en el presente trabajo se estudió la formación de NPs mediante extractos de perfolia de maíz obtenidos por tres diferentes vías: infusión, decocción y molienda. Se eligió aquel que diera lugar a estructuras de tamaños nanométricos con las que se realizaron ensayos sobre su efecto en *L. sativa*, cultivo de importancia para la alimentación humana.

Metodología a desarrollar

Preparación de los extractos empleados en la biosíntesis de NPs

Para la obtención de los extractos se usaron hojas frescas (perfolia) de *Zea mays* que fueron adquiridas en un mercado local. Además del extracto crudo preparado como se indica en (Villanueva *et al.*, 2015), se prepararon extractos por infusión y decocción de las hojas donde el tiempo de reposo y cocción para ambos fue de 10 minutos. Todos los extractos obtenidos fueron filtrados con membrana de 0.45 μm y se almacenaron hasta su uso a 4°C.

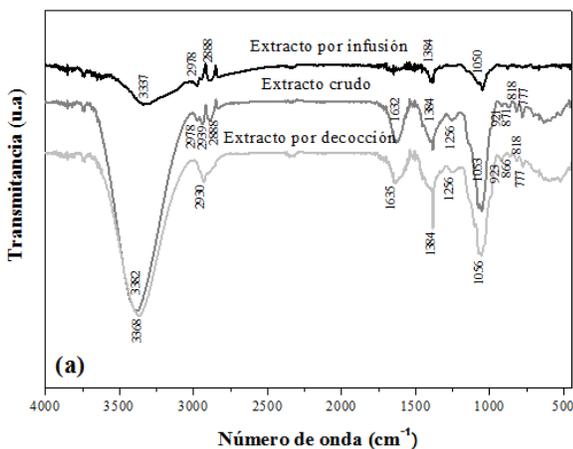
Biosíntesis de AgCl/Ag NPs

Se partió del protocolo establecido por Villanueva *et al.* (2015), donde la sal precursora utilizada fue nitrato de plata (AgNO_3) adquirida de *Sigma-Aldrich* y como disolvente se utilizó agua desionizada. La síntesis se efectuó al poner en contacto un volumen determinado de una solución de AgNO_3 con 5 mL de cada uno de los extractos preparados en 3 diferentes viales; el volumen final se ajustó con agua desionizada hasta obtener una concentración final de 2 mM de AgNO_3 en el medio. Los viales se mantuvieron bajo agitación constante a 25 °C, tomando muestras en intervalos de media hora durante 4h para dar seguimiento a la formación de NPs. Luego de realizar la caracterización de las NPs obtenidas se eligió el extracto que dio lugar a estructuras de menor tamaño, seguido del estudio del efecto de la variación de su volumen en la obtención de las NPs, empleando 1, 3, 5, 8 y 12 mL. Concluidas 4h de síntesis se recuperaron las partículas centrifugando a 8000 rpm durante 15 min y con lavados por triplicado al precipitado. Los precipitados se redispersaron en agua desionizada al volumen inicial para los posteriores experimentos.

Caracterización de los extractos y las AgCl/Ag NPs biosintetizadas.

Los extractos se caracterizaron cualitativamente mediante marcha fotoquímica para conocer el tipo de metabolitos presentes. La banda de absorción UV-Vis característica de las NPs de interés se identificó mediante la adquisición de los espectros correspondientes durante el transcurso de la síntesis en un espectrofotómetro Cole Parmer 2800. Se analizaron los tres diferentes extractos mediante espectroscopia FT-IR antes y después de realizada la síntesis con un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo System 2000, para la identificación de grupos funcionales presentes. El tamaño de partícula en suspensión se determinó empleando un analizador Nanotrak Wave. La morfología y la composición elemental de las partículas se observó mediante un microscopio marca JEOL JSM6701F equipado con un Espectrómetro de Energías Dispersivas de rayos X. La naturaleza cristalina del material se corroboró mediante un difractorómetro Bruker-D8 ($\text{CuK}\alpha=1.5406 \text{ \AA}$). Finalmente, la determinación de la concentración de Ag se realizó en un equipo de absorción atómica modelo Agilent 240FS AA.

Evaluación in vitro del efecto de las NPs biosintetizadas sobre la germinación de *L. sativa*.



Se emplearon semillas de *L. sativa* adquiridas con *Hydro Enviroment*, con un porcentaje de germinación conocido. Los ensayos se llevaron a cabo mediante los protocolos establecidos en las normas ISTA (2010), empleando soluciones *stock* de las NPs preparadas mediante el extracto crudo y por infusión, con las que se realizaron diluciones logarítmicas para establecer los efectos sobre la germinación de las semillas. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Tukey, empleando el programa NCSS (Windows Vista, Versión 0.7.1.17, Kaysvillve, Utah), reportando diferencias estadísticamente significativas respecto al control cuando $p < 0.001$.

Resultados

En la Figura 1 (a), se muestran los espectros FT-IR de los extractos analizados. Los picos de absorción alrededor de 3382, 3368, 3337, 1384 y 1256 cm^{-1} corresponden a vibraciones de estiramiento de alcoholes, las bandas a 2978, 2939, 2930 y 2888 cm^{-1} pertenecen a vibraciones de estiramiento de alcanos, las bandas a 1635 y 1632 cm^{-1} son características de vibraciones de estiramiento de alquenos, las vibraciones de estiramiento de alcoholes primarios se presentaron a 1056, 1053 y 1050 cm^{-1} , mientras que los picos a 923, 921, 871, 866, 818 y 777 cm^{-1} pertenecen a las vibraciones de flexión de alcanos. Estas bandas características presentes en los tres extractos hacen suponer principalmente la presencia de carbohidratos.

Las pruebas fitoquímicas dieron resultados positivos solamente para carbohidratos y azúcares reductores, lo que coincide con lo observado por espectroscopia FT-IR y lo reportado en la literatura acerca de la composición química del extracto, que consiste en celulosa, hemicelulosa y lignina (Gan & Li, 2012), los cuales pueden actuar en la reducción de los iones Ag y estabilización de las NPs.

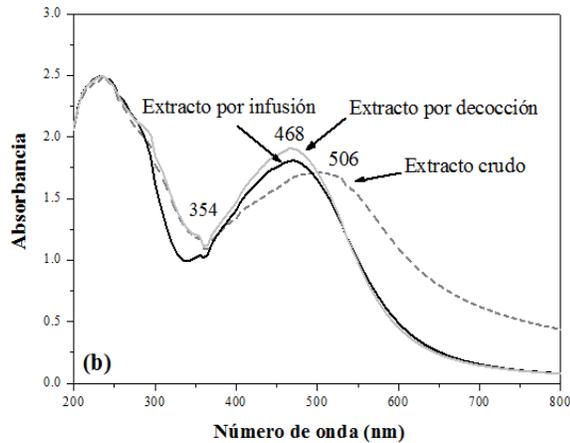


Fig. 1. (a) Espectros FT-IR de los extractos acuosos de la perfolia de *Zea mays* obtenidos por infusión, decocción y molienda. **(b)** Espectros UV-Vis de la síntesis de AgCl/Ag NPs a partir de cada uno de los extractos.

Los resultados de la síntesis de NPs con los diferentes extractos se presentan en la figura 1 (b). Las bandas de absorción características de las NPs se observan a 354 nm para Ag, 468 y 506 nm que corresponden a AgCl, tal como se reporta en la literatura (Seungwook *et al.*, 2010; Karuppiyah & Rajmohan, 2013). El máximo de absorción para el extracto crudo mostró un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores, lo cual se puede deber a una aglomeración de las partículas (Karuppiyah & Rajmohan, 2013), este efecto se corroboró con los análisis por granulometría, donde se obtuvo una sola distribución y menor tamaño de partícula (204 nm) en el extracto por infusión, en comparación con el extracto crudo (687 nm) y el obtenido por decocción (bimodal) 72 y 486 nm; a partir de estos resultados se eligió el extracto obtenido por infusión para las posteriores pruebas en *L. sativa*.

Los espectros UV-Vis presentados en la figura 2 (a) corresponden a la variación del volumen de extracto añadido en la síntesis. El máximo de absorción, característico a la resonancia del plasmón superficial de las Ag y AgCl NPs a 354 y 443 nm respectivamente, se desplaza hacia longitudes de onda mayores (480 nm) conforme aumenta el volumen de extracto. La literatura reporta que este efecto se atribuye al aumento y coexistencia de ambas partículas (Sahayaraj *et al.*, 2012) así como a un probable incremento en la viscosidad del sistema o baja concentración de metabolitos encargados de la estabilización, ya que por debajo o sobre los 3 mL de extracto, la moda obtenida es de 486 nm.

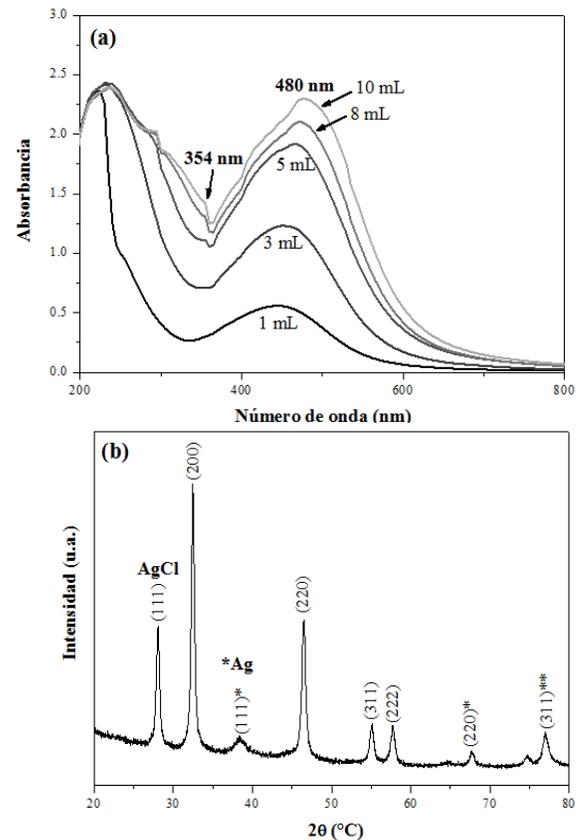


Fig. 2. (a) Espectros UV-Vis de la síntesis de NPs de AgCl/Ag a partir de 1-10 mL del extracto obtenido por infusión. **(b)** Difracción de rayos X, que corrobora la composición y estructura cristalina de las NPs sintetizadas.

Mediante el análisis de difracción de rayos X se corroboró la coexistencia y cristalinidad de ambas partículas (figura 2b).

Las micrografías (figuras 3a y 3b), muestran aglomerados de NPs de morfología semi-esférica, con tamaños de 144 nm, conformados por partículas más pequeñas de alrededor de 30-50 nm. El análisis estadístico realizado para observar efecto en plántulas de *L. sativa* (figura 3b) a 7 días de germinación, mostró que a partir de 1.3 mg/L de NPs adicionadas se tiene un efecto adverso sobre sus características fisiológicas, en comparación con el control, impidiendo su posterior desarrollo y crecimiento.

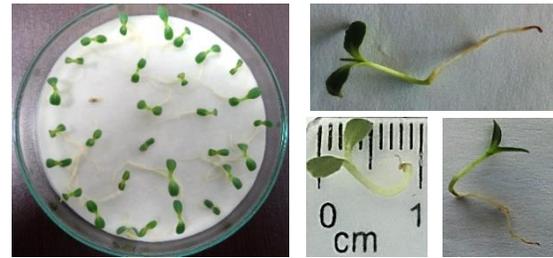
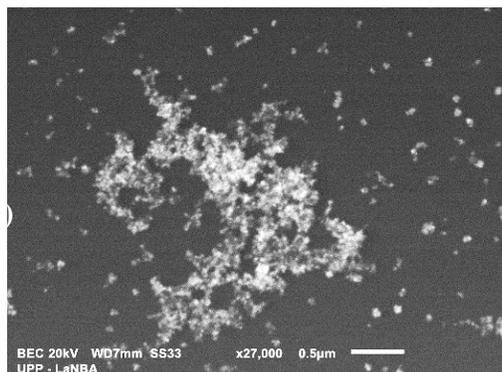
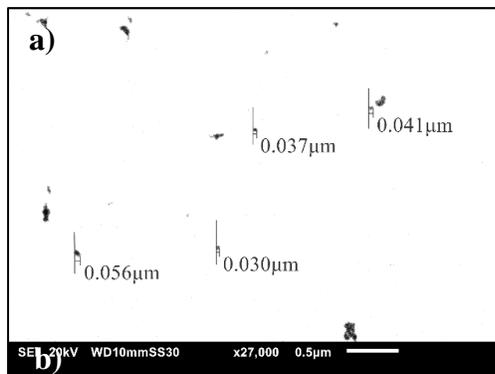


Figura 3. a) y b) Micrografías de NPs a partir de 3 mL del extracto por infusión, c) Plántulas de *L. sativa* a los 7 días de germinación (Las plántulas de la izquierda en la caja Petri: 0 mg/L, a la derecha las plántulas por separado: 130 mg/L).

Conclusiones

El método por infusión para la extracción de metabolitos de la perfolia de *Zea mays*, permitió obtener partículas estables y dispersas, donde los carbohidratos y azúcares reductores son los principales responsables de dicho proceso. A partir de 3 mL del extracto, fue posible sintetizar AgCl/Ag NPs con tamaños de partícula de 30-50 nm, siendo 1.3 mg/L la concentración que ocasiona un decremento significativo en la elongación de radícula, hipocótilo y contenido de biomasa respecto al control.

Agradecimiento

Los autores agradecen a CONACYT por la beca de MGYC (No. 332012) para realizar estudios de posgrado, al M.M. Roel González Montes de Oca (LaNBA-UPP) por las observaciones realizadas en MEB.

Referencias

- Silambarasan, S., & Abraham, J. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles. *African Journal of Biotechnology*, 12(21), 3088-3098.
- Sekhon, B. S. (2014). Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*, 7, 31-53.

Gan, P.P. & Li, S.F.Y. (2012). Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. *Environmental Science Biotechnology*, 11(2), 169-206.

Prado Martínez, M., Anzaldo Hernández, J., Becerra Aguilar, B., Palacios Juárez, H., Vargas Radillo, J., & Rentería Urquiza, M. (2012). Caracterización de hojas de mazorca de maíz y de bagazo de caña para la elaboración de una pulpa celulósica mixta. *Madera Bosques*, 18(3), 37-51.

Villanueva Ibáñez, M., Yañez Cruz, M.G., Álvarez García, R., Hernández Pérez, M., & Flores González, M. (2015). Aqueous corn husk extract – mediated green synthesis of AgCl and Ag nanoparticles. *Materials Letters*, 152, 166-169 International Rules for Seed Testing (ISTA). (2010). Published by the International Seed Testing Association. Zürichstr. 50-83.

Seungwook, K., Haegeun, C., Jong, H., Ho, G., & Woong, K. (2010). Facile Synthesis of Silver Chloride Nanocubes and Their Derivatives. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(10), 2918-2922.

Karuppiah, M., & Rajmohan, R. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using *Ixora coccinea* leaves extract. *Materials Letters*, 97, 141-143.

Sahayaraj, K., Rajesh, S., & Rathi, J. (2012). Silver nanoparticles biosynthesis using marine alga *padina pavonica* (Linn.) and its microbicidal activity. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(4), 1557-1567